

NORME
INTERNATIONALE

ISO
13720

Première édition
1995-12-15

**Viande et produits à base de viande —
Dénombrement des *Pseudomonas* spp.**

iTeh STANDARD PREVIEW
Meat and meat products — Enumeration of Pseudomonas spp.
(standards.iteh.ai)

ISO 13720:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2397df43-ddeb-4c94-8d3f-c2d3c3b10f24/iso-13720-1995>



Numéro de référence
ISO 13720:1995(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 13720 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/2397df43-ddeb-4c94-8d3f-c2d5c5b1024/iso-13720-1995>

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 *Pseudomonas* spp.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale décrit une méthode pour le dénombrement des *Pseudomonas* spp. présents dans la viande et les produits à base de viande, et les volailles.

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.

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

3.1 *Pseudomonas*: Bactéries du genre *Pseudomonas*, qui, à 25 °C, forment des colonies dans un milieu gélosé à la cétrimide, fucidine et à la céphaloridine (CFC) lorsque l'essai est effectué conformément à la méthode prescrite dans la présente Norme internationale.

4 Principe

4.1 Ensemencement en surface d'un milieu sélectif solide, coulé dans deux séries de boîtes, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit concerné est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère, à raison de deux boîtes par dilution.

4.2 Incubation aérobie des boîtes à 25 °C pendant 48 h.

4.3 Calcul du nombre de *Pseudomonas* par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques obtenues dans des boîtes choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif, et confirmées par la recherche de l'oxydase et par le développement sur la gélose de Kligler.

5 Diluant, milieu de culture et réactif

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 la cétrimide, fucidine et à la céphaloridine (CFC) [1]

5.3.1 Milieu de base

5.3.1.1 Composition

Peptone de gélatine	16,0 g
Hydrolysate de caséine	10,0 g
Sulfate de potassium (K ₂ SO ₄)	10,0 g
Chlorure de magnésium (MgCl ₂)	1,4 g
Agar-agar	12,0 g à 18,0 g ¹⁾
Eau	1 000 ml

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

5.3.1.2 Préparation

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir le milieu par quantités de 100 ml dans des flacons de capacité appropriée.

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

5.3.2 Solutions d'inhibiteur

Ne pas conserver les solutions plus de 7 jours au réfrigérateur.

5.3.2.1 Solution de cétrimide: solution A

5.3.2.1.1 Composition

Cétrimide ¹⁾	0,1 g
Eau	100 ml

1) Mélange consistant principalement en bromure de tétradécyltriméthylammonium et de petites quantités de bromure de dodécyltriméthylammonium et de bromure de cétrimonium.

5.3.2.1.2 Préparation

Dissoudre la cétrimide dans l'eau.

Stériliser par filtration.

5.3.2.2 Solution de fucidine: solution B

5.3.2.2.1 Composition

Fucidine (C ₃₁ H ₄₇ NaO ₆)	0,1 g
Eau	100 ml

5.3.2.2.2 Préparation

Dissoudre la fucidine dans l'eau.

Stériliser par filtration.

5.3.2.3 Solution de céphaloridine: solution C

5.3.2.3.1 Composition

Céphaloridine (C ₁₉ H ₁₇ N ₃ O ₄ S ₂)	0,1 g
Eau	100 ml

5.3.2.3.2 Préparation

Dissoudre la céphaloridine dans l'eau.

Stériliser par filtration.

5.3.3 Milieu complet

5.3.3.1 Composition

Milieu de base	100 ml
Solution A	1 ml
Solution B	1 ml
Solution C	5 ml

5.3.3.2 Préparation

Dans des conditions aseptiques, ajouter les solutions d'inhibiteur au milieu de base fondu et maintenu à 47 °C et mélanger soigneusement.

5.3.4 Préparation des boîtes de gélose CFC

Répartir le milieu complet par quantités d'environ 15 ml dans des boîtes de Petri stériles (6.9). Laisser se solidifier.

Immédiatement avant l'emploi, sécher les boîtes de milieu gélosé, de préférence avec le couvercle enlevé et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, à l'étuve (6.2) réglée entre 35 °C et 55 °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 couvercle entrouvert, ou toute une nuit avec couvercle en place.

Si elles ont été préparées à l'avance, les boîtes de milieu gélosé non séchées ne doivent pas être conservées plus d'1 mois entre 0 °C et 5 °C.

