

---

# NORME INTERNATIONALE 2293

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

---

## Viandes et produits à base de viande — Dénombrement des germes aérobies à 30 °C (Méthode de référence)

*Meat and meat products — Aerobic count at 30 °C (Reference method)*

Première édition — 1976-04-01

---

CDU 637.512.7

Réf. n° : ISO 2293-1976 (F)

**Descripteurs** : viande, produit à base de viande, analyse microbiologique, comptage, bactérie aérobie.

## AVANT-PROPOS

L'ISO (Organisation Internationale de Normalisation) est une fédération mondiale d'organismes nationaux de normalisation (Comités Membres ISO). L'élaboration de Normes Internationales est confiée aux Comités Techniques ISO. Chaque Comité Membre intéressé par une étude a le droit de faire partie du Comité Technique correspondant. Les organisations internationales, gouvernementales et non gouvernementales, en liaison avec l'ISO, participent également aux travaux.

Les Projets de Normes Internationales adoptés par les Comités Techniques sont soumis aux Comités Membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes Internationales par le Conseil de l'ISO.

La Norme Internationale ISO 2293 a été établie par le Comité Technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, et soumise aux Comités Membres en avril 1971.

Elle a été approuvée par les Comités Membres des pays suivants :

Afrique du Sud, Rép. d'	Égypte, Rép. arabe d'	Pologne
Allemagne	Espagne	Portugal
Australie	Hongrie	Royaume-Uni
Autriche	Inde	Suède
Belgique	Iran	Tchécoslovaquie
Brésil	Irlande	Turquie
Bulgarie	Israël	
Chili	Pays-Bas	

Les Comités Membres des pays suivants ont désapprouvé le document pour des raisons techniques :

France  
Nouvelle-Zélande

# Viandes et produits à base de viande – Dénombrement des germes aérobies à 30 °C (Méthode de référence)

## 1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente Norme Internationale spécifie une méthode de référence pour le dénombrement des micro-organismes aérobies revivifiables dans les viandes et produits à base de viande.

La méthode est applicable à toutes les catégories de viandes et de produits à base de viande.

## 2 RÉFÉRENCES

ISO 3100, *Viandes et produits à base de viande – Échantillonnage*.

## 3 DÉFINITIONS

**3.1 micro-organismes aérobies :** Micro-organismes croissant dans des conditions aérobies, lorsque l'essai est effectué suivant la méthode décrite.

**3.2 dénombrement des germes aérobies :** Détermination du nombre de micro-organismes aérobies revivifiables par gramme de viande ou produits à base de viande, trouvés lorsque l'essai est effectué suivant la méthode décrite.

## 4 PRINCIPE

Hachage de la viande ou du produit à base de viande suivi de macération dans un homogénéisateur mécanique avec un diluant stérile. À partir de la suspension obtenue, préparation de dilutions décimales, étalement de fractions de 0,1 ml de ces dilutions sur des plaques de gélose d'un milieu de culture non sélectif et, simultanément, transvasement de quantités de 1 ml de la suspension non diluée dans des boîtes de Pétri vides, dans lesquelles est versé un milieu non sélectif.

Incubation à 30 °C en milieu aérobie durant 3 jours.

Calcul, à partir du nombre de colonies par boîte de Pétri, du nombre de micro-organismes aérobies revivifiables par gramme d'échantillon.

## 5 MILIEU DE CULTURE ET DILUANT

### 5.1 Composants de base

Pour améliorer l'uniformité des résultats, il est recommandé d'utiliser des composants de milieux de culture déshydratés de qualité constante et des produits chimiques de pureté analytique, ou d'utiliser un milieu complet déshydraté.

Les composants de base, eau, peptone, tryptone et extrait de levure en poudre, doivent être d'une qualité reconnue acceptable pour essais microbiologiques.

## 5.2 Milieu de culture

Le milieu de culture recommandé dans cette méthode est le «standard methods agar» (American Public Health Association (1960) : «Standard methods for the examination of dairy products» – 11<sup>ème</sup> édition, APHA Inc, New York, U.S.A.).

### 5.2.1 Composition

Gélose	15,0 g
Extrait de levure en poudre	2,5 g
Tryptone	5,0 g
Glucose	1,0 g
Eau	1 000 ml

### 5.2.2 Préparation du milieu de culture

Dissoudre les composants du milieu de culture déshydratés ou le milieu complet déshydraté dans de l'eau à ébullition.

Ajuster le pH de façon qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,1$  à  $40^\circ\text{C}$ .

Transvaser le milieu de culture dans des tubes ou des fioles (6.2.1) de capacité ne dépassant pas 500 ml, et les stériliser avec leur contenu par chauffage à l'autoclave (6.1.3) à  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  durant 20 min.

La stérilité du milieu doit être vérifiée en incubant, en même temps que les boîtes inoculées, une boîte contenant le milieu seul, durant 3 jours, à  $30^\circ\text{C}$ .

