

# NORME INTERNATIONALE

ISO  
7932

Première édition  
1987-11-01



---

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

---

## **Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement de *Bacillus cereus* — Méthode par comptage des colonies à 30 °C**

*Microbiology — General guidance for enumeration of Bacillus cereus — Colony count  
technique at 30 °C*

## 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 normalement 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.

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 7932 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

# Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement de *Bacillus cereus* — Méthode par comptage des colonies à 30 °C

## 0 Introduction

**0.1** La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen microbiologique de produits alimentaires non concernés par les Normes internationales existant actuellement et qui devraient être prises en considération par les organismes élaborant des méthodes d'essais microbiologiques destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux.

En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes.

Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, les directives données, et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale, si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles vraiment nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

**0.2** Pour les besoins d'une méthode d'essai pratique, la définition de *Bacillus cereus* donnée au chapitre 3 et utilisée comme base pour le mode opératoire, ne décrit pas d'une manière spécifique les souches de *Bacillus cereus*. Les essais de confirmation notamment sont insuffisants pour distinguer *Bacillus cereus* des autres bacillus proches, mais moins communément rencontrés, tels que *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* var. *mycoides*, etc.

**0.3** Il apparaît que les spores de beaucoup de souches de *Bacillus cereus*, sinon la plupart, germent aisément à la surface du milieu de culture utilisé pour le dénombrement. Dans la plupart des cas, il ne semble pas qu'il y ait besoin d'un traitement de choc thermique pour provoquer la germination. Parfois ce traitement de choc thermique est souhaitable, par exemple, pour le dénombrement des spores ou l'inhibition de micro-organismes; dans ce cas, il sera de 15 min à 70 °C.

## 1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale donne les directives générales pour le dénombrement de *Bacillus cereus*, revivifiable dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, par comptage des colonies à 30 °C.

## 2 Référence

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

## 3 Définition

Dans le cadre de la présente Norme internationale, la définition suivante est applicable.

*Bacillus cereus*: Micro-organismes qui forment des colonies à la surface d'un milieu de culture sélectif et qui donnent des réactions de confirmation positives quand les essais sont exécutés selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

## 4 Principe

**4.1** Ensemencement en surface d'un milieu sélectif solide coulé dans des boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit 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.

**4.2** Incubation de ces boîtes en aérobiose à 30 °C pendant 18 à 48 h.

**4.3** Calcul du nombre de *Bacillus cereus* par millilitre ou par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies caractéristiques obtenues dans des boîtes choisies aux niveaux de dilution donnant un résultat significatif, et confirmées selon les essais spécifiés.

## 5 Diluant, milieux de culture et réactifs

### 5.1 Composants de base.

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux de culture, des milieux complets déshydratés, des composants de base déshydratés et pour l'émulsion de jaune d'œuf une préparation commerciale. 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 de *Bacillus cereus* dans les conditions de l'essai.

Les mesures du pH doivent être effectuées au moyen d'un pH-mètre (6.6), réglé à la température de 25 °C.

Si le diluant et les milieux de culture ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité entre 0 et 5 °C, pendant un 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 spécifique du produit à analyser.

### 5.3 Milieu gélosé.<sup>1)</sup>

#### 5.3.1 Milieu de base.

Tableau 1

Composant	Quantité
Extrait de viande	1,0 g
Peptone	10,0 g
D-Mannitol (C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> )	10,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	10,0 g
Rouge de phénol (C <sub>19</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub> S)	0,025 g
Agar-agar	12 à 18 g *
Eau	1 000 ml

\* Selon les prescriptions du fabricant.

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

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2.

Répartir le milieu par quantités de 90 ml dans des flacons (6.7) de capacité appropriée. Stériliser le milieu à 121 ± 1 °C pendant 15 min.

#### 5.3.2 Polymyxine B, émulsion.

Tableau 2

Composant	Quantité
Sulfate de polymyxine B	0,100 g
Eau	100 ml

Dissoudre le sulfate de polymyxine B dans l'eau. Stériliser par filtration.

#### 5.3.3 Émulsion de jaune d'œuf.

Utiliser des œufs frais de poule, à coquille intacte. Nettoyer les œufs avec une brosse, à l'aide d'un détergent liquide, rincer à l'eau courante, plonger dans de l'alcool à 95 % (V/V) pendant 30 s et sécher. En opérant de façon aseptique, casser chaque œuf et séparer les jaunes des blancs par transferts répétés du jaune d'une demi coquille dans l'autre. Placer les jaunes dans une éprouvette stérile et ajouter quatre parties en volume d'eau stérile. Transférer de façon aseptique dans un flacon stérile (6.7) et mélanger vigoureusement.

