
**Microbiologie des aliments — Préparation
des échantillons, de la suspension mère et
des dilutions décimales en vue de l'examen
microbiologique —**

Partie 1:

**Règles générales pour la préparation de la
suspension mère et des dilutions décimales**

iTeh STANDARD REVIEW
(standards.itih.ai)

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Preparation of test
samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological
examination*

*Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and
decimal dilutions*



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 en général 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. L'ISO collabore étroitement avec la Commission électrotechnique internationale (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6887-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette première édition de l'ISO 6887-1 annule et remplace l'ISO 6887:1983.

L'ISO 6887 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*:

- *Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*
- *Partie 2: Règles spécifiques pour la préparation des échantillons et de la suspension mère*

La partie 2 sera probablement transformée en plusieurs parties traitant chacune de produits spécifiques, tels que la viande, le lait, le poisson, ainsi que d'autres produits.

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que cette méthode horizontale ne soit pas applicable dans tous ses détails à certains d'entre eux. Dans ce cas, des méthodes différentes, spécifiques à ces produits, pourront être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, il convient que tous les efforts soient faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Lors du prochain réexamen périodique de la présente partie de l'ISO 6887, il sera tenu compte de toutes les évolutions intervenues depuis sa publication et, notamment, dans quelle mesure cette méthode horizontale aura été suivie ainsi que les raisons des dérogations dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation de toutes les méthodes d'essai ne peut être réalisée de façon immédiate; de ce fait, il peut déjà exister des Normes internationales et/ou nationales pour certains groupes de produits, qui ne concordent pas avec la présente méthode horizontale. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les prescriptions de la présente partie de l'ISO 6887 et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

La présente partie de l'ISO 6887 définit les règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.

La partie 2 de l'ISO 6887 (en préparation) spécifiera des règles spécifiques pour la préparation de l'échantillon pour essai et de la suspension mère, en tenant compte de la diversité des produits alimentaires auxquels l'ISO 6887 s'applique.

Pour un certain nombre de produits, il est nécessaire de prendre des précautions particulières, notamment lors de la préparation de la suspension mère, en raison de l'état physique du produit (par exemple produit déshydraté, produit très visqueux), ou de la présence de composants inhibiteurs (par exemple épices, poissons salés), ou de l'acidité, etc.

Il est recommandé, dans l'attente de la publication de la partie 2, que tout diluant ou toute pratique spécifique prescrit(e) pour des produits particuliers dans les normes spécifiques appropriées, soit utilisé(e) pour la préparation de la suspension mère, par exemple:

- ajustement à la neutralité de la valeur du pH d'une suspension alimentaire;
- utilisation de l'eau peptonée tamponnée, à l'exclusion de tout autre diluant, dans le cas de produits à effet inhibiteur, ou dont les micro-organismes ont subi un stress (par exemple pH acide);
- techniques spécifiques de réhydratation pour minimiser le choc osmotique, dans le cas d'aliments à faible activité de l'eau;
- utilisation de températures adéquates pour faciliter la mise en suspension du cacao, de la gélatine, de la poudre de lait, etc.;
- techniques de revivification pour améliorer la récupération de micro-organismes stressés lors du traitement et du stockage des aliments;
- modalités et durée de l'homogénéisation spécifique à certains produits (par exemple céréales) et/ou à certaines déterminations (par exemple levures et moisissures);
- utilisation d'agents de surface actifs pour des aliments à forte teneur en matière grasse.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6887-1:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ad5bf8c6-ca44-40d8-b757-804799b85983/iso-6887-1-1999>

Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique —

Partie 1:

Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 6887 définit des règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales réalisées en aérobiose, en vue des examens microbiologiques des produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

La présente partie de l'ISO 6887 est applicable dans le cas général, à l'exception des produits visés dans l'ISO 6887-2.

(standards.iteh.ai)

2 Référence normative

ISO 6887-1:1999

Le document normatif suivant contient des dispositions qui par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 6887. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente partie de l'ISO 6887 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente du document normatif indiqué ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.*

3 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 6887, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

suspension mère (première dilution)

suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser (ou de l'échantillon pour essai préparé à partir de ce produit) a été mélangée avec une quantité neuf fois égale de diluant, en laissant se déposer les particules grossières, s'il y en a

NOTE Voir l'article 5 et les notes 1 et 2 en 9.1.

3.2

dilutions décimales suivantes

suspensions ou solutions obtenues en mélangeant un volume mesuré de la suspension mère (3.1) avec un volume neuf fois égal de diluant et en répétant cette opération sur les dilutions suivantes, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture

3.3

norme spécifique

Norme internationale ou document de directives décrivant l'analyse d'un produit déterminé (ou d'un groupe de produits) en vue de la recherche ou du dénombrement d'un micro-organisme déterminé (ou d'un groupe de micro-organismes)

4 Principe

Préparation de la suspension mère (3.1), de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai.

Préparation, si nécessaire, de dilutions décimales (3.2) en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des tubes) ou d'effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes), comme précisé dans chaque norme spécifique.

NOTE Pour restreindre le domaine de dénombrement à un intervalle donné ou si des nombres élevés de micro-organismes sont attendus, il est possible d'ensemencer uniquement les dilutions décimales nécessaires (deux dilutions successives au minimum) pour pouvoir dénombrer selon le mode de calcul décrit dans l'ISO 7218.

5 Diluants

5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. Les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue et appropriée pour l'analyse microbiologique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente (voir l'ISO 7218).

5.2 Diluants d'emploi général

5.2.1 Solution de peptone-sel

5.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	1,0 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau	1 000 ml

5.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

5.2.2 Eau peptonée tamponnée

5.2.2.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux	10,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na ₂ HPO ₄ ,12H ₂ O)	9,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Eau	1 000 ml

5.2.2.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

5.3 Diluants pour des besoins particuliers

Voir la norme spécifique du produit concerné.