### 5.2.3 Préparation des plaques de gélose

Dans des boîtes de Pétri (6.2.3) stériles, verser environ 15 ml du milieu de culture (5.2) liquéfié à une température d'environ  $45^\circ\text{C}$ , et laisser se solidifier. Les boîtes préparées à l'avance ne doivent pas être conservées à la température du laboratoire durant plus de 4 h à température ambiante ou plus de 1 jour dans un réfrigérateur.

Immédiatement avant l'emploi, faire sécher les boîtes, de préférence ouvertes, avec la surface de la gélose orientée vers le bas, dans une étuve ou un incubateur (6.1.4) à une température de  $50^\circ\text{C}$ , durant 30 min.

## 5.3 Diluant

### 5.3.1 Composition

Peptone	1,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	8,5 g
Eau	1 000 ml

### 5.3.2 Préparation du diluant

Dissoudre les composants dans de l'eau à ébullition.

Ajuster le pH, de façon qu'après stérilisation il soit de  $7,0 \pm 0,1$  à  $20^\circ\text{C}$ .

### 5.3.3 Préparation des tubes et des fioles de dilution

Transvaser une partie du diluant dans des fioles de culture (6.2.1) en quantités de 100 à 300 ml, pour la macération. Transvaser le reste dans des tubes ou fioles de culture en quantités telles que chaque tube ou fiole de culture contienne 9,0 ml de diluant après stérilisation.

Stériliser le diluant par chauffage à l'autoclave (6.1.3) durant 20 min à  $121 \pm 1^\circ\text{C}$ .

## 6 APPAREILLAGE

### 6.1 Appareils

**6.1.1 Hachoir mécanique à viande**, taille de laboratoire, stérile, pourvu d'une plaque à trous de diamètre maximal 4 mm.

**6.1.2 Homogénéisateur mécanique**, dont la vitesse de rotation est comprise entre 8 000 tr/min et 45 000 tr/min, avec bols en verre ou en métal, d'une capacité appropriée, munis de couvercles, et résistant aux conditions de stérilisation.

**6.1.3 Autoclave** et, si nécessaire, **étuve** pour la stérilisation de la verrerie, des bols de l'homogénéisateur, des milieux de culture, du diluant, etc.

**6.1.4 Enceinte de séchage ou incubateur**, pour sécher la surface des géloses, maintenus de préférence à une température de  $50^\circ\text{C}$ .

**6.1.5 Étuve**, pour maintenir les boîtesensemencées à une température de  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ .

**6.1.6 Bains d'eau**, pour le chauffage et le refroidissement des solutions et des milieux de culture liquéfiés à la température appropriée.

### 6.2 Verrerie

La verrerie doit résister à la stérilisation répétée.

**6.2.1 Tubes et fioles de culture**, pour la stérilisation et l'entreposage des milieux de culture et du diluant, et pour préparer les dilutions.

**6.2.2 Pipettes graduées**, de capacité nominale 1 ml, graduées en 0,1 ml et munies d'une ouverture d'écoulement de 2 à 3 mm de diamètre.

**6.2.3 Boîtes de Pétri**, en verre, des dimensions suivantes :

Boîtes, diamètre intérieur  $90 \pm 2$  mm;  
 hauteur extérieure minimale 18 mm;  
 le bord doit être poli dans un plan parallèle à la base;  
 le fond de la boîte doit être plan et parallèle à la base.

Couvercle, diamètre extérieur maximal 102 mm.

Des boîtes de Pétri en matières plastiques peuvent être également utilisées, bien qu'elles soient de dimensions légèrement différentes.

**6.2.4 Étaleurs en verre**, faits à partir d'une tige en verre d'environ 3,5 mm de diamètre et de 200 mm de longueur, coudée à angle droit à environ 30 mm de l'une de ses extrémités; les extrémités doivent être arrondies par chauffage.

### 6.3 Stérilisation de la verrerie, etc.

Stériliser la verrerie selon l'une des méthodes suivantes :

- stérilisation humide à une température minimale de 121 °C, durant au moins 20 min;
- stérilisation sèche à une température minimale de 170 °C, durant au moins 1 h.

## 7 ÉCHANTILLONNAGE

Prélever un échantillon représentatif d'au moins 200 g. Voir ISO 3100.

L'échantillon peut être conservé durant au maximum 1 h à une température comprise entre 0 et 5 °C.

## 8 MODE OPÉRATOIRE

### 8.1 Traitement préalable de l'échantillon

Broyer et mélanger l'échantillon deux fois dans le hachoir à viande (6.1.1). Procéder dès que possible à l'examen de l'échantillon prétraité; il peut être conservé, si nécessaire, à une température comprise entre 0 et 5 °C, mais pas plus de 1 h.

### 8.2 Macération et dilutions

**8.2.1** Peser, à 0,1 g près, environ 10 g de viande hachée ou de produit à base de viande haché (8.1), dans un bol d'homogénéisateur, et ajouter une quantité de diluant de masse 9 fois égale (5.3). Faire fonctionner l'homogénéisateur (6.1.2), pendant une durée telle que le nombre total de tours soit de 15 000 à 20 000.

Même avec l'homogénéisateur le plus lent, ce temps ne doit pas excéder 2,5 min.

