

NORME  
INTERNATIONALE

**ISO**  
**13722**

Première édition  
1996-12-15

---

---

**Viande et produits à base de viande —  
Dénombrement des *Brochothrix*  
*thermosphacta* — Technique par  
comptage des colonies**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Meat and meat products — Enumeration of Brochothrix thermosphacta —  
Colony-count technique*

ISO 13722:1996

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ee68f956-8278-42fa-af5d-2301c4464a9a/iso-13722-1996>



Numéro de référence  
ISO 13722:1996(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 13722 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 de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

ISO 13722:1996  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ce681956-8278-42fa-af5d-2301c4464a9a/iso-13722-1996>

© ISO 1996

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 *Brochothrix thermosphacta* — Technique par comptage des colonies

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour le dénombrement des *Brochothrix thermosphacta* présents dans tous les types de viande et produits à base de viande, y compris la volaille, par une technique de comptage des colonies.

## 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 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 7218:1996, *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 *Brochothrix thermosphacta*:** Bactéries Gram-positives qui forment des colonies caractéristiques à réaction oxydase négative sur un milieu sélectif solide gélosé au sulfate de streptomycine, acétate de thallium et actidione (STAA) lorsque l'essai est effectué dans les conditions prescrites par la présente Norme internationale.

## 4 Principe

**4.1** Ensemencement en surface sur un milieu de culture sélectif solide, coulé dans des boîtes de Petri avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

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

**4.2** Incubation des boîtes entre 22 °C et 25 °C pendant 48 h ± 4 h.

**4.3** Soumission des colonies à un test de confirmation.

**4.4** À partir du nombre de colonies confirmées, calcul du nombre de *Brochothrix thermosphacta* par millilitre ou par gramme d'échantillon à partir des colonies obtenues sur les boîtes à des niveaux de dilutions choisis pour donner le résultat le plus fiable (voir 9.3).

## 5 Diluants, milieux de culture et réactifs

### 5.1 Généralités

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

### 5.2 Diluants

Pour la préparation des dilutions, voir l'ISO 6887.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 5.3 Milieu sélectif solide: gélose au sulfate de streptomycine, acétate de thallium et actidione (STAA) (voir référence [2])

ISO 13722:1996  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ee68f956-8278-42fa-af5d-2301c4464a9a/iso-13722-1996>

#### 5.3.1 Milieu de base

##### 5.3.1.1 Composition

Peptone	20,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Glycérol	15,0 g
Monohydrogénophosphate de potassium (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1,0 g
Sulfate de magnésium heptahydrate (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	1,0 g
Agar-agar	9 g à 18 g <sup>1)</sup>
Eau	900 ml

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

##### 5.3.1.2 Préparation

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

Ajouter le pH, de sorte, qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Stériliser pendant 15 min à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C.

### 5.3.2 Solution de sulfate de streptomycine

#### 5.3.2.1 Composition

Sulfate de streptomycine	1,0 g
Eau	100 ml

#### 5.3.2.2 Préparation

Dissoudre le sulfate de streptomycine dans l'eau. Stériliser par filtration.

### 5.3.3 Solution d'actidione

**AVERTISSEMENT** — L'actidione et l'acétate de thallium sont tous deux toxiques. Prendre les précautions appropriées pour prévenir toute contamination de l'opérateur et de l'environnement lors de l'utilisation de ces produits chimiques et de leurs solutions.

#### 5.3.3.1 Composition

Actidione (cycloheximide)	150 mg
Eau	90 ml

#### 5.3.3.2 Préparation

Dissoudre l'actidione dans l'eau. Stériliser par filtration.

ISO 13722:1996

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ee68f956-8278-42fa-af5d-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ee68f956-8278-42fa-af5d-2301c4464a9a/iso-13722-1996)

### 5.3.4 Solution d'acétate de thallium

2301c4464a9a/iso-13722-1996

#### 5.3.4.1 Composition

Acétate de thallium	250 mg
Eau	100 ml

#### 5.3.4.2 Préparation

Dissoudre l'acétate de thallium dans l'eau. Stériliser par filtration.

