

NORME
INTERNATIONALE

ISO
13681

Première édition
1995-12-15

**Viandes et produits à base de viande —
Dénombrement des levures et
moisissures — Technique par comptage
des colonies**
STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Meat and meat products — Enumeration of yeasts and moulds —
Colony-count technique*
[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/db663acd-fc41-45eb-850e-
f1f7786a81e/iso-13681-1995](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/db663acd-fc41-45eb-850e-f1f7786a81e/iso-13681-1995)

NORME

ISO



Numéro de référence
ISO 13681:1995(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 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 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 13681 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 6, *Viande et produits à base de viande*.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale.
L'annexe B est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1995

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'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Viandes et produits à base de viande — Dénombrement des levures et moisissures — Technique par comptage des colonies

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour le dénombrement des levures et moisissures dans tous les types de viandes et produits à base de viande, par comptage des colonies entre 20 °C et 25 °C.

IMPORTANT — L'ISO 7954[1], recommande l'emploi du chloramphénicol ou de l'oxytétracycline comme antibiotiques. Toutefois, ces antibiotiques ne permettent pas d'inhiber suffisamment les micro-organismes Gram-négatifs pouvant être trouvés dans les viandes et notamment les viandes crues. Afin de permettre une mise en évidence suffisante dans les cas où la contamination bactérienne est importante, il est nécessaire d'ajouter de la gentamicine. Étant donné que le chloramphénicol et la gentamicine, en combinaison, empêchent le développement de certains types de levures, l'antibiotique qui est préconisé en variante, c'est-à-dire l'oxytétracycline est à retenir.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 3100-2:1988, *Viandes et produits à base de viande — Échantillonnage et préparation des échantillons pour essai — Partie 2: Préparation des échantillons pour essai en vue de l'examen microbiologique.*

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

ISO 7218:—¹⁾, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.*

3 Définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

3.1 levures et moisissures: Micro-organismes qui, dans les 5 jours et entre 20 °C et 25 °C forment des colonies lorsque l'essai est effectué dans les conditions prescrites par la présente Norme internationale.

4 Principe

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

Dans les mêmes conditions, ensemencement d'autres boîtes avec les dilutions décimales obtenues à partir de la suspension mère.

1) À publier. (Révision de l'ISO 7218:1985)

NOTE 1 Afin de faire la distinction entre les levures et moisissures, si cela s'avère nécessaire, il est souhaitable de réaliser un ensemencement en surface. L'ensemencement en surface est également recommandé, si l'on s'attend à détecter des levures ou moisissures sensibles à la chaleur.

4.2 Incubation aérobie de ces boîtes entre 20 °C et 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 Diluant, milieu de culture et réactifs

5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218.

5.2 Diluant

Voir l'ISO 6887.

5.3 Milieu gélosé à l'extrait de levure, au glucose et à l'oxytétracycline/gentamicine

5.3.1 Milieu de base

5.3.1.1 Composition

Extrait de levure	5 g
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20 g
Agar-agar	8 g à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.3.1.2 Préparation

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6 à 25 °C.

Répartir le milieu gélosé dans des récipients appropriés (6.6).

Stériliser pendant 10 min à l'autoclave (6.1) réglé à 115 °C.

5.3.2 Solution d'oxytétracycline

5.3.2.1 Composition

Oxytétracycline (C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₄)	50 mg
Eau	25 ml

5.3.2.2 Préparation

Dissoudre l'oxytétracycline dans l'eau et stériliser la solution par filtration.

5.3.3 Solution de gentamicine

5.3.3.1 Composition

Gentamicine	25 mg ¹⁾
Eau	25 ml

1) Selon l'indication du fabricant concernant la teneur réelle en gentamicine de la poudre.

5.3.3.2 Préparation

Dissoudre la gentamicine dans l'eau et stériliser la solution par filtration.

5.3.4 Milieu complet

Ajouter 5 ml de solution d'oxytétracycline (5.3.2) et 5 ml de solution de gentamicine (5.3.3) à chaque portion de 100 ml du milieu de base stérile (5.3.1), fondue et maintenue dans un bain d'eau (6.4) réglé à 47 °C.

6 Appareillage et verrerie

NOTE 2 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, en particulier, ce qui suit.

6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)

L'autoclave peut être soit autonome ou faire partie d'un ensemble pour la préparation et la répartition des milieux.

Voir l'ISO 7218.

6.2 Mélangeur, basé sur le principe d'une rotation centralisé du contenu du tube (par exemple de type Vortex), permettant de mélanger dans un tube de dimensions appropriées 1 ml ou 2 ml d'échantillon avec 9 ml ou 18 ml de diluant afin d'obtenir une suspension homogène.

6.3 Étuve, réglable entre $20\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4 Bain d'eau, réglable à $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.5 pH-mètre, ayant une précision de réglage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .

6.6 Tubes ou flacons de culture

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

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

6.8 Boîtes de Petri, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 3100-1[2].

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 3100-2.

Débuter l'examen de l'échantillon pour essai dès que possible. Il peut être conservé, si nécessaire à une température de 0 °C à $+2\text{ °C}$, mais pas plus de 24 h.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Préparer la suspension mère et les dilutions conformément à l'ISO 6887.

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.8). Transférer, dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette stérile (6.7), 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 Répéter les opérations décrites en 9.2.1 avec les dilutions suivantes.

9.2.3 Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 15 ml du milieu gélosé à l'extrait de levure, au glucose et à l'oxytétracycline/gentamicine (5.3) fondu et maintenu à 47 °C dans le bain d'eau (6.4), provenant d'un flacon de culture (6.6). Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de l'échantillon pour essai 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 et horizontale.