NOTE L'ISO 6887-2 (en préparation) fournira des règles spécifiques.

5.4 Répartition et stérilisation du diluant

Répartir le diluant (5.2 ou 5.3) en volumes nécessaires à la préparation des suspensions mères dans des fioles (6.4) de capacité appropriée.

Répartir le diluant (5.2 ou 5.3) en volumes nécessaires à la préparation des dilutions décimales dans des tubes à essai (6.5) ou fioles (6.4) en quantité telle qu'après stérilisation, chaque tube ou fiole contienne 9,0 ml. L'incertitude de mesure de ce volume final, après stérilisation, ne doit pas excéder ± 2 %.

NOTE S'il est prévu de dénombrer plusieurs groupes de micro-organismes au moyen de milieux de cultures différents, il peut être nécessaire de répartir tous les diluants (ou quelques-uns seulement) en quantités supérieures à 9,0 ml, la dimension des fioles (6.4) et des tubes à essai (6.5) étant prévue en conséquence.

Boucher les tubes ou les fioles.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min.

6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave).

Voir l'ISO 7218.

6.2 Appareillage pour l'homogénéisation.

Voir l'ISO 7218.

6.3 Agitateur mécanique.

Voir l'ISO 7218.

6.4 Fioles, de capacités appropriées.

6.5 Tubes à essai, de capacités appropriées.

6.6 Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml.

6.7 pH-mètre, ayant une précision de lecture de $\pm 0,01$ unité pH à 25 °C, permettant de réaliser des mesures précises à $\pm 0,1$ unité pH.

6.8 Balance, capable de peser à 0,01 g près.

7 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour l'essai

Voir la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai et suspension mère (première dilution)

Dans un bol ou dans un sac en plastique stériles, peser, avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, une masse m g, ou mesurer, avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, un volume V ml (au minimum 10 g ou 10 ml, sauf spécification contraire) représentatifs de l'échantillon pour essai (voir l'article 8).

Ajouter une quantité de diluant égale à $9 \times m$ g ou $9 \times V$ ml. Cette quantité peut être mesurée de préférence en masse, avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, ou en volume, avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$.

NOTE 1 Il peut être nécessaire dans certains cas, notamment pour les produits donnant une suspension mère 1 + 9 trop visqueuse ou trop épaisse, d'ajouter davantage de diluant. Il convient alors d'en tenir compte dans la suite des opérations et/ou dans l'expression des résultats.

NOTE 2 Cette première dilution conditionne en partie la valeur de la limite inférieure de dénombrement, qui dépend également de la technique utilisée (par exemple ensemencement dans la masse avec un inoculum de 1 ml dans une suspension 1/10, pour laquelle cette limite est de 10 micro-organismes par gramme). S'il est nécessaire, pour certains dénombrements dans certains produits, de descendre en dessous de cette limite, il est possible d'utiliser un volume inférieur de diluant¹⁾. Il convient de noter que l'ensemencement de cette suspension mère peut éventuellement entraîner des difficultés liées au déséquilibre du rapport inoculum/milieu (inhibition de la croissance microbienne par une concentration accrue des composants de l'aliment).

Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant pendant les opérations décrites ci-après doit être proche de la température ambiante, sauf produits particuliers (voir la norme spécifique).

Homogénéiser le mélange suivant les recommandations de l'ISO 7218.

Si nécessaire, laisser les grosses particules se déposer durant 15 min au maximum. Les systèmes de filtration donnant des résultats équivalents peuvent être utilisés.

Dans le cas du dénombrement des spores, un chauffage de la suspension mère (par exemple pendant 10 min à 80 °C) doit être pratiqué immédiatement après sa préparation, suivi d'un refroidissement rapide.

¹⁾ Dans ce cas, il convient de mentionner dans le rapport d'essai le volume de diluant utilisé.

9.2 Dilutions décimales suivantes

Transvaser, à l'aide d'une pipette stérile et avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$ ²⁾, 1 ml de la suspension mère dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile à la température appropriée.

NOTE Si un plus grand volume est nécessaire, il est possible d'ajouter un volume déterminé de suspension mère (plus de 1 ml), avec une incertitude de mesure de $\pm 5\%$, dans une fiole (6.4) contenant neuf fois le volume de diluant stérile.

Pour une précision optimale, ne pas introduire la pipette dans la suspension mère de plus de 1 cm.

Éviter tout contact entre la pipette contenant l'inoculum et le diluant stérile.

Mélanger soigneusement la prise d'essai et le diluant, en utilisant de préférence un agitateur mécanique (6.3), pendant 5 s à 10 s, pour obtenir la dilution 10^{-2} .

Si nécessaire, répéter ces opérations sur la dilution 10^{-2} et les dilutions décimales suivantes en utilisant à chaque dilution une nouvelle pipette stérile afin d'obtenir les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , etc., jusqu'à obtention du nombre approprié de micro-organismes (voir l'article 4).

9.3 Durée des opérations

Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère et le moment où l'inoculum entre en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 45 min, en limitant à 30 min le temps séparant la préparation de la suspension mère (9.1) du début de la préparation des dilutions décimales suivantes, sauf indications particulières mentionnées dans la Norme internationale spécifique.

NOTE Si la température ambiante du laboratoire est trop élevée, il convient de réduire ces deux durées maximales.

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 6887-1:1999
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ad5bf8c6-ca44-40d8-b757-804799b85983/iso-6887-1-1999>

²⁾ L'incertitude de mesure de $\pm 5\%$ retenue tient compte des limites actuelles des pipettes couramment utilisées.