Porter le mélange au bain d'eau (6.4) réglé à 45 ± 0,5 °C, pendant 2 h et entreposer entre 0 et 5 °C pendant 18 à 24 h pour permettre au précipité de se former.

Recueillir aseptiquement l'émulsion surnageante.

L'émulsion peut être conservée entre 0 et 5 °C au maximum pendant 72 h.

#### 5.3.4 Milieu complet.

Tableau 3

Composant	Volume
Milieu de base (5.3.1)	90 ml
Émulsion de polymyxine B (5.3.2)	1,0 ml
Émulsion de jaune d'œuf (5.3.3)	10,0 ml

Faire fondre le milieu de base puis le refroidir au bain d'eau (6.4) réglé à 50 ± 1 °C.

Ajouter les autres liquides en mélangeant soigneusement après chaque addition.

#### 5.3.5 Préparation des boîtes de milieu gélosé pour le dénombrement.

Couler 15 à 20 ml de milieu complet (5.3.4), refroidi et maintenu au bain d'eau (6.4) à 45 ± 0,5 °C dans des boîtes de Petri (6.8) stériles et laisser se solidifier.

1) MOSSEL, D. A. A., KOOPMAN, M. J. et JONGERIUS, E. *Appl. Microbiol.* 15, 1967 : 650-653.

Les boîtes peuvent être conservées, avant séchage, 24 h au maximum entre 0 et 5 °C.

Sécher les boîtes, de préférence couvercle enlevé et surface de la gélose tournée vers le bas, dans une enceinte de séchage ou une étuve (6.2) réglée à  $50 \pm 1$  °C pendant 30 min.

### 5.3.6 Préparation des boîtes de milieu gélosé pour l'isolement.

Verser dans les boîtes de Petri (6.8) stériles environ 15 ml de milieu de base (5.3.1) fondu au préalable, puis refroidi et maintenu au bain d'eau (6.4) à  $45 \pm 0,5$  °C et laisser se solidifier.

Immédiatement avant l'emploi, faire sécher les boîtes, de préférence ouvertes, avec la surface de la gélose orientée vers le bas dans une enceinte de séchage ou une étuve (6.2) à une température de  $50 \pm 1$  °C pendant 30 min.

Si elles sont préparées à l'avance, les boîtes non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température ambiante ou plus d'une journée entre 0 et 5 °C.

## 5.4 Gélose glucosée.

Tableau 4

Composant	Quantité
Tryptone	10,0 g
Extrait de levure	1,5 g
Glucose ( $C_6H_{12}O_6$ )	10,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Pourpre de bromocrésol ( $C_{21}H_{15}Br_2NaO_2S$ )	0,015 g
Agar-agar	12 à 18 g *
Eau	1 000 ml

\* Selon les prescriptions du fabricant.

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en portant à l'ébullition. Ajuster le pH, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0. Répartir le milieu de culture par quantités de 15 ml dans des tubes (6.7). Stériliser le milieu à 121 °C pendant 15 min.

Juste avant l'emploi, faire fondre le milieu au bain d'eau bouillante ou par jet de vapeur pendant 10 min. Ensuite, refroidir rapidement à 30 °C environ en maintenant les tubes en position verticale.

## 5.5 Milieu de Voges-Proskauer (VP)

Tableau 5

Composant	Quantité
Peptone	7,0 g
Glucose ( $C_6H_{12}O_6$ )	5,0 g
Monohydrogénéorthophosphate de potassium ( $K_2HPO_4$ )	5,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Eau	1 000 ml

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0. Répartir le milieu dans des tubes (6.7) par quantités de 5 ml et stériliser à 121 °C pendant 15 min.

## 5.6 Réactifs pour la réaction de Voges-Proskauer (VP).

### 5.6.1 $\alpha$ -Naphthol, solution.

Tableau 6

Composant	Quantité
$\alpha$ -Naphthol ( $C_{10}H_8O$ )	5,0 g
Alcool éthylique à 96 % (V/V)	100 ml

Dissoudre l' $\alpha$ -Naphthol dans l'éthanol.

Conserver entre 0 et 5 °C dans un flacon de verre foncé bouché hermétiquement.

### 5.6.2 Hydroxyde de potassium, solution.

Tableau 7

Composant	Quantité
Hydroxyde de potassium (KOH)	40,0 g
Eau	100 ml

Dissoudre l'hydroxyde de potassium dans l'eau.

