

NORME INTERNATIONALE

ISO
2293

Deuxième édition
1988-08-15



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

**Viandes et produits à base de viande —
Dénombrement des micro-organismes — Méthode par
comptage des colonies obtenues à 30 °C (Méthode de
référence)**

*Meat and meat products — Enumeration of micro-organisms — Colony count technique at
30 °C (Reference method)*

Numéro de référence
ISO 2293:1988 (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 approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 2293 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 2293 : 1976), dont elle constitue une révision technique.

Viandes et produits à base de viande — Dénombrement des micro-organismes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C (Méthode de référence)

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit la méthode de référence pour le dénombrement des micro-organismes dans la viande et les produits à base de viande, par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation en aérobiose à 30 °C. Elle a été élaborée conformément à l'ISO 4833, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C*.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application de la présente Norme internationale, du fait que cette méthode est sujette à de grandes variations. Il est recommandé d'appliquer cette méthode et d'interpréter les résultats à la lumière des renseignements donnés en 10.2.

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 de cette norme, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur cette 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 3100-1: —¹⁾, *Viandes et produits à base de viande — Échantillonnage et préparation des échantillons pour essai — Partie 1: Échantillonnage*.

ISO 3100-2: 1988, *Viandes et produits à base de viande — Échantillonnage et préparation des échantillons pour essai — Partie 2: Traitement des échantillons pour essai en vue de l'examen microbiologique*.

ISO 6887, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

3 Définition

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

micro-organismes: Bactéries, levures et moisissures se développant en aérobiose à 30 °C, dans les conditions opératoires décrites dans la présente Norme internationale.

4 Principe

4.1 Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture défini, coulé dans deux boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de 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.

4.2 Incubation de ces boîtes pendant 72 h à 30 °C en aérobiose.

1) À publier

4.3 Calcul du nombre de micro-organismes par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Petri retenues (voir 10.1).

5 Milieux de culture et diluant

5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Si les milieux et le diluant ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité entre 0 °C et + 5 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

5.2 Diluant

Se reporter à l'ISO 6887 et à la Norme internationale traitant du produit à examiner.

5.3 Gélose pour dénombrement

Composition

Tryptone ¹⁾	5,0 g
Extrait de levure déshydraté	2,5 g
D-glucose anhydre (dextrose anhydre)	1,0 g
Agar-agar, en poudre ou en paillettes	12 g à 18 g ²⁾
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant à ébullition. Ajuster le pH, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes à essais (6.9), à raison de 15 ml par tube, ou dans des fioles (6.9) dont la capacité ne dépasse pas 500 ml, à raison d'environ la moitié du volume de la fiole.

Stériliser à l'autoclave (6.2) à $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ pendant 15 min. Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir à $45 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ au bain d'eau (6.6) avant emploi. Dans le cas contraire, avant de commencer l'examen microbiologique, afin d'éviter toute attente au moment de couler la gélose, faire fondre complètement le milieu au bain d'eau bouillante, puis refroidir à $45 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ au bain d'eau (6.6).

5.4 Gélose non nutritive, dite « gélose blanche »

(si nécessaire, voir 9.2.1.4)

Composition

Agar-agar, en poudre ou en paillettes	12 g à 18 g ²⁾
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre l'agar-agar dans l'eau en portant à ébullition. Ajuster le pH, de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes à essais (6.9), à raison de 4 ml par tube, ou dans des fioles (6.9) de 150 ml, à raison de 100 ml par fiole.

Stériliser à l'autoclave à $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ pendant 15 min. Si le milieu est utilisé extemporanément, le refroidir à $45 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ au bain d'eau (6.6) avant emploi. Dans le cas contraire, avant de commencer l'examen microbiologique, afin d'éviter toute attente au moment de couler la gélose, faire fondre complètement le milieu au bain d'eau bouillante, puis refroidir à $45 \text{ °C} \pm 0,5 \text{ °C}$ au bain d'eau (6.6).

6 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont convenables.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment

6.1 Appareil pour l'homogénéisation.

Un des appareils suivants doit être utilisé :

- un homogénéisateur mécanique à viande, taille laboratoire, stérilisable, muni d'une plaque perforée de trous de 4 mm de diamètre maximal ;
- un homogénéisateur du type péristaltique (Stomacher), avec des sacs stériles en plastique.

1) Ce terme n'est actuellement utilisé que par certains producteurs de milieu de culture. Tout autre digestat de caséine donnant des résultats comparables peut être utilisé.

2) Selon les instructions du fabricant.

6.2 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

Le matériel en contact avec les milieux de culture, le diluant et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement celui en plastique), doit être stérilisé

- soit au four en le maintenant à une température comprise entre 170 °C et 175 °C pendant au moins 1 h;
- soit à l'autoclave en le maintenant à une température de 121 °C ± 1 °C pendant au moins 20 min.

6.3 Étuve, réglable à 30 °C ± 1 °C.