### 5.3.5 Milieu complet

#### 5.3.5.1 Composition

Milieu de base (5.3.1)	900 ml
Solution de sulfate de streptomycine (5.3.2)	50 ml
Solution d'actidione (5.3.3)	30 ml
Solution d'acétate de thallium (5.3.4)	20 ml

### 5.3.5.2 Préparation

Faire fondre le milieu de base, puis le refroidir dans le bain d'eau (6.9) réglé à 47 °C. Dans des conditions stériles, chauffer à 47 °C une portion aliquote des autres solutions (5.3.2, 5.3.3 et 5.3.4) dans le bain d'eau. Ajouter les volumes stipulés (5.3.5.1) de chacune des solutions au milieu refroidi, en mélangeant bien entre chaque addition.

### 5.3.6 Préparation des boîtes de gélose pour le dénombrement

Couler le milieu complet (5.3.5) par quantités de 15 ml à 20 ml dans des boîtes de Petri stériles (6.4). Laisser se solidifier.

Les boîtes peuvent être conservées avant séchage entre 0 °C et 5 °C jusqu'à 1 semaine.

Immédiatement avant l'utilisation, sécher les boîtes de gélose, de préférence avec le couvercle enlevé et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans l'étuve (6.2) réglée entre 37 °C et 50 °C, jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu. Ne pas les sécher davantage. Le séchage des boîtes contenant le milieu de culture gélosé peut aussi être réalisé sous hotte à flux laminaire pendant 30 min avec le couvercle entrouvert ou toute une nuit avec le couvercle en place.

Des boîtes de Petri prêtes à l'emploi sont disponibles dans le commerce. Les conserver et les utiliser selon les instructions du fabricant.

## 5.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase

### 5.4.1 Composition

Dichlorhydrate de <i>N,N,N',N'</i> -Tétraméthyl- <i>p</i> -phénylène diamine	1,0 g
Eau distillée	100 ml

### 5.4.2 Préparation

ISO 13722:1996

Dissoudre le réactif dans de l'eau froide. Le réactif doit être préparé immédiatement avant utilisation.

Des disques ou des languettes du commerce peuvent être utilisé(e)s. Dans ce cas, suivre les recommandations du fabricant.

## 6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

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

Voir l'ISO 7218.

### 6.2 Étuve ou enceinte de séchage, ventilée par convection, réglable entre 37 °C ± 1 °C et 50 °C ± 1 °C.

### 6.3 Étuve, réglable entre 22 °C ± 1 °C et 25 °C ± 1 °C.

### 6.4 Boîtes de Petri, en verre ou en matière plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

**6.5 Pipettes graduées à écoulement total**, à large ouverture, de 10 ml et 1 ml de capacités nominales, graduées en 0,1 ml.

**6.6 Poires en caoutchouc**, ou autre dispositif de sécurité pour l'utilisation des pipettes graduées.

**6.7 Fioles ou flacons**, de capacités appropriées.

**6.8 Étaleurs** du type crosses de hockey, en verre, d'environ 3,5 mm de diamètre et 20 cm de longueur, coudées à angle droit à environ 3 cm de l'une de leurs extrémités et dont les extrémités coupées ont été arrondies par chauffage.

Des étaleurs jetables en plastique peuvent aussi être utilisés.

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

**6.10 Appareil de comptage de colonies**, comportant un système d'éclairage avec fond noir et un compteur numérique mécanique ou électronique.

**6.11 pH-mètre**, précis à  $\pm 0,1$  unité de pH à  $25\text{ °C}$ .

**6.12 Fils**, en platine, ou **baguettes**, en verre ou en plastique, d'environ 3 mm de diamètre.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

## 7 Échantillonnage

ISO 13722:1996

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ee68f956-8278-42fa-af5d-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ee68f956-8278-42fa-af5d-7381e446419a/iso-13722-1996)

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 prescrite dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 3100-1.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

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

Débuter l'examen de l'échantillon prétraité dès que possible. Il peut être conservé, si nécessaire, à une température comprise entre  $0\text{ °C}$  et  $+ 2\text{ °C}$ , pendant 24 h au maximum.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir l'ISO 6887 et l'ISO 3100-2.

## 9.2 Ensemencement et incubation

**9.2.1** Transférer, à l'aide d'une pipette stérile (6.5), 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits, à la surface de chacune des deux boîtes de gélose (5.3.6).

