

Première édition
2003-12-15

Version corrigée
2004-08-01

**Microbiologie des aliments — Guide pour
la préparation et la production des
milieux de culture —**

**Partie 2:
Guide général pour les essais de
performance des milieux de culture**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Guidelines on
preparation and production of culture media —*

Part 2: Practical guidelines on performance testing of culture media

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792c98677/iso-ts-11133-2-2003>



Numéro de référence
ISO/TS 11133-2:2003(F)

PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO/TS 11133-2:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792c98677/iso-ts-11133-2-2003>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2003

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Version française parue en 2009

Publié en Suisse

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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO/TS 11133-2 a été élaborée par le Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

L'ISO/TS 11133 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture*:

- *Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*
- *Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

La présente édition en français correspond à la version corrigée de l'ISO/TS 11133-2:2003, publiée en anglais en 2004.

Sommaire

Page

Avant-propos.....	v
Introduction	vi
1 Domaine d'application.....	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions.....	1
4 Critères de contrôle systématique de la qualité.....	2
5 Méthodes pour les essais de performance des milieux de culture.....	5
6 Documentation des résultats d'essai	12
Annexe A (informative) Exemple de carte de contrôle pour enregistrer les résultats des essais des milieux de culture préparés au laboratoire par l'utilisateur.....	13
Annexe B (normative) Micro-organismes pour essai recommandés pour les milieux de culture les plus usuels (fournissant des informations sur le milieu de culture, les conditions de culture, les micro-organismes pour essai, le numéro de collection des souches pour essai et les réactions attendues).....	14
Bibliographie	25

ISO/TS 11133-2:2003
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792c98677/iso-ts-11133-2-2003>

Avant-propos

Le présent document (CEN ISO/TS 11133-2:2003) a été élaboré par le Comité Technique CEN/TC 275 «Analyse des produits alimentaires - Méthodes horizontales», dont le secrétariat est tenu par le DIN, en collaboration avec le Comité Technique ISO/TC 34 «Produits alimentaires».

Le présent document «Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture» comporte deux parties:

- *Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*
- *Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

L'Annexe A est informative. L'Annexe B est normative.

Le présent document comporte une Bibliographie.

Selon le Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, les instituts de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus d'annoncer cette Spécification technique: Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, Finlande, France, Grèce, Hongrie, Irlande, Islande, Italie, Luxembourg, Malte, Norvège, Pays-Bas, Portugal, République Tchèque, Royaume-Uni, Slovaquie, Suède et Suisse.

(standards.iteh.ai)

ISO/TS 11133-2:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792c98677/iso-ts-11133-2-2003>

Introduction

Pour effectuer des analyses microbiologiques des aliments fiables, il est essentiel d'utiliser des milieux de culture de qualité reconnue. Pour tous les milieux décrits dans les méthodes normalisées, il est indispensable de définir les critères de conformité minimaux nécessaires pour garantir la fiabilité des milieux. Il est recommandé, pour la détermination des caractéristiques de performance d'un milieu de culture, de procéder à des essais conformes à la présente Spécification technique. Cette recommandation s'applique:

- a) aux milieux déshydratés ou prêts à l'emploi disponibles dans le commerce;
- b) aux milieux de culture préparés à partir des composants de base dans le laboratoire où ils sont utilisés.

Il convient que l'établissement de critères de performance minimaux largement acceptés pour les milieux conduise à l'apparition de produits du commerce de qualité plus homogène, et réduise ainsi le nombre des essais nécessaires dans les laboratoires où ils sont utilisés.

En outre, les critères de conformité minimaux mesurés à l'aide des méthodes définies dans la présente Spécification technique peuvent être utilisés par tous les laboratoires de microbiologie pour évaluer le caractère productif, sélectif et/ou électif d'un milieu de culture.

Les exigences relatives à l'analyse microbiologique des aliments contenues dans la présente Spécification Technique sont prioritaires dans l'évaluation de la qualité des milieux.

(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 11133-2:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792c98677/iso-ts-11133-2-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792c98677/iso-ts-11133-2-2003>

Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture —

Partie 2:

Guide général pour les essais de performance des milieux de culture

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique définit des critères et des méthodes pour les essais de performance des milieux de culture. La présente Spécification technique s'applique:

- aux entités commerciales qui produisent des milieux prêts à l'emploi, semi-finis reconstitués ou déshydratés et/ou les distribuent aux laboratoires de microbiologie;
- aux entités non commerciales qui fournissent des milieux à des tiers;
- aux laboratoires de microbiologie qui préparent des milieux de culture pour leur propre usage et qui évaluent les performances de ces milieux.

[ISO/TS 11133-2:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792c98677/iso-ts-11133-2-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792c98677/iso-ts-11133-2-2003>

2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Spécification technique. 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 Spécification technique sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ENV ISO 11133-1:2000, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire* (ISO/TS 11133-1:2000)

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ENV ISO 11133-1:2000 s'appliquent.

