

# NORME INTERNATIONALE

ISO  
7954

Première édition  
1987-11-01



---

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION  
ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION  
МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ

---

## **Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des levures et moisissures — Technique par comptage des colonies à 25 °C**

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
*Microbiology — General guidance for enumeration of yeasts and moulds — Colony count  
technique at 25 °C*  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 7954:1987](#)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f95d69fd-85a2-439f-8e39-  
bc0d8770d433/iso-7954-1987](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f95d69fd-85a2-439f-8e39-bc0d8770d433/iso-7954-1987)

Numéro de référence  
ISO 7954:1987 (F)

## Avant-propos

L'ISO (Organisation internationale de normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (comités membres de l'ISO). L'élaboration des Normes internationales est normalement confiée aux comités techniques de l'ISO. Chaque comité membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du comité technique créé à cet effet. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO participent également aux travaux.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 7954 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

# Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des levures et moisissures — Technique par comptage des colonies à 25 °C

## 0 Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen microbiologique de produits alimentaires non concernés par les Normes internationales existant actuellement et pour être prises en considération par les organisations élaborant des méthodes d'essai microbiologiques destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux.

En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes.

Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, les directives données et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale, si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles vraiment nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

## 1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement des levures et moisissures revivifiables dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies à 25 °C.

NOTE — Du fait de la nature même des levures et des moisissures, le dénombrement sera sujet à certaines imprécisions.

## 2 Références

ISO 6887, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

ISO 7218, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques.*

## 3 Définition

Dans le cadre de la présente Norme internationale, la définition suivante est applicable.

**levures et moisissures** : Micro-organismes qui à 25 °C forment des colonies dans un milieu sélectif selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

## 4 Principe

**4.1** Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture sélectif déterminé, coulé dans deux boîtes de Petri, avec une quantité définie de l'échantillon pour essai, si le produit est liquide, ou de la suspension mère pour les autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales des autres boîtes, obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

**4.2** Incubation de ces boîtes en aérobiose à 25 °C pendant 3, 4 ou 5 jours.

**4.3** Calcul du nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans des boîtes choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif.

## 5 Milieu de culture et diluant

### 5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du milieu de culture, des composants de base déshydratés ou un milieu complet déshydraté. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être distillée ou déionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des levures et des moisissures dans les conditions de l'essai.

Les mesures du pH doivent être effectuées au moyen d'un pH-mètre à compensation de température (6.4).

Si le diluant et le milieu ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité entre 0 et 5 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

**5.2 Diluant**

Se reporter à l'ISO 6887 et à la Norme internationale spécifique du produit à examiner.

**5.3 Gélose à l'extrait de levure au dextrose et au chloramphénicol**

Tableau

Composant	Quantité
Extrait de levure	5 g
Dextrose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20 g
Chloramphénicol (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,1 g*
Agar-agar	12 à 15 g**
Eau	1 000 ml

\* Afin d'obtenir une concentration finale du milieu de 100 µg/ml.

\*\* Selon les instructions du fabricant.

Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à l'ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6.

Répartir le milieu gélosé dans des récipients appropriés (6.5).

Stériliser à 121 °C pendant 15 min.

NOTE — Le chloramphénicol peut être remplacé par de l'oxytétracycline (C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>11</sub>). Dans ce cas, préparer le milieu de base comme décrit ci-dessus, en omettant le chloramphénicol, le répartir à raison de 100 ml et stériliser. Préparer également une solution à 0,1 % (m/m) de chlorhydrate d'oxytétracycline dans de l'eau et stériliser par filtration. Au moment de l'emploi, ajouter aseptiquement 10 ml de cette solution à 100 ml de milieu de base fondu et maintenu à 45 °C.

**6 Appareillage et verrerie**

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

**6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)** (autoclave autonome ou faisant partie d'un ensemble pour la préparation et la répartition des milieux.

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, le milieu de culture et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement le matériel en matière plastique), doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes :

a) au four (6.1), en le maintenant à une température de 170 à 175 °C pendant au moins 1 h;

b) à l'autoclave (6.1), en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C pendant au moins 20 min.

**6.2 Étuve**, réglable à 25 ± 1 °C.

**6.3 Bain d'eau**, réglable à 45 ± 1 °C.

**6.4 pH-mètre à compensation de température**, ayant une précision de réglage de ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

**6.5 Tubes de culture ou flacons.**

NOTE — Des flacons de culture munis de couvercles à vis en métal non toxique peuvent être utilisés.

**6.6 Pipettes graduées**, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, de capacités nominales de 10 et 1 ml, graduées en divisions de 0,5 et 0,1 ml, respectivement, et avec une ouverture nominale de 2 à 3 mm.

**6.7 Boîtes de Petri**, d'un diamètre de 90 à 100 mm.

**7 Échantillonnage**

Effectuer l'échantillonnage conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné.

S'il n'y a pas de Norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

**8 Préparation de l'échantillon pour essai**

Voir la Norme internationale spécifique du produit concerné.

