

---

---

**Microbiologie des aliments — Méthode  
horizontale pour le dénombrement des  
bactéries sulfito-réductrices se  
développant en conditions anaérobies**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for  
the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic  
conditions*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 15213:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-  
d25648de85f2/iso-15213-2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003)



**PDF — Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 15213:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003>

© ISO 2003

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## 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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

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.

L'ISO 15213 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**  
ISO 15213:2003  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003>

## Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente 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, pourront être utilisées si cela s'avère absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, il convient que tous les efforts soit faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Lors du prochain réexamen périodique de la présente Norme internationale, 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 prescriptions de la présente Norme internationale et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

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

[ISO 15213:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003>

# Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies. Elle est applicable aux

- produits destinés à l'alimentation humaine et animale;
- échantillons d'environnement dans le domaine de la production et de la distribution des aliments.

## 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application 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 6887-1:1999, *Microbiologie des aliments — 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* [ISO 15213:2003](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e->

ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO 7218:1996/Amd.1:2001, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques — Amendement 1*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

## 3 Termes et définitions

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

### 3.1

#### **bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies**

bactéries formant des colonies dénombrables typiques dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale

## 4 Principe

**4.1** Ensemencement dans la masse de deux boîtes de Petri (ou de deux tubes) de milieu au sulfite de fer avec une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai si le produit initial est liquide, ou avec une quantité spécifiée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

## ISO 15213:2003(F)

Préparation de deux autres boîtes (ou tubes) de gélose, dans les mêmes conditions, avec des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

**4.2** Incubation en anaérobiose des boîtes (ou tubes) à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 24 h à 48 h (lecture finale au bout de 48 h), éventuellement à  $50\text{ °C}$  si l'on suspecte la présence de bactéries thermophiles. Dénombrement de colonies caractéristiques de couleur noire. La couleur noire des colonies et des alentours est due à la formation de sulfure de fer(II) résultant de la réaction entre les ions sulfure et les ions trivalents ferriques [Fe(III)] présents dans le milieu.

**4.3** Calcul du nombre de bactéries sulfito-réductrices par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues sur les boîtes (ou tubes).

## 5 Milieu de culture et diluant

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

### 5.1 Gélose pour le dénombrement: gélose au sulfite de fer

#### 5.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	15 g
Digestat enzymatique de soja	5 g
Extrait de levure	5 g
Disulfite de disodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )	1 g
Citrate de fer(III) ammoniacal	1 g
Agar-agar	9 g à 18 g <sup>a</sup>
Eau	1 000 ml

<sup>a</sup> Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

*iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)  
ISO 15213:2003  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/52a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de8512/iso-15213-2003>*

#### 5.1.2 Préparation

Dissoudre les ingrédients dans l'eau en chauffant.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de  $7,6 \pm 0,2$  à  $25\text{ °C}$ .

Verser des portions de 250 ml de milieu dans des flacons de 500 ml.

Si le dénombrement est effectué à l'aide de tubes (6.5), verser 20 ml à 25 ml de milieu dans les tubes. Stériliser à l'autoclave pendant 15 min à  $121\text{ °C}$ .

Désaérer le milieu juste avant son utilisation.

### 5.2 Diluant peptone-sel

Voir l'ISO 6887-1, 5.2.1.

## 6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit.

**6.1 Matériel d'homogénéisation**, pour les échantillons d'aliments solides (voir l'ISO 7218).

**6.2 Bain d'eau**, pouvant être maintenu à une température comprise entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$ .

**6.3 Jarres pour anaérobiose**, dotés d'un équipement permettant de générer une atmosphère anaérobie, et comprenant un système de vérification des conditions anaérobies.

**6.4 Incubateur**, pouvant être maintenu à  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  et, si nécessaire, à  $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**6.5 Tubes à essais**, de dimensions  $16\text{ mm} \times 160\text{ mm}$ , et **foies** ou **flacons** de 500 ml de capacité.

## 7 Échantillonnage

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

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. S'il n'existe aucune Norme internationale spécifique pour l'échantillonnage du produit concerné, il convient que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 6887-1, ou conformément à l'ISO 8261, ou conformément à la Norme internationale spécifique relative au produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il convient que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 9 Mode opératoire

ITeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 9.1 Généralités

Une représentation schématique du mode opératoire est donnée à l'Annexe A.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003>

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

Voir l'ISO 6887-1, l'ISO 8261 ou toute Norme internationale spécifique au produit concerné.

