
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour le dénombrement des
bactéries lactiques mésophiles —
Technique par comptage des colonies
à 30 °C**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the
enumeration of mesophilic lactic acid bacteria — Colony-count technique
at 30 °C*
(standards.iteh.ai)

ISO 15214:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe9e553-b1f4-423c-8eae-3213cf61d940/iso-15214-1998>



Sommaire

Page

1	Domaine d'application	1
2	Références normatives	1
3	Définitions	1
4	Principe	2
5	Diluant et milieu de culture	2
6	Appareillage et verrerie	3
7	Échantillonnage	3
8	Préparation de l'échantillon pour essai	4
9	Mode opératoire	4
10	Expression des résultats	5
11	Limites de confiance	6
12	Rapport d'essai	6
Annexe A (informative) Bibliographie		7

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 15214:1998](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe9e553-b1f4-423c-8eae-3213cf61d940/iso-15214-1998)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe9e553-b1f4-423c-8eae-3213cf61d940/iso-15214-1998>

© ISO 1998

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
Internet iso@iso.ch

Imprimé 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 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 15214 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

[ISO 15214:1998](https://standards.iso.org/iso/15214-1998)

<https://standards.iso.org/iso/15214-1998> L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

Introduction

En raison de la diversité des produits alimentaires, il est possible que cette 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 soient faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Lors du 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 cette 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.

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles — Technique par comptage des colonies à 30 °C

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles viables par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation à 30 °C pendant 3 jours.

NOTE Dans certains produits alimentaires, il existe des bactéries lactiques psychrotrophes ou thermophiles devant être cultivées à des températures différentes de 30 °C. De plus, toutes les bactéries lactiques ne croissent pas sur la gélose MRS à pH 5,7 et certaines ne croissent que faiblement.

La présente Norme internationale est applicable aux produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, avec les quelques restrictions signalées dans l'introduction et dans la note ci-dessus.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

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 6887-1:—¹⁾, *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 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.*

3 Définitions

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

3.1

bactéries lactiques mésophiles

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 spécifiées dans la présente Norme internationale

¹⁾ À publier. (Révision de l'ISO 6887:1983)

4 Principe

4.1 Préparation de deux boîtes de Petri, à l'aide de gélose MRS de pH 5,7. Ensemencement en profondeur, ou éventuellement en surface²⁾, 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 mésophiles (3.1) par gramme ou par millilitre d'échantillon à partir du nombre de colonies obtenues en 4.2 dans les boîtes de Petri sélectionnées, et éventuellement confirmées³⁾.

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 6887-1.

NOTE L'eau peptonée tamponnée ne permet pas toujours une revivification satisfaisante de toutes les bactéries lactiques (voir annexe A, références [1], [2], [3]).

5.3 Milieu de culture: milieu MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) à pH 5,7 (voir la référence [4])

NOTE L'utilisation de milieux prêts à l'emploi disponibles dans le commerce est permise. Toutefois, l'attention est attirée sur le fait que des variations importantes de la composition et du pH peuvent être observées entre des produits provenant de différents fabricants et peuvent ainsi donner des résultats différents de ceux obtenus avec le milieu préconisé dans la présente Norme internationale.

5.3.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	10,0 g
Extrait de viande	10,0 g
Extrait de levure	4,0 g
Citrate de triammonium [(NH ₄) ₃ C ₆ H ₅ O ₇]	2,0 g
Acétate de sodium (CH ₃ COONa)	5,0 g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0,2 g
Sulfate de manganèse tétrahydraté (MnSO ₄ ·4H ₂ O)	0,05 g
Monohydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	2,0 g
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	20,0 g
Monooléate de polyoxyéthylènesorbitane (Tween 80)	1,08 g
Agar-agar	12 g à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml
1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

²⁾ Voir note 1 en 9.2.

³⁾ Voir note 2 en 9.3.

5.3.2 Préparation

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

À l'aide du pH-mètre (6.7), ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $5,7 \pm 0,1^4$ à 25 °C.