### 5.6.3 Créatine ( $C_4H_{10}N_3O$ ), en cristaux.

## 5.7 Milieu au nitrate.

Tableau 8

Composant	Quantité
Peptone	5,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Nitrate de potassium ( $KNO_3$ )	1,0 g
Eau	1 000 ml

Dissoudre les composants ou le milieu complet dans l'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0. Répartir le milieu dans des tubes (6.7) par quantités de 5 ml. Stériliser à 121 °C pendant 15 min.

## 5.8 Réactif pour la recherche des nitrites.

### 5.8.1 Acide 5-amino-2-naphtholène sulfonique (5-2 ANSA), solution.

Tableau 9

Composant	Quantité
5-2 ANSA ( $C_{10}H_9NO_3S$ )	0,1 g
Acide acétique ( $C_2H_4O_2$ ), 15 % (V/V)	100 ml

Dissoudre le 5-2 ANSA dans l'acide acétique et filtrer sur papier.<sup>1)</sup>

Conserver dans un flacon de culture en verre foncé bien bouché (de préférence de type compte-gouttes) entre 0 et 5 °C.

### 5.8.2 Acide sulfanilique, solution.

Tableau 10

Composant	Quantité
Acide sulfanilique (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S)	0,4 g
Acide acétique (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ), 15 % (V/V)	100 ml

Dissoudre l'acide sulfanilique dans l'acide acétique et filtrer sur papier.<sup>1)</sup>

Conserver dans un flacon de culture en verre brun bien bouché (de préférence de type compte-gouttes) entre 0 et 5 °C.

### 5.8.3 Préparation du réactif complet.

Juste avant l'emploi, mélanger des volumes égaux des deux solutions 5.8.1 et 5.8.2.

Ne pas utiliser le réactif restant.

NOTE — Si le 5-2 ANSA (5.8.1) n'est pas disponible, il est possible d'utiliser les réactifs indiqués au tableau 11.

Tableau 11

Composant	Quantité
<b>Solution A</b>	
Acide sulfanilique (C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S)	0,8 g
Acide acétique (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ), 5 mol/l	100 ml
<b>Solution B</b>	
α-Naphtol (C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> O)	0,5 g
Acide acétique (C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub> ), 5 mol/l	100 ml

### 5.9 Zinc pulvérulent.

## 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 la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)** (autoclave autonome ou faisant partie d'un ensemble pour la préparation et la distribution des milieux).

Le matériel destiné à entrer en contact avec les milieux de culture, le diluant ou l'échantillon, particulièrement le matériel en matière plastique, sauf s'il est livré stérile, doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes:

- au four (6.1) en le maintenant à une température comprise entre 170 et 175 °C durant au moins 1 h;
- à l'autoclave (6.1), en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C durant au moins 20 min.

**6.2 Enceinte de séchage ou étuve** ventilée par convection, pour le séchage des boîtes de gélose, réglable à 50 ± 1 °C.

**6.3 Étuve**, réglable à 30 ± 1 °C.

**6.4 Bains d'eau**, réglables à 45 ± 0,5 °C et à 50 ± 1 °C.

**6.5 Anses bouclées**, en platine iridié ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre et fil à ensemercer de même métal.

**6.6 pH-mètre**, ayant une précision de réglage de ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

**6.7 Tubes à essai**, notamment de 18 mm de diamètre et 180 mm de longueur, et **flacons de culture**<sup>2)</sup> pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture.

**6.8 Boîtes de Petri**, d'un diamètre de 90 à 100 mm ou 140 mm si nécessaire.

**6.9 Pipettes graduées**, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, d'une capacité nominale de 10 et 1 ml, graduées respectivement en 0,5 et 0,1 ml, avec une ouverture nominale de 2 à 3 mm.

**6.10 Étaleurs en verre ou en plastique** (type crosses de hockey), par exemple baguettes de verre d'environ 3,5 mm de diamètre et 20 cm de longueur, coudées à angle droit à environ 3 cm de l'une de leurs extrémités; les extrémités coupées doivent être polies par chauffage.

**6.11 Paires en caoutchouc**, ou tout autre système de sécurité pouvant s'adapter aux pipettes graduées.

## 7 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné.

S'il n'y a pas de Norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

1) Un papier filtre approprié est le papier Whatman n° 41 ou l'équivalent. Cette information est donnée pour aider les utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie pas que l'ISO approuve ce produit.

