

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
13721

Première édition  
1995-12-15

---

---

**Viande et produits à base de viande —  
Dénombrement des bactéries lactiques —  
Technique par comptage des colonies**

**à 30 °C**  
**STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

*Meat and meat products — Enumeration of lactic acid bacteria —  
Colony-count technique at 30 °C*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f53754b8-7c0d-43ee-b04a-0c988f08ccb7/iso-13721-1995>



Numéro de référence  
ISO 13721:1995(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 13721 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 6, *Viande et produits à base de viande*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f53754b8-7c0d-43ec-b04a->

L'annexe A de la présente Norme internationale 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

# Viande et produits à base de viande — Dénombrement des bactéries lactiques — Technique par comptage des colonies à 30 °C

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour le dénombrement des bactéries lactiques présentes dans les viandes et produits à base de viande, y compris la volaille, par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation aérobie à 30 °C pendant 3 jours.

## 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:—<sup>1)</sup>, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.*

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

## 3 Définition

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

**3.1 bactéries lactiques:** Bactéries qui, à 30 °C, forment des colonies en milieu sélectif solide (milieu MRS à pH 5,7) lorsque l'essai est effectué dans les conditions prescrites par la présente Norme internationale.

## 4 Principe

**4.1** Préparation de deux boîtes de Petri, à l'aide de gélose MRS de pH 5,7. Ensemencement des boîtes avec une quantité définie de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou avec une quantité définie de suspension mère dans les autres cas.

**4.2** Ensemencement d'autres paires de boîtes, dans les mêmes conditions, en utilisant les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation de ces boîtes à 30 °C pendant 72 h.

**4.3** Calcul du nombre de bactéries lactiques par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Petri sélectionnées.

## 5 Diluant et milieu de culture

### 5.1 Généralités

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

### 5.2 Diluant

Voir l'ISO 6887.

### 5.3 Milieu de culture (milieu MRS) à pH 5,7

(voir référence [1])

NOTE 1 L'utilisation de milieux disponibles dans le commerce est permise, toutefois, l'attention est attirée sur le fait que des variations importantes de la composition peuvent être observées entre des produits provenant de différents fabricants.

#### 5.3.1 Composition

Peptone	10,0 g
Extrait de viande	8,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Citrate de triammonium [(NH <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ]	2,0 g
Acétate de sodium (CH <sub>3</sub> COONa)	5,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté (MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O)	0,05 g
Monohydrogénophosphate de potassium (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2,0 g
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20,0 g
Monooléate de sorbitol (Tween 80)	1,0 g
Agar-agar	12 g à 18 g <sup>1)</sup>
Eau	1 000 ml

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

#### 5.3.2 Préparation

**5.3.2.1** Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant à ébullition.

Ajuster le pH (6.7), à l'aide d'acide chlorhydrique (solution à environ 1 mol/l), de sorte qu'après stérilisation, il soit de 5,7 à 25 °C.

Répartir le milieu dans des flacons de 300 ml de capacité maximale.

Stériliser pendant 15 min à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C. Si le milieu doit être utilisé extemporanément, le refroidir à 47 °C dans le bain d'eau (6.5) avant utilisation.

Dans le cas contraire, avant de commencer l'examen microbiologique et afin d'éviter toute attente au moment de couler le milieu, le faire fondre complètement dans un bain d'eau bouillante (6.6), puis le refroidir à 47 °C dans le bain d'eau (6.5).

**5.3.2.2** Si une contamination importante par des levures est à craindre (par exemple dans les saucissons secs), ajouter de l'acide sorbique au milieu MRS comme suit.

Dissoudre 1,4 g d'acide sorbique dans environ 10 ml d'une solution à 1 mol/l d'hydroxyde de sodium. Ajuster le pH à 5,8 et stériliser par filtration. Ajouter cette solution à 1 000 ml de gélose MRS stérilisée. Le pH final du milieu devrait être de 5,7.

## 6 Appareillage et verrerie

NOTE 2 Le matériel à usage unique est permis 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)

Voir l'ISO 7218.