5.4 Gélose nutritive

5.4.1 Composition

Extrait de viande	3,0 g
Peptone	5,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Agar-agar	12,0 g à 18,0 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

5.4.2 Préparation

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des flacons de 500 ml de capacité maximale.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 20 min.

5.4.3 Préparation des boîtes de gélose nutritive

Répartir le milieu récemment préparé, par quantités d'environ 15 ml, dans des boîtes de Petri de 90 mm de diamètre (6.9) et laisser se solidifier.

Immédiatement avant l'emploi, sécher les boîtes de milieu gélosé comme décrit en 5.3.4.

Si elles ont été préparées à l'avance, les boîtes de milieu gélosé non séchées ne doivent pas être conservées plus d'1 mois entre 0 °C et 5 °C.

5.5 Milieu de Kligler

5.5.1 Composition

Extrait de viande de bœuf	3,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Peptone pancréatique de caséine	20,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Lactose	10,0 g
Glucose	1,0 g
Sulfate de fer(II) ammoniacal hexahydraté [(NH ₄) ₂ SO ₄ ,FeSO ₄ ,6H ₂ O]	0,5 g
Thiosulfate de sodium pentahydraté (Na ₂ S ₂ O ₃ ,5H ₂ O)	0,5 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar-agar	12,0 g à 18,0 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

5.5.2 Préparation

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir le milieu par quantités de 10 ml dans des tubes (6.7).

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

Laisser reposer en position inclinée de façon à obtenir un culot d'environ 2,5 cm de profondeur.

ATTENTION — Ce milieu ne doit pas avoir été préparé plus de 7 à 8 jours avant emploi. Sinon, il doit être fondu et régénéré dans un bain d'eau bouillante, puis solidifié à nouveau en bonne position.

5.6 Réactif pour la recherche de l'oxydase

5.6.1 Composition

Dichlorhydrate de <i>N,N,N,N</i> - tétraméthyl- <i>p</i> -phénylènediamine	1,0 g
Eau	100 ml

5.6.2 Préparation

Dissoudre le réactif dans l'eau immédiatement avant usage.

6 Appareillage et verrerie

Voir l'ISO 7218.

Toute la verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées. Voir également l'ISO 6887.

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

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

Voir l'ISO 7218.

6.2 Enceinte de séchage ou étuve ventilée (pour le séchage des boîtes de gélose), réglable entre $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $55\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, ou hotte à flux laminaire

6.3 Étuve, réglable à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

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

6.5 pH-mètre, précis à ± 1 unité de pH à 25 °C .

6.6 Anses bouclées, en platine iridié, en nickel-chrome ou en matière plastique stérile d'environ 3 mm de diamètre, et fils en même matière, ou baguette en verre.

NOTE 1 Une anse bouclée en nickel-chrome ne convient pas pour la recherche de l'oxydase (voir 9.4.2.1).

6.7 Tubes à essai et flacons, de capacités appropriées.

6.8 Pipettes graduées à écoulement total, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, de 1 ml de capacité nominale, graduées en 0,1 ml, et dont l'orifice d'écoulement a un diamètre de 2 mm à 3 mm.

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

6.10 Étaleurs, en verre ou en matière plastique, par exemple baguettes en verre en forme de crosse de hockey d'environ 3,5 mm de diamètre, de 20 cm de longueur, coudées à angle droit à 3 cm environ d'une des extrémités et dont les bords de coupe ont été régularisés par chauffage.

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échan-

tillon 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 recommandée d'échantillonnage est donnée dans l'ISO 3100-1^[2].

Si nécessaire, conserver l'échantillon dans des conditions telles qu'il ne subisse aucune détérioration ou modification dans sa composition.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Voir l'ISO 3100-2.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

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

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 Prendre deux boîtes de gélose CFC (5.3.4). À l'aide d'une pipette stérile (6.8), transférer, dans chacune des boîtes, 0,1 ml de la suspension mère.

Prendre deux autres boîtes de gélose CFC. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer, dans chacune des boîtes, 0,1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère (10^{-2}).

Répéter ces opérations avec les dilutions suivantes, en utilisant une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution décimale.

9.2.2 Répartir le liquide sur la surface de la boîte gélosée avec un étaleur stérile (6.10) jusqu'à ce que la surface soit complètement sèche.