2) Des flacons de culture munis de couvercles à vis en métal non toxique peuvent être utilisés.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Se reporter à la Norme internationale spécifique du produit concerné.

S'il n'y a pas de Norme internationale spécifique disponible, 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

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

### 9.2 Ensemencement et incubation

**9.2.1** Transférer, avec une pipette stérile (6.9), 0,1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide ou de la suspension mère pour les autres produits, à la surface de deux boîtes de Petri (5.3.5); répéter l'opération avec les dilutions décimales suivantes si nécessaire.

NOTE — S'il est souhaitable pour certains produits de procéder à l'estimation de petits nombres de *Bacillus cereus*, les limites du dénombrement peuvent être augmentées d'une puissance de 10, en examinant 1,0 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1,0 ml de la suspension mère pour les autres produits. Répartir 1 ml de l'inoculum avec un étaleur stérile (6.10), soit à la surface d'une grande boîte de Petri (140 mm) de milieu gélosé, soit à la surface de trois petites boîtes de Petri (90 mm) de milieu gélosé. Dans les deux cas, effectuer ces opérations en double, de façon à avoir deux grandes boîtes ou six petites boîtes.

**9.2.2** Etaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu en évitant de ne pas toucher les bords de la boîte avec l'étaleur (6.10). Utiliser un étaleur en verre stérile pour chaque boîte. Laisser les boîtes avec leur couvercle pendant environ 15 min à la température ambiante pour permettre à l'inoculum d'être absorbé dans la gélose.

**9.2.3** Retourner les boîtes préparées (9.2.2) et les faire incuber pendant 18 à 24 h à l'étuve à  $30 \pm 1$  °C (6.3). Si les colonies ne sont pas bien visibles, incuber de nouveau les boîtes pendant 24 h avant de procéder au comptage.

### 9.3 Comptage des colonies

Après la période d'incubation (9.2.3), retenir les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies et, si possible, au niveau de deux dilutions successives.

Compter sur chaque boîte les colonies présumées de *Bacillus cereus*. Les colonies présumées de *Bacillus cereus* sont grandes, roses (ne fermentant pas le mannitol, voir note 1) et presque toujours entourées d'une zone de précipité (indiquant une production de lécithinase, voir note 2).

S'il y a moins de 15 colonies caractéristiques sur les boîtes ensemencées avec le produit liquide ou avec la dilution la plus faible pour les autres produits, il est possible de faire une estimation comme décrit en 10.1.6.

## NOTES

1 Si les boîtes contiennent de nombreux micro-organismes produisant de l'acide à partir du mannitol, la couleur rose caractéristique des colonies de *B. cereus* peut être atténuée ou disparaître complètement.

2 Certaines souches de *B. cereus* produisent peu ou pas de lécithinase. Les colonies provenant de ces souches ne seront pas entourées d'une zone de précipité. Ces colonies devront aussi être soumises aux essais de confirmation.

3 Si l'on étale 1,0 ml d'inoculum en le répartissant sur trois boîtes (voir la note de 9.2.1), effectuer les opérations de dénombrement et de confirmation sur l'ensemble de ces boîtes comme s'il s'agissait d'une seule boîte.

## 9.4 Confirmation

### 9.4.1 Sélection et purification des colonies en vue de la confirmation

Choisir au hasard cinq colonies présumées à partir de chaque boîte sélectionnée conformément à 9.3. S'il existe moins de cinq colonies sur la boîte, prendre toutes les colonies présumées présentes. Confirmer ces colonies comme indiqué en 9.4.2, 9.4.3 et 9.4.4.

Si les boîtes sont très chargées et s'il n'est pas possible de sélectionner des colonies présumées bien isolées, ensemencer cinq colonies présumées par étalement sur les boîtes contenant le milieu complet (5.3.4). Incuber à l'étuve (6.3) à  $30 \pm 1$  °C pendant 18 à 24 h. Choisir à partir de chaque boîte au moins une colonie bien isolée ayant une couleur rose. Confirmer cette colonie comme décrit en 9.4.2, 9.4.3 et 9.4.4.

### 9.4.2 Gélose glucosée

Ensemencer les colonies sélectionnées (9.4.1) par piqûre centrale dans des tubes de gélose glucosée récemment chauffée (5.4). Incuber à l'étuve (6.3) à  $30 \pm 1$  °C pendant 24 h.

Une couleur jaune à partir de la piqûre centrale accompagnée le plus souvent d'une formation de gaz indique une réaction positive.