4 Critères de contrôle systématique de la qualité

4.1 Critères de qualité généraux

4.1.1 Qualité des milieux de culture

La qualité des milieux dépend de la qualité de leurs ingrédients de base, de leur bonne formulation, de la qualité des modes opératoires de préparation, de l'élimination des agents microbiens contaminants et de l'adéquation de l'emballage et des conditions de stockage (voir l'ENV ISO 11133-1).

Le fabricant ou le producteur au laboratoire doit se conformer aux caractéristiques physico-chimiques des milieux de culture spécifiées dans la norme applicable. En outre, le système qualité doit permettre de garantir la conformité des milieux de culture aux recommandations établies, telles que:

- la quantité répartie et/ou l'épaisseur;
- l'aspect, la couleur et l'homogénéité;
- la consistance du gel;
- le taux d'humidité;
- la valeur du pH;
- le pouvoir tampon;
- la contamination microbienne.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Les composants individuels et les compléments nutritifs ou sélectifs doivent également être soumis à des contrôles d'assurance qualité appropriés.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a3c2b82-ddd2-4752-b51c-d5f792e98677/iso-ts-11133-2-2003>

4.1.2 Qualité des composants de base des milieux

Les milieux de culture décrits dans les Normes internationales sont jugés satisfaisants. Néanmoins, du fait de la variabilité de leur qualité, il peut être admis que les fabricants de milieux modulent la concentration de certains ingrédients biologiques de base, comme indiqués ci-dessous:

- les peptones et les extraits de viande ou de levure en fonction de leurs propriétés nutritives;
- l'agar en fonction de son pouvoir gélifiant;
- les substances tampons;
- les sels biliaires, l'extrait de bile et le désoxycholate, les colorants antibactériens, en fonction de leur propriétés sélectives;
- les antibiotiques en fonction de leur activité.

4.2 Critères de qualité microbiologique

4.2.1 Généralités

Les essais de performance microbiologique doivent être effectués sur un échantillon représentatif d'un lot de produits finis.

4.2.2 Contamination microbienne

Une quantité de chaque lot de milieu de culture adaptée à sa taille doit être soumise à essai pour évaluer la contamination microbienne par incubation dans des conditions appropriées. Il convient que les limites cibles pour le pourcentage de boîtes ou de récipients de milieu liquide contaminés soient déterminées pour chaque milieu ou spécifiées par le fabricant. Il convient que les fabricants établissent des spécifications fondées sur les composants des milieux, les limites liées aux procédés et les types d'emballage.

NOTE 1 Pour les essais, il convient de prélever au moins une boîte ou un tube ou 1 % de boîtes ou de tubes du début de la répartition et une boîte ou un tube ou 1 % de boîtes ou de tubes de la fin de la répartition. Il convient que les boîtes ou les tubes soient incubés pendant au moins 18 h à 37 °C ou dans les conditions d'incubation habituellement utilisées pour ce milieu conformément à la norme applicable.

NOTE 2 Pour les plans d'échantillonnage statistique se référer à l'ISO 2859-1:1999.

4.2.3 Croissance

4.2.3.1 Généralités

Pour le contrôle par lot des milieux de culture complets, des ingrédients nutritifs ou des suppléments pour milieux de culture, la croissance doit être évaluée par des méthodes:

- a) quantitatives, ou
- b) semi-quantitatives ou
- c) qualitatives.

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Les évaluations quantitatives, semi-quantitatives ou qualitatives doivent être effectuées selon les méthodes décrites dans la présente Spécification technique ou selon une autre méthode reconnue. Pour l'interprétation des résultats, il est nécessaire de comparer la croissance sur le milieu d'essai avec celle obtenue sur le milieu de référence. Pour les méthodes quantitatives, il est donc obligatoire d'utiliser un milieu spécifique comme milieu de référence (voir la norme applicable ou l'Annexe B).

Pour les méthodes semi-quantitatives ou qualitatives, l'utilisation d'un milieu de référence spécifique (voir la norme applicable ou l'Annexe B) ou d'un milieu de culture donnant une réaction positive facilite l'interprétation des résultats. Le milieu de référence doit être choisi dans un lot antérieur récemment accepté et reconnu de bonne qualité, ou, pour comparer la stabilité à long terme, dans un lot récemment contrôlé, dans un lot d'un autre fournisseur, dans un milieu prêt à l'emploi, etc.

En outre, la croissance des souches désirées doit présenter un aspect, une taille et une morphologie des colonies caractéristiques, et la croissance des souches indésirables doit être partiellement ou complètement inhibée.