### 6.2 Étuve, réglable à 25 °C ± 1 °C.

**6.3 Boîtes de Petri**, en verre ou en matière plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

**6.4 Pipettes à écoulement total**, à large ouverture, de 1 ml de capacité nominale, graduées en 0,1 ml.

**6.5 Bain d'eau**, ou appareillage similaire, réglable à 47 °C ± 2 °C.

**6.6 Bain d'eau bouillante.**

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

## 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].

Stocker l'échantillon, si nécessaire, de façon à éviter toute détérioration ou modification de sa composition.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

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

## 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

NOTE 3 L'ensemencement en surface en combinaison avec l'incubation dans des conditions anaérobies ou microaérobies peut être utilisé à la place de la méthode par ensemencement dans la masse décrite. Des jarres étanches peuvent être utilisées pour obtenir les conditions appropriées.

**9.2.1** Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.3). À l'aide d'une pipette stérile (6.4), transférer dans chacune de ces boîtes, 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer dans chacune de ces boîtes, 1 ml de la première dilution décimale ( $10^{-1}$ ) de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère ( $10^{-2}$ ) dans le cas d'autres produits.

Répéter les opérations avec les dilutions suivantes, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, pour chaque dilution décimale.

NOTE 4 Si des nombres élevés de bactéries lactiques sont attendus, préparer uniquement les dilutions nécessaires pour obtenir le domaine de colonie correct (9.3).

**9.2.2** Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 15 ml du milieu MRS (5.3) préparé puis refroidi à environ 47 °C dans le bain d'eau (6.5). Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution à  $10^{-1}$  dans le cas d'un produit liquide) et le moment où le milieu (5.3) est coulé dans les boîtes, ne doit pas dépasser 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu par des mouvements horizontaux et laisser le mélange se so-

lidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

**9.2.3** Retourner les boîtes ainsi préparées et les incuber à l'étuve (6.2) réglée à 25 °C pendant  $72 \text{ h} \pm 3 \text{ h}$ .

### 9.3 Comptage et sélection des colonies

Au terme de la période spécifiée (voir 9.2.3), compter les colonies sur chaque boîte. Retenir les boîtes contenant moins de 300 colonies à deux dilutions successives.

## 10 Expression des résultats et mode de calcul

**10.1** Calculer le nombre,  $N$ , de bactéries lactiques présentes dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de l'équation suivante:

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

où

$\sum a$  est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies;

$V$  est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

$n_1$  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 correspondant à la première dilution retenue.

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 bactéries lactiques par millilitre (produit liquide) ou par gramme (autre produit), exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

## EXEMPLE

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} =$$

$$= \frac{422}{0,022} = 19\,182$$

Arrondir à deux chiffres significatifs, soit 19 000 ou  $1,9 \times 10^4$  bactéries lactiques par gramme de produit.

**10.2** Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autre produit) contiennent moins de 15 colonies, calculer la moyenne arithmétique  $y$  des colonies comptées sur deux boîtes.

Exprimer le résultat comme suit:

— pour les produits liquides: nombre estimé de bactéries lactiques par millilitre:  $N_E = y$

— pour les autres produits: nombre estimé de bactéries lactiques par gramme:  $N_E = y \times \frac{1}{d}$

où  $d$  est le taux de dilution de la suspension mère.

**10.3** Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autre produit), ne contiennent aucune colonie, exprimer le résultat comme suit:

— moins de 1 bactérie lactique par millilitre (produit liquide)

— moins de  $1 \times \frac{1}{d}$  bactérie lactique par gramme (autre produit)

où  $d$  est le taux de dilution de la suspension mère.

## 11 Limites de confiance

Pour les calculs des intervalles de confiance, voir l'ISO 7218.

## 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;

— 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.

## **Annexe A** (informative)

### **Bibliographie**

- [1] Pharmacopée des milieux de culture pour la microbiologie des aliments: gélose de De Man, Rogosa et Sharpe avec acide sorbique (gélose MRS-S). *Int. J. Food Microbiol.*, **5**, 1987, pp. 230-232.
- [2] ISO 3100-1:1991, *Viandes et produits à base de viande — Échantillonnage et préparation des échantillons pour essai — Partie 1: Échantillonnage.*

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

[ISO 13721:1995](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f53754b8-7c0d-43ee-b04a-0c988f08ccb/iso-13721-1995)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f53754b8-7c0d-43ee-b04a-0c988f08ccb/iso-13721-1995>

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

ISO 13721:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f53754b8-7c0d-43ee-b04a-0c988f08ccb/iso-13721-1995>

---

---

**ICS 07.100.30; 67.120.10**

**Descripteurs:** produit agricole, produit alimentaire, produit animal, viande, produit à base de viande, essai, analyse microbiologique, comptage, bactérie, bactérie lactique, comptage des bactéries.

Prix basé sur 5 pages

---

---