
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — 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**

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/76694f8a-04ca-41ca-8e74->

*Microbiology of the food chain — 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*



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6887-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/76694f8a-04ca-41ca-8e74-27ec0426ff41/iso-6887-1-2017>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2017, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	3
5 Diluants	3
5.1 Composants de base.....	3
5.2 Diluants d'emploi général.....	4
5.2.1 Solution de peptone-sel.....	4
5.2.2 Eau peptonée tamponnée.....	4
5.2.3 Eau peptonée tamponnée double concentration.....	4
5.3 Diluants pour des besoins particuliers.....	5
5.4 Distribution et stérilisation du diluant.....	5
5.5 Essai de performance des diluants.....	5
6 Appareillage	6
7 Prélèvement	7
8 Préparation des échantillons	7
8.1 Généralités.....	7
8.2 Produits congelés.....	8
8.2.1 Généralités.....	8
8.2.2 Petits échantillons décongelés avant l'analyse.....	8
8.2.3 Gros morceaux ou blocs prélevés à l'état congelé.....	8
8.3 Produits durs et secs.....	9
8.4 Produits déshydratés et autres produits à faible teneur en eau.....	9
8.5 Produits liquides et non visqueux.....	9
8.6 Produits acides.....	9
8.7 Aliments à forte teneur en matière grasse (plus de 20 %).....	10
8.8 Produits hétérogènes.....	10
8.9 Produits emballés.....	10
8.10 Prélèvements en surface (écouvillons et autres dispositifs).....	11
9 Modes opératoires spécifiques	11
9.1 Prise d'essai et suspension mère (dilution initiale).....	11
9.2 Durée des opérations.....	12
9.3 Opérations de regroupement et de reconstitution pour les analyses qualitatives.....	12
10 Dilutions suivantes	13
10.1 Gamme de dilutions décimales.....	13
10.2 Autres gammes de dilutions.....	13
Annexe A (informative) Illustrations des opérations de regroupement et de reconstitution	15
Annexe B (informative) Méthode de prélèvement de morceaux ou de blocs d'essai congelés	20
Annexe C (informative) Données illustrant la fiabilité des résultats d'essai selon la taille des prises d'essai	22
Annexe D (informative) Protocole de vérification pour le regroupement d'échantillons en vue d'analyses qualitatives	25
Bibliographie	28

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/patents).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

(standards.iteh.ai)

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute autre information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/foreword.html.

Le présent document a été élaboré par le comité technique l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 6887-1:1999), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Une liste des parties de la série ISO 6887 est disponible sur le site Internet de l'ISO.

Introduction

En raison de la grande diversité des aliments et aliments pour animaux, 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, peuvent être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées.

Lors du prochain réexamen périodique du présent document, 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 spécifications du présent document et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

Le présent document définit les règles générales pour la préparation des échantillons, des suspensions mères et des dilutions ultérieures en vue de l'examen microbiologique. Les autres parties de l'ISO 6887 donnent les règles spécifiques pour la préparation des échantillons et des suspensions mères, couvrant l'ensemble des aliments et aliments pour animaux ainsi que les échantillons d'environnement auxquels s'applique l'ISO 6887.

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 produits déshydratés, produits très visqueux), ou de la présence de composants inhibiteurs (par exemple épices, haute teneur en sel) ou de l'acidité, etc. Ceux-ci sont décrits dans des termes généraux dans le présent document.

Toute pratique ou tout diluant spécial indiqué(e) dans des méthodes normalisées spécifiques pour des produits ou des micro-organismes particuliers est à appliquer en priorité par rapport aux règles générales répertoriées dans la série de normes ISO 6887, incluant par exemple:

- les opérations de réhydratation spécifiques pour les aliments à faible activité de l'eau, pour réduire au minimum le choc osmotique;
- l'utilisation de températures adéquates pour faciliter la mise en suspension du cacao, de la gélatine, du lait en poudre, etc.;
- les techniques de revivification pour améliorer la récupération de micro-organismes stressés lors du traitement et du stockage des aliments;
- les modalités et la durée de l'homogénéisation spécifiques à certains produits (par exemple céréales) et/ou à certaines analyses (par exemple levures et moisissures).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6887-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/76694f8a-04ca-41ca-8e74-27ec0426ff41/iso-6887-1-2017>

Microbiologie de la chaîne alimentaire — 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

AVERTISSEMENT — Le présent document peut impliquer l'utilisation de produits et la mise en œuvre de modes opératoires et d'appareillages à caractère dangereux. Il incombe à l'utilisateur du présent document d'établir, avant de l'utiliser, des pratiques d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer l'applicabilité des restrictions réglementaires.

1 Domaine d'application

Le présent document définit des règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions réalisées en aérobiose, en vue des examens microbiologiques des produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale.