4.2.3.2 Productivité

À l'aide d'un instrument adapté et de micro-organismes pour essai définis, des milieux de culture solides, semi-solides ou liquides doivent être ensemencés avec un inoculum approprié (5.2.1.1) de la culture de travail de chacun des micro-organismes à soumettre à essai.

La productivité doit atteindre une limite minimale fixée (voir la norme applicable ou l'Annexe B).

Pour les méthodes quantitatives, le rapport de productivité P_R (1) est déterminé comme suit:

$$P_R = \frac{N_s}{N_o} \quad (1)$$

où

N_s est le nombre total de colonies obtenu sur le milieu de culture soumis à essai (obtenu sur une ou plusieurs boîtes);

N_o est le nombre total de colonies obtenu sur le milieu de culture de référence défini obtenu sur une ou plusieurs boîtes, mais doit être ≥ 100 ufc.

NOTE Le rapport de productivité d'un milieu non sélectif est au moins égal à 0,7 pour les micro-organismes qui se développent facilement sur ce milieu. Il convient que le P_R des micro-organismes pour essai sur un milieu sélectif soit au moins de 0,1. Ces valeurs sont généralement réalisables. Néanmoins, pour certaines combinaisons de milieux et de micro-organismes pour essai, des critères moins stricts peuvent être adoptés (voir la norme applicable ou l'Annexe B).

Pour les méthodes semi-quantitatives, les scores obtenus sur différents secteurs consécutifs d'une boîte ensemencée selon une technique écométrique sont additionnés pour obtenir l'indice de croissance G_1 . G_1 varie suivant les milieux de culture. Il est donc important de les comparer avec les indices précédents et/ou G_1 d'un milieu de référence et de vérifier que les variations ne sont pas excessives. La plage de variation spécifique d'un milieu de culture peut également être déterminée une fois qu'une expérience suffisante de la méthode est acquise.

Les évaluations qualitatives doivent être effectuées visuellement en attribuant des scores de croissance.

4.2.3.3 Sélectivité

Pour l'évaluation de la sélectivité par des méthodes quantitatives à l'aide d'un instrument adapté et de micro-organismes pour essai définis, des milieux de culture sélectifs et un milieu de culture de référence sont ensemencés avec un inoculum approprié (5.2.1.2.) de ces micro-organismes. La sélectivité doit atteindre des valeurs définies (voir la norme applicable ou l'Annexe B).

Le facteur de sélectivité S_F (2) est calculé comme suit:

$$S_F = D_O - D_S \quad (2)$$

où

D_O est la dilution la plus élevée présentant une croissance d'au moins 10 colonies sur le milieu de référence;

D_S est la dilution la plus élevée présentant une croissance comparable sur le milieu soumis à essai.

S_F , D_O et D_S sont exprimés en log à base 10.

NOTE Il convient que le S_F des micro-organismes indésirables sur un milieu sélectif soit au moins de 2. Cette valeur est généralement réalisable. Néanmoins, pour certaines combinaisons de milieux et de micro-organismes pour essai, des critères moins stricts peuvent être adoptés (voir la norme applicable ou l'Annexe B).

Pour les méthodes semi-quantitatives et qualitatives, la croissance de souches indésirables doit être partiellement ou complètement inhibée.

4.2.4 Caractéristiques biochimiques et physiologiques (sélectivité et spécificité)

Il convient que la morphologie des colonies, leurs caractéristiques, de même que le degré de sélectivité, soient déterminés afin d'obtenir une représentation complète des performances d'un milieu.

Les caractéristiques essentielles de la spécificité doivent être définies et atteintes. Dans le cas des milieux de différenciation, la qualité des caractéristiques biochimiques/physiologiques des micro-organismes recherchés et le degré d'inhibition des micro-organismes indésirables doivent être déterminés à l'aide d'un panel de souches d'essai.

4.2.5 Caractéristiques antimicrobiennes

L'action antimicrobienne des antibiotiques dépend de leur propriété de diffusion de la gélose et des possibles effets antagonistes. Il convient que les milieux utilisés pour effectuer des essais visant à déterminer la présence ou l'absence de substances antimicrobiennes dans les échantillons alimentaires soient conformes aux méthodes de référence.

4.3 Évaluation de performance et interprétation des résultats

Un lot de milieu de culture est satisfaisant si tous les micro-organismes pour essai se comportent conformément aux spécifications données. Il doit être accepté si à la fois les critères de qualité généraux et les critères de qualité microbiologiques sont remplis.

5 Méthodes pour les essais de performance des milieux de culture

5.1 Généralités

Des méthodes d'essai quantitatives, semi-quantitatives et qualitatives pour les milieux de culture solides et liquides sont données à titre d'exemple. Dans la plupart des laboratoires où elles seront utilisées, les techniques semi-quantitatives et qualitatives répondront aux exigences relatives aux essais de performance pour un lot de milieu de culture.