S'il n'y a pas de Norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

**9 Mode opératoire**

**9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions**

Se reporter à l'ISO 6887 et à la Norme internationale spécifique du produit à examiner.

S'il n'y a pas de Norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 9.2 Ensemencement et incubation

**9.2.1** Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.7). Transférer, dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette stérile (6.6), 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

**9.2.2** Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. Transférer, dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  (produits liquides) ou 1 ml de la dilution  $10^{-2}$  (autres produits).

Répéter les opérations décrites ci-dessus avec les dilutions suivantes si nécessaire.

**9.2.3** Couler dans chaque boîte de Petri, environ 15 ml de la gélose à l'extrait de levure au dextrose et au chloramphénicol (5.3), provenant d'un flacon de culture (6.5) fondue au préalable et maintenue à  $45 \pm 1$  °C dans le bain d'eau (6.3). Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution  $10^{-1}$  dans le cas d'un produit liquide) et le moment où le milieu est coulé dans les boîtes, ne doit pas dépasser 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche horizontale.

Préparer également une boîte témoin avec 15 ml du milieu pour contrôler sa stérilité.

**9.2.4** Retourner les boîtes et les placer à l'étuve (6.2) à  $25 \pm 1$  °C.

## 9.3 Interprétation

Compter les colonies sur chaque boîte après 3, 4 et 5 jours d'incubation. Après 5 jours, retenir les boîtes contenant moins de 150 colonies. Si des parties de boîtes sont envahies par des moisissures ou s'il est difficile de compter des colonies bien isolées, retenir les comptages obtenus après 4, ou même 3 jours d'incubation. Dans ce cas, la durée d'incubation, de 3 ou 4 jours, doit être indiquée au procès-verbal d'essai.

Si cela est nécessaire, procéder à un examen microscopique pour distinguer, selon l'aspect morphologique, les colonies de levures et moisissures des colonies de bactéries.

## 10 Expression des résultats

### 10.1 Calcul

**10.1.1** Utiliser les dénombrements à partir des boîtes contenant moins de 150 colonies.

**10.1.2** Le nombre de levures et moisissures par gramme ou par millilitre est égal à

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

où

$\Sigma C$  est la somme des colonies sur toutes les boîtes comptées;

$n_1$  est le nombre de boîtes comptées à la première dilution;

$n_2$  est le nombre de boîtes comptées à la seconde dilution;

$d$  est la dilution à partir de laquelle les premiers dénombrements sont obtenus (par exemple,  $10^{-2}$ ).

**10.1.3** Arrondir le résultat obtenu en 10.1.2 à deux chiffres significatifs. Lorsque le nombre à arrondir est 5, sans autres chiffres significatifs, l'arrondir de manière que le chiffre immédiatement à gauche soit pair, par exemple, 28 500 est arrondi à 28 000; 11 500 est arrondi à 12 000.

**10.1.4** Le résultat doit être exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^x$ ,  $x$  étant la puissance appropriée de 10.

S'il n'y a aucune colonie sur les boîtes au niveau de la suspension mère (9.1), si le produit d'origine est solide, le nombre de levures et de moisissures par gramme de produit sera rapporté comme étant inférieur à 10.

S'il n'y a aucune colonie sur les boîtes au niveau de l'échantillon pour essai, si le produit d'origine est liquide (9.1), le nombre de levures et de moisissures par millilitre de produit sera rapporté comme étant inférieur à 1.

### 10.2 Exemple de calcul

Un dénombrement de levures et moisissures a donné les résultats suivants (deux boîtes de Petri par dilution furent incubées) :

dilution  $10^{-2}$  : 83 et 97 colonies

dilution  $10^{-3}$  : 33 et 28 colonies

$$\frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d} = \frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{241}{0,022} = 10\,954$$

En arrondissant le résultat comme spécifié en 10.1.3, on obtient 11 000.

Le nombre estimé de levures et moisissures, par gramme ou par millilitre, est donc de  $1,1 \times 10^4$ .

### 10.3 Fidélité

Pour des raisons d'ordre statistique, dans 95 % des cas, les limites de confiance de cette méthode varient de  $\pm 16$  % à  $\pm 52$  %<sup>[1]</sup>. En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées et, en particulier, entre les résultats obtenus par différents microbiologistes.

### 11 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée, la durée d'incubation et les résultats obtenus. Il doit, en outre,

mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

### 12 Bibliographie

[1] COWELL et MORISETTI, *J. Sci. Food Agric.*, 1969 (Vol. 20), p. 573.

---

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 7954:1987](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f95d69fd-85a2-439f-8e39-bc0d8770d433/iso-7954-1987)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f95d69fd-85a2-439f-8e39-bc0d8770d433/iso-7954-1987>

Page blanche

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 7954:1987

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f95d69fd-85a2-439f-8e39-bc0d8770d433/iso-7954-1987>

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 7954:1987](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f95d69fd-85a2-439f-8e39-bc0d8770d433/iso-7954-1987>

---

**CDU 579.67.087.23**

**Descripteurs** : produit agricole, produit alimentaire, analyse microbiologique, détermination, microorganisme, levure, champignon.

Prix basé sur 3 pages

---