Le présent document est applicable aux cas généraux et les autres parties s'appliquent aux groupes de produits spécifiques indiqués dans l'Avant-propos. Certains aspects peuvent aussi être applicables aux méthodes moléculaires dans lesquelles les matrices peuvent être impliquées dans l'inhibition des étapes de PCR et, de ce fait, affectent le résultat d'essai.

Le présent document exclut la préparation d'échantillons en vue des méthodes de dénombrement et de recherche dans lesquelles les instructions de préparation sont détaillées dans des Normes internationales spécifiques.

2 Références normatives

Les documents suivants sont référencés dans le texte de sorte qu'une partie ou la totalité de leur contenu constitue des exigences du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et les définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <http://www.iso.org/obp>

3.1 échantillon pour laboratoire

échantillon dans l'état de préparation où il est envoyé au laboratoire et destiné à être utilisé pour un contrôle ou pour des essais

[SOURCE: ISO 7002:1986, A.19]

3.2 échantillon composite

échantillon constitué d'un mélange d'un certain nombre d'unités d'aliment, d'aliment pour animaux, d'animaux ou d'échantillons d'environnement à partir duquel une prise d'essai est prélevée pour l'analyse au laboratoire

Note 1 à l'article: Voir l'illustration d'un échantillon composite à l'[Annexe A](#).

3.3 échantillon groupé

échantillon constitué d'un mélange d'un certain nombre d'unités d'aliment, d'aliment pour animaux, d'animaux ou d'échantillons d'environnement où le mélange complet constitue la prise d'essai et est utilisé en entier pour l'analyse au laboratoire

Note 1 à l'article: Voir l'illustration d'un échantillon groupé à l'[Annexe A](#).

3.4 échantillon pour essai

échantillon préparé à partir de l'*échantillon pour laboratoire* (3.1) selon le mode opératoire spécifié dans une méthode d'essai, et à partir duquel les *prises d'essai* (3.5) sont prélevées

Note 1 à l'article: Il est rare de préparer l'échantillon pour laboratoire avant de prélever la prise d'essai lors des examens microbiologiques.

[SOURCE: ISO 7002:1986, A.47]

ISO 6887-1:2017
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/76694f8a-04ca-41ca-8e74-27ec0426ff41/iso-6887-1-2017>

3.5 prise d'essai

échantillon représentatif mesuré (volume ou masse) prélevé sur l'*échantillon pour laboratoire* (3.1) pour servir à la préparation de la *suspension mère* (3.6)

Note 1 à l'article: Il est parfois nécessaire de préparer l'*échantillon pour laboratoire* (3.4) avant de prélever la prise d'essai lors des examens microbiologiques, mais cela reste rare.

3.6 suspension mère

dilution initiale

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 de diluant égale le plus souvent à neuf fois cette quantité de produit, en laissant se déposer les particules grossières, s'il y en a

Note 1 à l'article: Des quantités de diluant au neuvième sont normalement utilisées pour produire une gamme de dilutions décimales, mais d'autres rapports peuvent être requis en fonction des besoins, notamment pour des dénombrements inférieurs.

3.7 dilution suivante

suspension ou solution obtenue en mélangeant un volume mesuré de la *suspension mère* (3.6) avec un volume de diluant égal à x fois le volume prélevé de la suspension mère et en répétant cette opération sur chaque dilution préparée de la sorte, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions, appropriée pour l'ensemencement des milieux de culture

Note 1 à l'article: Des dilutions au dixième sont normalement utilisées pour produire une gamme de dilutions décimales, mais d'autres rapports peuvent être requis en fonction des besoins.

3.8**prises d'essai groupées**

mélange de prises d'essai provenant d'un certain nombre d'unités d'aliment, d'aliment pour animaux, d'animaux ou d'échantillons d'environnement où le mélange complet est la prise d'essai analysée

Note 1 à l'article: Voir l'illustration de prises d'essai groupées à l'[Annexe A](#).

3.9**prises d'essai groupées (pré-)enrichies**

prises d'essai individuellement (pré-)enrichies d'un certain nombre d'unités d'aliment, d'aliment pour animaux, d'animaux ou d'échantillons d'environnement, à partir desquelles des volumes spécifiques sont mélangés pour une analyse ultérieure

Note 1 à l'article: Voir l'illustration de prises d'essai groupées (pré-)enrichies à l'[Annexe A](#).

3.10**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

Préparer la suspension mère (3.6) de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise d'essai (3.5).

Préparer, si nécessaire, des dilutions suivantes (3.7) 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 flacons) ou d'effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes), comme précisé dans chaque norme spécifique.

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

5 Diluants**5.1 Composants de base**

Pour améliorer la reproductibilité des résultats d'essai, il est recommandé d'utiliser des diluants prêts à l'emploi, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. Dans tous les cas, les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

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

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de qualité équivalente (voir l'ISO 7218 ou l'ISO 11133).

Pour plus d'informations sur les règles de préparation et d'essai de performance des milieux de culture, voir l'ISO 11133.