### 9.4.3 Milieu pour la réaction de Voges-Proskauer

Ensemencer les colonies sélectionnées (9.4.1) dans des tubes de milieu VP (5.5). Incuber à l'étuve (6.3) à  $30 \pm 1$  °C pendant 24 h.

Transférer à partir de chaque tube, 1 ml de culture dans des tubes propres pour la recherche de l'acétylméthylcarbinol. Ajouter 0,2 ml de la solution d'hydroxyde de potassium (5.6.2), 0,6 ml de la solution de  $\alpha$ -naphthol (5.6.1) et quelques cristaux de créatine (5.6.3). Mélanger énergiquement et laisser reposer pendant 1 h. Une coloration rose éosine indique une réaction positive.

Si la réaction est négative, incuber de nouveau les tubes contenant le milieu VP pendant 24 h supplémentaires et vérifier la présence l'acétylméthylcarbinol comme indiqué ci-dessus.

### 9.4.4 Milieu aux nitrates

Ensemencer les colonies sélectionnées (9.4.1) dans des tubes contenant le milieu au nitrate (5.7). Incuber à l'étuve (6.3) à  $30 \pm 1$  °C pendant 24 h.

Révéler la transformation du nitrate en nitrite en ajoutant dans chaque tube à l'aide de la pipette (6.9) munie d'une poire en caoutchouc (6.11) 0,2 à 0,5 ml du réactif pour la recherche des nitrites (5.8; voir note 2).

La formation d'une couleur rouge indique la réduction du nitrate en nitrite. Si aucune couleur rouge n'apparaît dans les 15 min, ajouter une petite quantité de zinc pulvérulent (5.9) et laisser reposer pendant 10 min. Si après l'addition de zinc pulvérulent, une coloration rouge apparaît, l'essai de confirmation est considéré comme négatif.

#### NOTES

1 Par mesure de sécurité, il est souhaitable d'effectuer cet essai sous hotte.

2 Si l'on utilise une solution d'acide sulfanilique et de  $\alpha$ -naphthol comme indiqué dans la note en 5.8, l'essai pour rechercher les nitrites est réalisé en ajoutant 2 gouttes d'acide sulfanilique (solution A) et 2 gouttes d' $\alpha$ -naphthol (solution B) à 3 ml de culture.

### 9.4.5 Interprétation des essais biochimiques

Tableau 12

Essais	Résultats confirmant <i>Bacillus cereus</i>
Gélose MYP (9.4.1)	Formation de colonies roses, entourées d'un précipité (voir notes 1 et 2 en 9.3)
Gélose glucosée (9.4.2)	Le glucose est fermenté en donnant une coloration jaune et généralement du gaz
Milieu VP (9.4.3)	La production d'acétylméthylcarbinol (acétoïne) est positive et donne avec les réactifs une couleur rose éosine
Milieu aux nitrates (9.4.4)	La réduction du nitrate en nitrite est positive et donne avec les réactifs une couleur rouge

## 10 Expression des résultats

### 10.1 Mode de calcul

10.1.1 Si au moins 80 % des colonies sélectionnées sont confirmées (9.4.5), prendre comme nombre de *Bacillus cereus*, le nombre donné par le comptage fait en 9.3.

10.1.2 Dans tous les autres cas, calculer le nombre de *Bacillus cereus* à partir du pourcentage de *Bacillus cereus* obtenus en 9.3 qui ont été confirmés (9.4.5).

10.1.3 Pour les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques pour deux dilutions consécutives, calculer le nombre de *Bacillus cereus* pour chaque dilution tel qu'il est indiqué en 10.1.1 et 10.1.2 et faire la moyenne arithmétique des deux valeurs obtenues. Si le rapport de la valeur la plus forte à la valeur la plus faible est supérieur à 2, retenir comme résultat la valeur la plus faible.

10.1.4 Calculer le nombre moyen de *Bacillus cereus* avec les résultats obtenus sur les deux séries de boîtes (10.1.1 et 10.1.2) ou avec deux dilutions consécutives dans le cas de 10.1.3.

Ne retenir ensuite que deux chiffres significatifs, en opérant de la façon suivante :

- si le nombre est inférieur à 100, l'arrondir au plus proche multiple de 5;
- si le nombre est supérieur à 100 et se termine par un 5, l'arrondir au plus proche multiple de 20;
- si le nombre est supérieur à 100 et ne se termine pas par un 5, l'arrondir au plus proche multiple de 10.