Répéter l'opération avec les dilutions décimales suivantes.

**9.2.2** Étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface de la boîte de gélose en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur (6.8). Utiliser un étaleur stérile pour chaque boîte. Laisser les boîtes avec leur couvercle pendant environ 15 mm à la température ambiante pour permettre à l'inoculum d'être absorbé par la gélose.

**9.2.3** Retourner les boîtes préparées (9.2.2) et les incuber pendant  $48 \text{ h} \pm 4 \text{ h}$  à l'étuve (6.3) réglée entre  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  et  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## 9.3 Comptage des colonies

Après la période d'incubation (voir 9.2.3), compter à l'aide de l'appareil de comptage de colonies (6.10), les colonies caractéristiques sur chaque boîte contenant de 15 à 300 colonies. Les colonies caractéristiques sont brillantes, rondes ou circulaires, de 0,75 mm de diamètre ou plus, sont de couleur blanc cassé et sont à réaction oxydase négative (voir 9,4).

## 9.4 Confirmation

Il est possible que des *Pseudomonadaceae* se développent sur la gélose STAA (5.3). Ils peuvent être différenciés des *B. thermosphacta* en réalisant une recherche de l'oxydase, comme suit.

Humecter un morceau de papier filtre avec le réactif pour la recherche de l'oxydase (5.4). Prélever un échantillon de la culture bactérienne obtenue à partir de la gélose STAA à l'aide d'un fil en platine ou d'une baguette en verre ou en plastique (6.12) (un fil en nickel/chrome donne de faux positifs) et le déposer sur le papier filtre humecté.

Les colonies à réaction oxydase positive deviennent violettes dans les 15 s. Les *B. thermosphacta* ont une réaction négative à l'oxydase.

## 10 Expression des résultats

### 10.1 Comptage des *B. thermosphacta*

**10.1.1** Si au moins 80 % des colonies sélectionnées sont confirmées (9.4), prendre comme nombre de *B. thermosphacta* le nombre donné par le comptage en 9.3.

**10.1.2** Dans tous les cas, calculer le nombre de *B. thermosphacta* à partir du pourcentage de *B. thermosphacta* obtenu en 9.3 qui a été confirmé (9.4).

Arrondir le résultat à un nombre entier de colonies.

### 10.2 Mode de calcul

#### 10.2.1 Cas général: Boîtes contenant entre 15 et 300 colonies caractéristiques

Retenir les boîtes contenant au plus 300 colonies caractéristiques au niveau de deux dilutions successives. Il est nécessaire qu'une des boîtes renferme au moins 15 colonies caractéristiques.



Calculer le nombre  $N$  de *B. thermosphacta* par millilitre ou par gramme de produit, selon le cas, 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 caractéristiques comptées sur toutes les boîtes retenues 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 deuxième dilution;

$d$  est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

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 qu'on ait deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat le nombre de *B. thermosphacta* par millilitre (produit liquide) ou par gramme (autres produits), exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

#### EXEMPLE

Le dénombrement de *B. thermosphacta* entre 22 °C et 25 °C a donné les résultats suivants:

— à la première dilution retenue: 83 et 97 colonies caractéristiques;

— à la deuxième dilution retenue: 13 et 8 colonies caractéristiques.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2) d} = \frac{83 + 97 + 13 + 8}{0,1[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-1}} = \frac{201}{0,022} = 9\,136$$

En arrondissant le résultat tel que prescrit ci-dessus, le résultat est 9 100 ou  $9,1 \times 10^3$  *B. thermosphacta* par millilitre ou par gramme de produit.

#### 10.2.2 Estimation des petits nombres

Si les deux boîtes au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) ne contiennent pas de colonie caractéristique, exprimer le résultat comme suit:

- moins de 15 *B. thermosphacta* par millilitre (produits liquides);
- moins de  $15 \times 1/d$  *B. thermosphacta* par gramme (autres produits),

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

Si deux boîtes au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) ne contiennent pas de colonie caractéristique, exprimer le résultat comme suit:

- moins de 1 *B. thermosphacta* par millilitre (produits liquides), ou
- moins de  $1/d$  *B. thermosphacta* par gramme (autres produits),

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