Répartir le milieu dans des flacons de capacité appropriée.

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 environ dans le bain d'eau (6.5), ou par tout autre procédé donnant des résultats équivalents (voir l'ISO 7218).

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 environ 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. Stériliser par filtration. Ajouter cette solution à 1 000 ml de gélose MRS stérilisée, préalablement refroidie à environ 47 °C. Le pH final du milieu doit être de $5,7 \pm 0,1$ à 25 °C.

6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9fe9e553-b1f4-423c-8eae-3213cf61d940/iso-15214-1998>

6.2 Étuve, réglable à $30 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

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

6.4 Pipettes graduées à écoulement total, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml.

6.5 Bain d'eau, ou appareillage similaire, réglable à $47 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$.

6.6 Bain d'eau bouillante.

6.7 pH-mètre, ayant une précision de lecture de $\pm 0,01$ unité pH à 25 °C, permettant de réaliser des mesures précises à $\pm 0,1$ unité pH.

7 Échantillonnage

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

⁴⁾ Afin que le pH ne descende pas en dessous de la valeur de 5,6, la tolérance est ici de $\pm 0,1$ et non de $\pm 0,2$ comme d'habitude.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage (voir l'ISO 7218).

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Préparer la suspension mère et les dilutions conformément à l'ISO 6887-1.

9.2 Ensemencement et incubation

NOTE 1 L'ensemencement en surface en combinaison avec une incubation dans des conditions anaérobies ou microaérobies peut être utilisé à la place de la méthode par ensemencement en profondeur décrite ci-après. Des jarres étanches peuvent être utilisées pour obtenir les conditions appropriées.

NOTE 2 Il est également possible d'utiliser une double couche de milieu MRS.

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 de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère 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 Si des nombres élevés de bactéries lactiques sont attendus, il est possible d'ensemencer uniquement les dilutions nécessaires pour pouvoir effectuer le dénombrement selon le mode de calcul (voir 10.1).

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).

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser le mélange se solidifier.

9.2.3 Retourner les boîtes ainsi préparées et les incuber à l'étuve (6.2) réglée à 30 °C pendant 72 h ± 3 h.

Éviter la dessiccation de la gélose pendant l'incubation, afin de ne pas rendre le milieu trop inhibiteur.

9.3 Comptage des colonies

Au terme de la période spécifiée (voir 9.2.3), compter les colonies sur chaque boîte (voir notes 1 et 2).

Retenir les boîtes contenant moins de 300 colonies à deux dilutions successives, et plus de 15 colonies sur au moins une boîte.

NOTE 1 Certains *Leuconostoc* spp. peuvent donner de grosses colonies muqueuses qui peuvent gêner le développement d'autres colonies, conduisant ainsi à sous-estimer le nombre de bactéries lactiques.

NOTE 2 En raison de la possibilité de développement de micro-organismes autres que les bactéries lactiques sur milieu MRS, tel que prescrit en 9.2, il peut être nécessaire, dans certains cas et pour certains produits, de confirmer les colonies obtenues en 9.2 par des techniques simples (comme la coloration de Gram ou la recherche de la catalase). Si un tel mode opératoire est pratiqué, il convient de le mentionner dans le rapport d'essai.

10 Expression des résultats

10.1 Mode de calcul

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

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

où

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes de deux dilutions successives et dont une au moins contient au moins 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 (voir l'ISO 7218).

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

EXEMPLE

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0,1n_2) d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0,1 \times 2)10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19\,182$$

En arrondissant à deux chiffres significatifs, on obtient 19 000 ou $1,9 \times 10^4$ bactéries lactiques mésophiles par gramme de produit.

10.2 Estimation des petits nombres

10.2.1 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, 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 mésophiles par millilitre, $N_E = y$;

— pour les autres produits: nombre estimé de bactéries lactiques mésophiles par gramme, $N_E = y/d$;

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