

NORME
INTERNATIONALE

ISO
7932

Deuxième édition
1993-10-15

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

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e4e4bf48-b2ce-4547-9f90-139078b63b9a/iso-7932-1993>



Numéro de référence
ISO 7932:1993(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 vote. Leur publication comme Normes internationales requiert 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*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e4e4bf48-b2ce-4547-9f90-c9071b671611/iso-7932-1993>

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 7932:1987), dont elle constitue une révision technique.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale. L'annexe B est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1993

Droits de reproduction réservés. 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

Imprimé en Suisse

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 à prendre 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'elle 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 *B. cereus* des autres bacillus proches, mais moins communément rencontrés, tels que *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, etc.

0.3 Il apparaît que les spores de beaucoup de souches de *B. 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 cellules végétatives de micro-organismes; dans ce cas, il sera de 15 min à 70 °C.

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7932:1993

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e4e4bf48-b2ce-4547-9f90-139078b63b9a/iso-7932-1993>

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

1 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 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 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

ISO 7218:1985, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques*.

3 Définition

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

3.1 *Bacillus cereus*: Micro-organisme qui forme des colonies à la surface d'un milieu de culture sélectif et qui donne 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 h à 48 h.

4.3 Calcul du nombre de *B. 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 Généralités

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

NOTE 1 Les réactifs ou préparations du commerce prêts à l'emploi peuvent être utilisés.

5.2 Diluant

Voir l'ISO 6887 et la norme spécifique du produit à analyser.

5.3 Milieu gélosé (voir référence [1] en annexe B.

5.3.1 Milieu de base

5.3.1.1 Composition

Extrait de viande	1,0 g
Peptone	10,0 g
D-Mannitol	10,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	10,0 g
Rouge de phénol	0,025 g
Agar-agar	12 à 18 g ¹⁾
Eau	900 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.3.1.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2 à 25 °C.

Répartir le milieu par quantités de 90 ml dans des flacons de culture (6.7) de capacité appropriée.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

5.3.2 Solution de polymyxine B

5.3.2.1 Composition

Sulfate de polymyxine B	10 ⁶ U.I.
Eau	100 ml

5.3.2.2 Préparation

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. Les rincer à l'eau courante, les plonger dans de l'alcool à 95 % (V/V) pendant 30 s et les 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 ajou-

ter 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 °C pendant 2 h et entreposer entre 0 °C et 5 °C pendant 18 h à 24 h pour permettre au précipité de se former.

Recueillir aseptiquement l'émulsion surnageante.

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

5.3.4 Milieu complet (agar-agar MYP)

5.3.4.1 Composition

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

5.3.4.2 Préparation

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

Ajouter les autres liquides en mélangeant soigneusement après chaque addition.

Refroidir le milieu complet dans un bain d'eau (6.4) à 45 °C.

5.3.5 Préparation des boîtes de milieu gélosé pour le dénombrement

Couler 15 ml à 20 ml de milieu complet (5.3.4) dans des boîtes de Petri (6.8) stériles et laisser se solidifier.

Les boîtes peuvent être conservées, avant séchage, jusqu'à 4 jours au maximum entre 0 °C et 5 °C.

Immédiatement avant utilisation, 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 entre 37 °C et 55 °C jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

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 °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) entre 37 °C et 55 °C jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

5.4 Gélose glucosée

5.4.1 Composition

Tryptone	10,0 g
Extrait de levure	1,5 g
Glucose	10,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Pourpre de bromocrésol	0,015 g
Agar-agar	12 à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.4.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en chauffant, si nécessaire.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture par quantités de 15 ml dans des tubes (6.7).

Stériliser le milieu à l'autoclave (6.1) réglé 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)

5.5.1 Composition

Peptone	7,0 g
Glucose	5,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	5,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Eau	1 000 ml

5.5.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes (6.7) par quantités de 5 ml.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

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

5.6.1 Solution d' α -naphtol

5.6.1.1 Composition

α -Naphtol	5,0 g
Éthanol à 95 % (V/V)	100 ml

5.6.1.2 Préparation

Dissoudre l' α -naphtol dans l'éthanol.