Multiplier cette valeur par l'inverse du volume d'inoculum (voir note 3 en 9.3) et ensuite par l'inverse du taux de dilution de l'échantillon pour essai afin d'obtenir le nombre de *Bacillus cereus* par millilitre ou par gramme de produit selon le cas.

Exprimer le résultat par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^x$  où  $x$  est la puissance appropriée. Un exemple du mode de calcul est présenté en 10.2.

10.1.5 Pour une estimation des petits nombres, faire une moyenne à partir du nombre de colonies confirmées caractéristiques (9.4.5) et l'arrondir au nombre entier supérieur le plus proche.

10.1.6 Si le nombre moyen de colonies confirmées, tel qu'il est calculé en 10.1.4, est inférieur à 15 pour les boîtes ensemencées à partir de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autres produits), donner le résultat sous la forme suivante :

a) pour les produits liquides :

— moins de  $15 \times n_e$  *Bacillus cereus* par millilitre, où  $n_e$  est donné par l'équation

$$n_e = \frac{1}{V}$$

où  $V$  est le volume d'inoculum;

b) pour les autres produits :

— moins de  $15 \times N_e$  *Bacillus cereus* par gramme, où  $N_e$  est donné par l'équation

$$N_e = \frac{1}{V} \times \frac{1}{d}$$

où  $d$  est la dilution de l'échantillon pour essai;

c) pour l'estimation des petits nombres dans les produits liquides :

$m \times n_e$  *Bacillus cereus* par millilitre

où  $m$  est le nombre moyen de colonies confirmées;

d) pour l'estimation des petits nombres dans les autres produits :

$m \times N_e$  *Bacillus cereus* par gramme

Les limites de confiance des estimations de petits nombres [(c) et (d)] sont données en annexe.

**10.1.7** S'il n'y a aucune colonie confirmée au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autres produits), donner le résultat sous la forme :

- a) pour les produits liquides :
- moins de  $1 \times n_e$  *Bacillus cereus* par millilitre
- b) pour les autres produits :
- moins de  $1 \times N_e$  *Bacillus cereus* par gramme

## 10.2 Exemple de calcul pour le dénombrement par comptage de *Bacillus cereus*

Pour cet exemple, 0,1 ml d'inoculum de la dilution  $10^{-2}$  de l'échantillon donne 65 et 85 colonies caractéristiques sur chaque boîte (9.3).

Les cinq colonies choisies à partir de la boîte contenant 65 colonies sont confirmées (9.4.5) et, par conséquent, on considère que les 65 colonies sont des colonies *Bacillus cereus*.

Trois des colonies sur les cinq choisies à partir de la boîte contenant 85 colonies sont confirmées (9.4.5) et, par conséquent, on considère que 60 % des 85 colonies, soit 51 colonies, sont des colonies *Bacillus cereus*.

Le nombre moyen (10.1.4) est :

$$\frac{65 + 51}{2} = 58 \text{ } \textit{Bacillus cereus}$$

On arrondit le chiffre 58 au plus proche multiple de 5, soit : 60.

Le nombre de *Bacillus cereus* par gramme ou par millilitre est :

$$\begin{aligned} m \times \frac{1}{V} \times \frac{1}{d} \\ &= 60 \times \frac{1}{0,1} \times \frac{1}{10^{-2}} \\ &= 60 \times 10 \times 10^2 \\ &= 60 \times 10^3 \\ &= 6,0 \times 10^4 \text{ } \textit{Bacillus cereus} \text{ par gramme ou par millilitre} \end{aligned}$$

## 10.3 Précision du dénombrement (10.1.4)

Pour des raisons statistiques, dans 95 % des cas, les limites de confiance de cette méthode varient de  $\pm 16\%$  à  $\pm 52\%$  <sup>1)</sup>. En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées et, en particulier, entre les résultats obtenus par différents microbiologistes.

## 11 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée, la durée d'incubation 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.

1) COWELL et MORISETTI. *J. Sci. Food Agric.* **20**, 1969 : p. 573.

## Annexe

## Limites de confiance pour estimer les dénombrements

(Cette annexe ne fait pas partie intégrante de la norme.)

Les 95 % de limites de confiance pour estimer les dénombrements, quand le nombre moyen de colonies confirmées sur doubles boîtes inoculées à partir de l'essai pour échantillon ou de la suspension mère est inférieur à 15 *Bacillus cereus*, sont donnés dans le tableau 13.

Tableau 13

Nombre de <i>Bacillus cereus</i>	Limites de confiance au niveau 95 %	
	Inférieure	Supérieure
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23