Il peut être nécessaire d'effectuer un traitement thermique de la suspension mère pour éliminer les formes végétatives de bactéries formant des spores et/ou les bactéries non sporulées. Les températures et les temps de chauffage varient selon les besoins, allant de combinaisons produisant un effet de pasteurisation marqué à un effet d'activation des spores par la chaleur (par exemple  $75\text{ °C}$  pendant 20 min) à une ébullition de plusieurs minutes. Dans ce cas, le résultat peut être donné en nombre de spores de bactéries sulfite-réductrices se développant en conditions anaérobies.

### 9.3 Ensemencement

Prendre deux boîtes de Petri stériles. À l'aide d'une pipette stérile, transférer dans chaque boîte 1 ml d'échantillon pour essai si le produit à tester est liquide, ou 1 ml de suspension mère pour les autres produits.

Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer 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 ( $10^{-2}$ ) de la suspension mère pour les autres produits.

Répéter la procédure décrite avec les dilutions suivantes, en utilisant une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution.

Ajouter dans chacune des boîtes de Petri environ 15 ml de gélose au sulfite de fer (5.1) refroidi à l'aide d'un bain d'eau (6.2) à une température comprise entre  $44\text{ °C}$  et  $47\text{ °C}$ . Il convient que le temps écoulé entre l'ensemencement des boîtes de Petri et l'addition du milieu gélosé n'excède pas 15 min. Bien mélanger l'inoculum avec le milieu gélosé à l'aide de mouvements horizontaux, puis laisser le milieu se solidifier.

Après solidification du milieu, verser dans la boîte 5 ml à 10 ml du même milieu, de manière à recouvrir la couche précédente.

Dans le cas où des tubes sont utilisés, inoculer 1 ml de chacune des dilutions dans chacun de deux tubes contenant le milieu gélosé, conservés à une température comprise entre 44 °C et 47 °C. Mélanger délicatement en évitant la formation de bulles d'air, puis laisser le milieu se solidifier à l'aide d'un bain d'eau froide (6.2).

Après solidification du milieu, verser dans chaque tube 2 ml à 3 ml du même milieu, de manière à recouvrir la couche précédente.

#### 9.4 Incubation

Après solidification, incuber les boîtes de Petri dans des jarres pour anaérobiose (6.3) à 37 °C ± 1 °C pendant 24 h à 48 h.

Si l'on suspecte la présence de bactéries thermophiles, préparer une deuxième série de boîtes de Petri (voir 9.3). Incuber ces boîtes à 50 °C ± 1 °C.

Si des tubes sont utilisés, l'incubation dans des jarres pour anaérobiose n'est pas nécessaire.

#### 9.5 Comptage des colonies

Lire les résultats après 24 h et après 48 h, selon le degré de coloration noire et le taux de croissance des micro-organismes. Les colonies noires, éventuellement entourées d'une zone noire, sont dénombrées comme des bactéries sulfito-réductrices.

NOTE 1 Il peut se produire un noircissement diffus et non spécifique du milieu, surtout lorsque l'inoculation est effectuée dans des tubes de gélose au lieu de boîtes de Petri. La croissance des bactéries anaérobies, qui produisent seulement de l'hydrogène (pas de H<sub>2</sub>S), peut également réduire le sulfite présent et provoquer un noircissement général du milieu.

Dénombrer les colonies sulfito-réductrices dans chaque boîte contenant moins de 150 colonies caractéristiques et moins de 300 colonies au total.

Il est possible que les nombres spécifiés ci-dessus soient trop élevés pour les tubes; dans ce cas ne tenir compte que des tubes dans lesquels les colonies sont bien séparées.

NOTE 2 La présente Norme internationale se prête également au dénombrement des seules *Clostridia*. Dans ce cas, après avoir obtenu des colonies caractéristiques, prélever cinq d'entre elles dans chaque boîte utilisée, puis confirmer le genre *Clostridium* au moyen d'essais de confirmation (par exemple essais portant sur le pouvoir respiratoire, sur la formation de spores).

### 10 Expression des résultats et limites de confiance

Voir l'Amendement 1 à ISO 7218:1996.

### 11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer:

- a) tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- b) la méthode d'échantillonnage utilisée, si elle est connue;
- c) la méthode d'essai utilisée (y compris la température d'incubation, l'utilisation de tubes et tout traitement thermique pour détruire les bactéries végétatives);

- d) tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou considérés comme facultatifs, ainsi que les détails sur tout incident éventuel susceptible d'avoir agi sur le(s) résultat(s) d'essai;
- e) les résultats d'essai obtenus.

Par ailleurs, le rapport d'essai doit également préciser si d'autres essais nécessitent d'être menés par un laboratoire de référence ou, si de tels essais ont déjà eu lieu, d'en indiquer les résultats.

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

ISO 15213:2003

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a752a6ca-bbb0-465a-a62e-d25648de85f2/iso-15213-2003>