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 dans des fioles, des flacons ou des tubes à essai (6.4), 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

Peptone ^a	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O) ^b ‡	9,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄) ‡	1,5 g
Eau	1 000 ml

^a Digestat enzymatique de caséine par exemple.

^b Si l'hydrogénophosphate disodique est utilisé à un taux d'hydratation différent, modifier en conséquence la masse de l'ingrédient. Par exemple, si de l'hydrogénophosphate disodique anhydre (Na₂HPO₄) est employé, utiliser 3,57 g.

‡ Composants tampons, voir 5.2.3.

5.2.2.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau dans des fioles, des flacons ou des tubes à essai (6.4), 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.

5.2.3 Eau peptonée tamponnée double concentration

Ce diluant peut être nécessaire pour les échantillons très acides (voir en 8.6) et est préparé en dissolvant deux fois les quantités d'un milieu déshydraté complet dans 1 000 ml d'eau et en procédant de la même manière.

Si le diluant est préparé à partir de composants individuels, doubler uniquement les quantités des deux composants tampons (marqués ‡).

5.3 Diluants pour des besoins particuliers

Voir la norme spécifique ou la partie de l'ISO 6887 du produit concerné.

5.4 Distribution et stérilisation du diluant

Répartir le diluant en volumes appropriés pour la préparation des suspensions mères dans des récipients (6.4) de capacité appropriée.

Répartir le diluant pour les dilutions suivantes en volumes appropriés pour la préparation des dilutions (décimales ou autres) dans des contenants (6.4) de capacité appropriée.

La tolérance admissible sur le volume de diluant final, après stérilisation, ne doit pas excéder ± 2 %.

Pour 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 dans des contenants (6.4) de dimension appropriée.

Boucher les contenants sans les fermer totalement pour permettre la dilatation pendant le chauffage.

Stériliser à l'autoclave à $121\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ pendant 15 min (voir l'ISO 7218).

Après autoclavage, vérifier que les volumes d'une partie du lot de diluant préparé respectent la tolérance admise de ± 2 %. Pour ce faire, procéder de manière destructive en vidant le contenu des récipients dans un flacon taré après l'autoclavage, ou de manière non destructive en marquant et en pesant les récipients positionnés dans tout l'autoclave avant et après l'autoclavage. Pour les petits lots de moins de 100 unités, vérifier au moins une unité; pour les lots plus grands, vérifier entre 3 % et 5 % à l'aide de l'une des deux méthodes.

Pour s'assurer que les volumes de diluant respectent la tolérance admise, il est possible d'autoclaver de grands volumes et de répartir dans des conditions aseptiques les quantités requises dans des contenants stériles.

5.5 Essai de performance des diluants

Soumettre à essai tous les diluants avant utilisation selon le [Tableau 1](#) d'après la méthode indiquée dans l'ISO 11133.

La productivité des diluants est conforme lorsque le nombre de colonies comptées après la période d'incubation spécifiée à température ambiante du laboratoire (18 °C à 27 °C) est égal à ± 30 % du nombre compté au départ.

Tableau 1 — Micro-organismes d'essai et critères de productivité des diluants

Milieus	Incubation	Micro-organismes d'essai	Numéro WDCM ^a	Milieu de référence	Méthode de contrôle	Critères
Diluant à base de peptone-sel Eau peptonée tamponnée (concentration simple et double) Solution de peptone Diluant tampon phosphate	45 min à 1 h à température ambiante du laboratoire (18 °C à 27 °C)	<i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	00012 ou 00013 00034 ^b	TSA	Quantitative	±30 % du dénombrement initial
^a Pour plus d'informations sur les numéros d'identification des souches de collections de culture et pour les coordonnées, se référer au catalogue des souches de référence disponible à http://www.wfcc.info . ^b Souche à utiliser au minimum. ^c Souche au choix: une des souches au minimum doit être utilisée.						

6 Appareillage

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 Homogénéisateur

ISO 6887-1:2017

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/76694f8a-04ca-41ca-8e74-426ff41/iso-6887-1-2017>

6.2.1 Homogénéisateur rotatif (mélangeur)

Voir l'ISO 7218. Si un échantillon volumineux doit être homogénéisé, il convient de prévoir un matériel équipé d'un bol de 1 litre.

6.2.2 Homogénéisateur péristaltique

Voir l'ISO 7218. Avec des sacs, ou des sacs à filtre pour retenir la matière particulaire si nécessaire, stériles.

6.3 Agitateur mécanique, voir l'ISO 7218.

6.4 Fioles, tubes à essai ou flacons avec bouchons à vis, de capacités appropriées.

6.5 Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml. Des pipeteurs mécaniques de précision adéquate peuvent également être utilisés (voir l'ISO 7218).

6.6 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 (voir l'ISO 7218).

6.7 Balances et régulateurs de dilution gravimétriques, capables de peser à 1 % de la masse (voir l'ISO 7218).

6.8 Plateaux d'échantillons stériles, de dimensions appropriées.