Conserver entre 0 °C et 5 °C dans un flacon en verre brun bouché hermétiquement.

5.6.2 Hydroxyde de potassium, solution.

5.6.2.1 Composition

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

5.6.2.2 Préparation

Dissoudre l'hydroxyde de potassium lentement dans l'eau.

5.6.3 Créatine, en cristaux

5.7 Milieu au nitrate

5.7.1 Composition

Peptone	5,0 g
Extrait de viande	3,0 g
Nitrate de potassium (KNO ₃)	1,0 g
Eau	1 000 ml

5.7.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet dans l'eau.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes (6.7) par quantités de 5 ml.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

5.8 Réactif pour la recherche des nitrites

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

5.8.1.1 Composition

5-2 ANSA	0,1 g
Acide acétique (2,6 mol/l)	100 ml

5.8.1.2 Préparation

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

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

NOTE 2 Si le 5-2 ANSA n'est pas disponible, il est possible d'utiliser, en variante, le réactif suivant:

Solution A: acide sulfanilique, 0,8 g
acide acétique (5 mol/l), 100 ml, et

Solution B: α -naphtol 0,5 g
acide acétique (5 mol/l), 100 ml.

5.8.2 Solution d'acide sulfanilique.

5.8.2.1 Composition

Acide sulfanilique	0,4 g
Acide acétique (2,6 mol/l)	100 ml

5.8.2.2 Préparation

Dissoudre l'acide sulfanilique dans l'acide acétique et filtrer sur papier.¹⁾

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

1) La papier Whatman n° 41 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

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

5.8.3 Préparation du réactif complet

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

Ne pas utiliser le réactif restant.

5.9 Zinc pulvérulent

6 Appareillage et verrerie

NOTE 3 Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ces spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et en particulier, ce qui suit.

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

Voir ISO 7218.

6.2 Enceinte de séchage ou **étuve**, ventilée par convection, pour le séchage des boîtes de gélose, réglable entre 37 °C \pm 1 °C et 55 °C \pm 1 °C.

6.3 Étuve, réglable à 30 °C \pm 1 °C.

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

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

6.6 pH-mètre, ayant une précision de réglage de \pm 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**²⁾ pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture.

6.8 Boîtes de Petri, en verre ou en matière plastique, d'un diamètre de 90 mm à 100 mm ou 140 mm, si nécessaire.

6.9 Pipettes graduées, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, d'une capacité nominale de 10 ml et 1 ml, graduées respectivement en 0,5 ml et 0,1 ml, avec une ouverture nominale de 2 mm 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 en verre doivent être polies par chauffage.

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

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou 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'y a pas de Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour l'essai 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.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Se reporter à l'ISO 6887 et à la Norme internationale spécifique du produit concerné.

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 4 S'il est souhaitable pour certains produits de procéder à l'estimation de petits nombres de *B. 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 Étaler soigneusement l'inoculum le plus rapidement possible à la surface du milieu en évitant de toucher les bords de la boîte avec l'étaleur (6.10). Utiliser un étaleur 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 h à 24 h à l'étuve (6.3) réglée à 30 °C. 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 moins de 150 colonies et, si possible, au niveau de deux dilutions successives.

Compter sur chaque boîte les colonies présumées de *B. cereus*. Les colonies présumées de *B. cereus* sont grandes, roses (ne fermentant pas le mannitol, voir note 5) et presque toujours entourées d'une zone de précipité (indiquant une production de lécithinase, voir note 6).

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 10.2.2.

NOTES

5 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.

6 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.

7 Si l'on étale 1,0 ml d'inoculum en le répartissant sur trois boîtes (voir la note 4 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 à 9.4.4.