**8.2.2** Immédiatement après macération, prélever une portion de 1 ml de la suspension (8.2.1) avec une pipette stérile (6.2.2) et ajouter cette portion à 9 ml de diluant stérile contenu dans un tube ou dans une fiole de culture (voir 5.3.3), en évitant tout contact entre la pipette et le diluant.

Opérer de la même manière avec une seconde portion de 1 ml de suspension. Effectuer les opérations 8.2.3, 8.2.4 et 8.3.1 sur chacune de ces portions diluées.

**8.2.3** Mélanger soigneusement les liquides, par aspiration-refoulement, dix fois avec une nouvelle pipette stérile.

Transvaser, avec cette même pipette, 1 ml de cette dilution ( $10^{-2}$ ) dans un autre tube de dilution contenant 9 ml de diluant stérile en évitant tout contact entre la pipette et le diluant.

**8.2.4** Mélanger les liquides avec une nouvelle pipette stérile comme indiqué en 8.2.3, et répéter encore deux fois les opérations afin d'avoir le nombre requis de dilutions jusqu'à  $10^{-5}$ .

### 8.3 Ensemencement

#### 8.3.1 Ensemencement avec les dilutions

En utilisant une nouvelle pipette stérile, transvaser en double sur les plaques de gélose (5.2.3), 0,1 ml de la suspension (8.2.1) et de chacune des dilutions des deux séries de dilutions. Commencer par la dilution la plus élevée et continuer jusqu'à la plus basse, en remplissant et en vidant la pipette trois fois avant de transvaser les portions de 0,1 ml dans les boîtes.

Étaler cette quantité, aussi rapidement que possible et soigneusement, à la surface de la gélose, en employant un étaleur en verre stérile (6.2.4), et laisser sécher durant 15 min environ sur la paillasse pour l'imprégnation de la gélose. Utiliser un nouvel étaleur en verre stérile pour chaque boîte.

#### 8.3.2 Ensemencement avec la suspension

Transvaser en double, avec une pipette stérile, 1 ml de la suspension (8.2.1) dans des boîtes de Pétri stériles et vides.

Transvaser dans les 5 min qui suivent, dans chaque boîte, 15 à 20 ml du milieu de culture (5.2), préalablement liquéfiés puis refroidis à une température d'environ 45 °C.

Mélanger soigneusement le contenu de chaque boîte aussitôt après addition du milieu de culture. S'assurer que les boîtes sont en position horizontale pendant la solidification du mélange.

### 8.4 Incubation des boîtes

Placer les plaques, préparées selon 8.3.1 et 8.3.2, avec le fond de la boîte de Pétri au-dessus, durant 3 jours dans une étuve (6.1.5) à une température de  $30 \pm 1$  °C.

### 8.5 Dénombrement des colonies

À la fin de la période d'incubation, dénombrer les colonies sur l'ensemble de chaque boîte.

Ne pas tenir compte des boîtes dont la moitié au moins de la surface de la gélose est envahie.

Lorsqu'une partie, mais moins de la moitié, de la surface de la gélose est envahie, dénombrer les colonies dans la partie claire, et multiplier le résultat par deux pour obtenir le résultat correspondant à la surface totale de la boîte.

## 9 EXPRESSION DES RÉSULTATS

**9.1** Utiliser, pour le dénombrement, les boîtes dans lesquelles se sont développées de 30 à 300 colonies. Employer de préférence les boîtesensemencées avec la plus grande quantité d'échantillons examinés.

**9.2** Calculer le nombre moyen des colonies à partir des dénombrements faits sur les plaques de géloseensemencées en double aux dilutions choisies et dans les deux séries de dilutions.

**9.3** Arrondir les résultats comme suit :

- a) si le chiffre est inférieur à 100, arrondir au plus proche multiple de 5;
- b) si le chiffre est supérieur à 100 et ne se termine pas par 5, arrondir au plus proche multiple de 10;
- c) si le chiffre est supérieur à 100 et se termine par un 5, arrondir au plus proche multiple de 20.

**9.4** Calculer le nombre de micro-organismes par gramme d'échantillon en multipliant par 10 et par le facteur de dilution ( $10$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  ou  $10^5$ ) le nombre obtenu

suyant 9.3, dans le cas des boîtesensemencées par étalement, et seulement par le facteur de dilution 10 pour les boîtesmélancées selon 8.3.2.

**9.5** Faire la moyenne des résultats obtenus à partir de chacune des séries des dilutions en double (voir 8.2.2).

**9.6** Noter comme résultat le nombre de micro-organismes par gramme de viande ou de produit à base de viande, exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10 par exemple, un nombre moyen de 15 000 sera indiqué par  $1,5 \times 10^4$  par gramme). S'il est trouvé moins de 300 micro-organismes par gramme, noter le résultat comme suit : « moins de  $3,0 \times 10^2$  par gramme ».

## 10 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non spécifiés dans la présente Norme Internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

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

ISO 2293:1976

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e967bd62-0e75-427b-a555-cae18deff171/iso-2293-1976>