9.2.3 Retourner les boîtes ainsi préparées et refroidies à 25 °C , et les incubent à l'étuve (6.3) réglée à 25 °C pendant 48 h.

9.3 Comptage et sélection des colonies

Après la période d'incubation spécifiée, procéder au comptage des colonies sur chaque boîte et retenir les boîtes contenant de 15 à 300 colonies.

Prélever, au hasard, cinq colonies sur chacune des boîtes retenues.

9.4 Confirmation

9.4.1 Subculture

Ensemencer en stries, sur des boîtes de gélose nutritive (5.4.3) chacune des colonies sélectionnées en vue de la confirmation.

Incuber ces boîtes à 25 °C pendant 24 h. Sélectionner une colonie bien isolée à partir de chacune des boîtes incubées pour l'essai de confirmation biochimique (voir 9.4.2).

9.4.2 Confirmation biochimique

9.4.2.1 Recherche de l'oxydase

9.4.2.1.1 Composition

Dichlorhydrate de <i>N,N,N',N'</i> tétraméthyl- <i>p</i> -phénylènediamine	1,0 g
Eau	100 ml

9.4.2.1.2 Préparation

Dissoudre le réactif dans l'eau. Le réactif doit être préparé immédiatement avant usage.

Des disques ou des languettes du commerce peuvent être utilisés. Dans ce cas, suivre les recommandations du fabricant.

9.4.2.1.3 Méthode

Humecter un morceau de papier filtre avec le réactif. Prélever un échantillon de la culture bactérienne obtenue à partir d'un milieu gélosé à l'aide d'un fil en platine ou d'une baguette en verre ou en plastique (le fil en nickel-chrome donne de faux positifs) et le déposer sur le papier filtre humecté.

9.4.2.1.4 Interprétation

Dans le cas de la présence d'oxydase, une couleur violet à pourpre apparaît entre 5 s et 10 s. Si la couleur n'a pas viré après 10 s, la recherche est considérée comme négative.

9.4.2.2 Utilisation des sucres en milieu de Kligler

Ensemencer le culot par piqûre et la pente du milieu (5.5.2) par une seule strie centrale, en utilisant les mêmes colonies qu'en 9.4.2. Incuber à 25 °C pendant 24 h.

9.4.2.3 Interprétation

Sont considérées comme colonies de *Pseudomonas*, celles qui présentent une réaction positive à l'oxydase et qui, ensemencées en milieu de Kligler, présentent un développement uniquement en surface (aérobie).

10 Expression des résultats

10.1 Mode de calcul

Après identification, calculer, pour chacune des boîtes, le nombre de micro-organismes identifiés, *a*, à l'aide de la formule suivante:

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

où

A est le nombre de colonies sélectionnées pour confirmation (5 dans le cas présent);

b est le nombre de colonies répondant aux critères d'identification;

C est le nombre total de colonies dénombrées.

Calculer le nombre *N* de micro-organismes identifiés présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée, pour deux dilutions successives, à l'aide de la formule suivante:

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

où

$\sum a$ est la somme des colonies comptées après identification sur toutes les boîtes retenues;

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

*n*₁ est le nombre des boîtes retenues à la première dilution;

*n*₂ est le nombre des 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 précédent n'est pas modifié; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédent

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 (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.

10.2 Estimation des petits nombres

10.2.1 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, faire la moyenne arithmétique y des colonies comptées sur deux boîtes.

Exprimer le résultat comme suit:

— pour les produits liquides: nombre estimé de micro-organismes par millilitre: $N_E = y$

— pour les autres produits: nombre estimé de micro-organismes par gramme: $N_E = y/d$

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

10.2.2 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 micro-organisme par millilitre (produit liquide)

— moins de $1/d$ micro-organisme par gramme (autre produit)

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

10.3 Limites de confiance

Voir l'ISO 7218.

11 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,
- la durée de l'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.

Annexe A (informative)

Bibliographie

- [1] MEAD, G.C. et ADAMS, B.W. A selective medium for the rapid isolation of *Pseudomonas* associated with poultry meat spoilage. *Br. Poult. Sci.*, **18**, 1977, pp. 661-670.
- [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 13720:1995](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2397df43-ddeb-4c94-8d3f-c2d3c3b10f24/iso-13720-1995)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2397df43-ddeb-4c94-8d3f-c2d3c3b10f24/iso-13720-1995>