Pour les cas particuliers, par exemple pour l'évaluation d'un nouveau milieu ou d'un nouveau fournisseur, etc., des méthodes d'essai quantitatives doivent être réalisées par les laboratoires utilisateurs.

Les techniques microbiologiques (standards supposés connus) ; les méthodes ne sont donc pas décrites de façon exhaustive.

Des micro-organismes pour essai adaptés sont listés en Annexe B (voir également l'ENV ISO 11133-1).

NOTE À l'avenir, l'objectif est qu'une norme (nouvelle ou révisée) pour la détection ou le dénombrement de micro-organismes spécifiques, ou groupes de micro-organismes, devra décrire les micro-organismes pour essais appropriés ainsi que les critères de performance de chaque milieu de culture décrit dans cette norme.

Les interactions conduisant à la croissance de micro-organismes sur des milieux sélectifs liquides sont plus complexes. C'est pourquoi il est plus difficile de définir des méthodes d'essai de performance pour ces milieux que pour les milieux solides.

Pour parvenir à isoler les micro-organismes ciblés dans une méthode en plusieurs étapes, par exemple pour la détection de *Salmonella*, plusieurs interactions complexes ont lieu à chaque étape de la croissance. Il convient alors de mettre en place un essai de contrôle en utilisant des échantillons, une culture et des matériaux de référence appropriés afin de démontrer la productivité ou la sélectivité, respectivement, de la méthode dans son ensemble. Cela s'ajoute à la démonstration que chaque milieu est approprié.

5.2 Micro-organismes pour essai

Les souches de référence appropriées correspondant aux micro-organismes désirés (productivité) et indésirables (sélectivité) pour chaque milieu de culture sont indiquées en Annexe B. Il convient que les micro-organismes pour essai répondent aux exigences stipulées en 5.2.2 de l'ENV ISO 11133-1:2000, par exemple souches robustes, à faible croissance, biochimiquement non réactives ou stressées, selon le cas.

Des recommandations concernant la conservation et l'entretien des souches de référence figurent dans l'Annexe B de l'ENV ISO 11133-1.

5.2.1 Préparation de la culture de travail

Les cultures de travail doivent être préparées comme une culture pure en phase stationnaire dans un bouillon non sélectif provenant de la culture mère de référence.

Différentes techniques peuvent être utilisées, mais la pureté de l'inoculum doit être garantie et l'inoculum doit être normalisé, ce qui permet de l'utiliser ultérieurement.

NOTE Des inoculums congelés peuvent être utilisés s'il peut être démontré que les micro-organismes survivent pendant la période choisie.

5.2.1.1 Culture de travail pour les essais de productivité

Pour les essais quantitatifs des milieux en boîtes vis-à-vis d'un micro-organisme déterminé, un inoculum d'environ 10^2 ufc est utilisé.

Pour les essais semi-quantitatifs et qualitatifs des milieux en boîtes, utiliser des inoculums de 10^3 ufc à 10^4 ufc.

Pour les essais de productivité sur les milieux de culture liquides, un inoculum de 10 ufc à 100 ufc est utilisé.

5.2.1.2 Culture de travail pour les essais de sélectivité

Pour évaluer la sélectivité d'un milieu de culture, une suspension du micro-organisme indésirable contenant 10^4 ufc à 10^6 ufc est utilisée pour ensemercer les boîtes ou les tubes.

5.2.1.3 Conditions d'incubation (standards.iteh.ai)

Incuber les milieux de culture ensemençés conformément aux conditions décrites dans la norme correspondante et indiquée dans les tableaux appropriés en Annexe B.

5.3 Méthodes pour les milieux de culture solides

5.3.1 Méthode quantitative d'ensemencement

5.3.1.1 Généralités

Il s'agit d'une méthode générale appropriée à la plupart des milieux de culture solides. Dans certains cas, elle ne convient pas pour les moisissures.

5.3.1.2 Mode opératoire

- Utiliser des cultures de travail comme décrit en 5.2.1.
- Sélectionner un nombre adéquat de boîtes représentatives de chaque lot à soumettre à essai et vérifier que la surface de chaque boîte est correctement séchée. Il convient de préparer de même des boîtes de milieu de référence (voir 4.4.4 de l'ENV ISO 11133-1:2000).
- Étaler à la surface des boîtes pour essai et des boîtes de référence un inoculum de la culture de travail diluée de façon que le dénombrement des colonies se situe dans les limites recommandées données en 5.2.1.

NOTE 1 Il est également possible d'utiliser la méthode de Miles-Misra modifiée et d'autres systèmes d'ensemencement par gouttes ou un ensemencement par spirales.

NOTE 2 La méthode d'ensemencement en profondeur peut aussi être utilisée pour les milieux de culture normalement utilisés pour le dénombrement par cette méthode.