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

6.5 Pipettes, 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.

6.6 Bain d'eau, ou équipement similaire, réglable à 45 °C ± 0,5 °C.

6.7 Appareil de comptage de colonies, comportant un système d'éclairage avec fond noir, muni d'une loupe devant être utilisée à un grossissement de ×1,5 et d'un compteur numérique mécanique ou électronique.

6.8 pH-mètre, précis à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

6.9 Tubes à essais, de 18 mm × 180 mm, ou fioles de capacité convenable (voir 5.3 et 5.4).

7 Échantillonnage

Voir l'ISO 3100-1.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Opérer à partir d'un échantillon d'au moins 200 g conformément à l'ISO 3100-2, en utilisant l'appareil pour homogénéisation (6.1).

Procéder dès que possible à l'examen de l'échantillon pré-traité; il peut être conservé, si nécessaire, à une température comprise entre 0 °C et +5 °C, mais pas plus de 1 h.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir l'ISO 6887.

9.2 Méthode par comptage

9.2.1 Ensemencement

9.2.1.1 Prendre deux boîtes de Petri (6.4). Transférer, dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une pipette (6.5), 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

9.2.1.2 Prendre deux autres boîtes de Petri. Transférer, dans chacune de ces boîtes, à l'aide d'une nouvelle pipette, 1 ml de la dilution 10⁻¹ (produits liquides) ou 1 ml de la dilution 10⁻² (autres produits).

Recommencer les opérations décrites à l'alinéa précédent avec les dilutions suivantes.

9.2.1.3 Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 15 ml de la gélose pour dénombrement (5.3) à 45 °C ± 0,5 °C. Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution au 10⁻¹ dans le cas d'un produit liquide) et le moment où les dilutions sont en contact avec le milieu de culture (5.3) ne doit pas dépasser 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

9.2.1.4 Après solidification complète et uniquement dans le cas où l'on suspecte le produit à examiner de contenir des micro-organismes qui pourraient envahir la surface des milieux, couler, à la surface du milieu ensemencé, 4 ml de la gélose blanche (5.4) à 45 °C ± 0,5 °C. Laisser se solidifier comme décrit ci-dessus.

Cette opération, si elle a été effectuée, doit être mentionnée dans le rapport d'essai.

9.2.2 Incubation

Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer dans l'étuve (6.3) à 30 °C ± 1 °C. Les laisser dans l'étuve pendant 72 h ± 3 h.

9.2.3 Interprétation

Après la période d'incubation prescrite (voir 9.2.2), procéder, à l'aide du compteur (6.7), au comptage des colonies pour chaque boîte contenant moins de 300 colonies.

10 Expression des résultats

10.1 Mode de calcul

10.1.1 Retenir les boîtes contenant moins de 300 colonies, au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies.

Calculer le nombre N de micro-organismes par millilitre ou par gramme de produit, en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante :

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

où

$\sum C$ est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues ;

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.

Arrondir les résultats à deux chiffres significatifs.

Noter comme résultat le nombre de micro-organismes par millilitre ou par gramme de produit, exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x , où x est la puissance appropriée de 10.

EXEMPLE

Un dénombrement de micro-organismes à 30 °C a donné les résultats suivants :

- à la première dilution 10^{-2} retenue : 168 et 215 colonies
- à la seconde dilution 10^{-3} retenue : 14 et 25 colonies

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}}$$

$$= \frac{422}{0,022} = 19\ 182$$

Arrondir à deux chiffres significatifs, soit 19 000 ou $1,9 \times 10^4$ micro-organismes par millilitre ou gramme de produit.

10.1.2 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, faire la moyenne m des colonies comptées sur les deux boîtes.

Donner le résultat sous la forme :

- nombre estimé de micro-organismes par millilitre :
 $N_E = m$ (produits liquides)

- nombre estimé de micro-organismes par gramme :

$$N_E = m \times \frac{1}{d} \text{ (autres produits)}$$

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

10.1.3 Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits), ne contiennent aucune colonie, donner le résultat sous la forme :

- moins de 1 micro-organisme par millilitre (produits liquides),
- moins de $1 \times 1/d$ micro-organisme par gramme (autres produits), d étant le taux de dilution de la suspension mère.

10.1.4 S'il existe des boîtes contenant entre 15 et 300 colonies au niveau de deux dilutions consécutives, calculer le nombre de micro-organismes pour chaque dilution et prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux valeurs obtenues, sauf si le rapport de la valeur la plus forte à la valeur la plus faible est supérieur à 2 ; dans ce dernier cas, retenir comme résultat la valeur la plus faible.

10.2 Fidélité

Pour des raisons d'ordre uniquement statistique, dans 95 % des cas, les limites de confiance de cette méthode varient de $\pm 12\%$ à $\pm 37\%$ ¹⁾. En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées, en particulier entre les résultats obtenus par différents microbiologistes.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus, ainsi que l'addition, le cas échéant, de gélose non nutritive. 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 les résultats.

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

1) Extrait de COWELL et MORISSETTI, *J. Sci. Food Agric.*, 1969 (Vol. 20), p. 573.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 2293:1988

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/aa60a692-01f1-4c1b-b1f2-6e5ea6651d05/iso-2293-1988>