9.2.4 Retourner les boîtes et les placer à l'étuve (6.3) réglée entre 20 °C et 25 °C .

9.3 Comptage et sélection des colonies

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 dans le rapport d'essai.

Si cela est nécessaire, procéder à un examen microscopique pour distinguer les colonies de levures et moisissures des colonies de bactéries, qui sont généralement de plus petite taille.

10 Expression des résultats

10.1 Cas général

Utiliser les boîtes contenant moins de 150 colonies (voir 9.3).

Calculer le nombre, N , de micro-organismes par gramme ou par millilitre de produit à l'aide de l'équation suivante:

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

où

ΣC est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues;

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution;

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution;

d est le taux de dilution de la première dilution retenue (c'est-à-dire, celle où la concentration de l'échantillon pour essai est la plus élevée).

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédant n'est pas modifié; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédant est augmenté d'une unité. Procéder de proche en proche jusqu'à ce que l'on ait deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat le nombre de micro-organismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits), exprimé comme étant un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

EXEMPLE

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

- à la première dilution (10^{-2}): 83 et 97 colonies;
- à la seconde dilution (10^{-3}): 33 et 28 colonies.

Par suite

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

$$= \frac{241}{0,022} = 10\,954$$

En arrondissant le résultat comme spécifié, on obtient 11 000 ou $1,1 \times 10^4$ levures et moisissures par millilitre ou par gramme de produit.

10.2 Estimation des petits nombres

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), contiennent moins de 15 colonies, faire la moyenne arithmétique y des colonies comptées sur les deux boîtes.

Exprimer le résultat sous la forme:

— pour les produits liquides: nombre estimé de levures et moisissures par millilitre

$$N_E = y$$

— pour les autres produits: nombre estimé de levures et moisissures par gramme

$$N_E = y/d$$

ou d est le taux de dilution de la suspension mère.

10.3 Aucune colonie

S'il n'y a pas de colonie sur les boîtes au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides), le nombre de levures et moisissures par millilitre de produit doit être reporté comme inférieur à 1.

S'il n'y a pas de colonie sur les boîtes au niveau de la suspension mère (produits solides), le nombre de levures et moisissures par gramme de produit doit être reporté comme inférieur à 10.

11 Fidélité

Pour des raisons d'ordre uniquement statistique, dans 95 % des cas, les limites de confiance de la méthode par comptage des colonies varient de ± 16 % à ± 52 % (voir référence [3]); pour des dénombrements inférieurs à 15 colonies par boîte, les limites de confiance sont données dans l'annexe A. En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées et, en particulier, entre les résultats obtenus par différents opérateurs.

12 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer

- la méthode selon laquelle l'échantillonnage a été effectué, si elle est connue;
- la méthode utilisée ainsi que le nombre de jours d'incubation;
- le (les) résultat(s) d'essai obtenu(s); et

— si la répétabilité a été vérifiée, le résultat final cité qui a été obtenu.

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 le (les) résultat(s) d'essai.

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13681:1995](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/db663acd-fc41-45eb-850e-flf7786a81e/iso-13681-1995)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/db663acd-fc41-45eb-850e-flf7786a81e/iso-13681-1995>

Annexe A (normative)

Limites de confiance des estimations des petits nombres de colonies

Les limites de confiance au niveau 95 % des estimations des petits nombres, lorsque le nombre de colonies retenues sur les boîtes est inférieur à 15, sont données dans le tableau A.1.

Tableau A.1

Nombre de colonies ¹⁾	Nombre de micro-organismes	Limites de confiance au niveau 95 %		Pourcentage d'erreur pour la limite ²⁾	
		inférieure	supérieure	inférieure	supérieure
1	1	< 1	3	- 97	+ 457
2	1	< 1	4	- 88	+ 261
3	2	< 1	4	- 79	+ 192
4	2	1	5	- 73	+ 156
5	2	1	6	- 68	+ 133
6	3	1	6	- 63	+ 118
7	4	2	7	- 60	+ 106
8	4	2	8	- 57	+ 97
9	4	2	9	- 54	+ 90
10	5	2	9	- 52	+ 84
11	6	3	10	- 50	+ 79
12	6	3	10	- 48	+ 75
13	6	3	11	- 47	+ 71
14	7	4	12	- 45	+ 68
15	8	4	12	- 44	+ 65
16	8	5	13	- 43	+ 62
17	8	5	14	- 42	+ 60
18	9	5	14	- 41	+ 58
19	10	6	15	- 40	+ 56
20	10	6	15	- 39	+ 54
21	10	6	16	- 38	+ 53
22	11	7	17	- 37	+ 51
23	12	7	17	- 36	+ 50
24	12	8	18	- 36	+ 49
25	12	8	18	- 35	+ 48
26	13	8	19	- 35	+ 47
27	14	9	20	- 34	+ 46
28	14	9	20	- 34	+ 45
29	14	9	21	- 33	+ 44
30	15	10	21	- 32	+ 43

1) Comptées sur deux boîtes de Petri.
2) Par rapport au nombre de micro-organismes (colonne 2).

Annexe B (informative)

Bibliographie

- [1] ISO 7954:1987, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des levures et moisissures — Technique par comptage des colonies à 25 °C.*
- [2] ISO 3100-1:1991, *Viandes et produits à base de viande — Échantillonnage et préparation des échantillons pour essai — Partie 1: Échantillonnage.*
- [3] COWELL, N.D. et MORISETTI, M.D., *J. Sci. Fd. Agric.*, **20**, 1969, p. 573.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 13681:1995](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/db663acd-fc41-45eb-850e-f1f7786a81e/iso-13681-1995)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/db663acd-fc41-45eb-850e-f1f7786a81e/iso-13681-1995>