

---

---

**Microbiologie des aliments — Méthode  
horizontale pour le dénombrement des  
*Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase  
positive —**

Partie 1:

**Technique de comptage des colonies à  
44 °C au moyen de membranes et de  
5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D glucuronate**

[ISO 16649-1:2001](https://standards.iso.org/iso/16649-1:2001)

[https://standards](https://standards.iso.org/iso/16649-1:2001) *Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive Escherichia coli —*

*Part 1: Colony-count technique at 44 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronide*



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 16649-1:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85fe9b7d-62ff-40ee-8c39-4b3e25fcee4/iso-16649-1-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85fe9b7d-62ff-40ee-8c39-4b3e25fcee4/iso-16649-1-2001>

© ISO 2001

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax. + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.ch](mailto:copyright@iso.ch)  
Web [www.iso.ch](http://www.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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente partie de l'ISO 16649 peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

La Norme internationale ISO 16649-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

L'ISO 16649 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des Escherichia coli  $\beta$ -glucuronidase positive*:

- *Partie 1: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronate*
- *Partie 2: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronate*
- *Partie 3: Technique du nombre le plus probable*

## Introduction

En raison de la diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente 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, tous les efforts doivent être faits pour appliquer cette méthode horizontale chaque fois que possible.

Lors du prochain réexamen périodique de la présente partie de l'ISO 16649, il sera tenu compte de toutes les évolutions intervenues depuis sa publication et, notamment, dans quelle mesure la présente 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 la présente méthode horizontale. Lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les exigences de la présente partie de l'ISO 16649 et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

La présente Norme internationale décrit deux méthodes horizontales (ISO 16649-1 et ISO 16649-2) pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive.

L'utilisateur peut choisir aussi bien l'ISO 16649-1 que l'ISO 16649-2. Les deux parties sont d'application générale. Toutefois, il est recommandé d'utiliser l'ISO 16649-1 pour les produits susceptibles de contenir des bactéries sévèrement stressées.

ITEH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)  
ISO 16649-1:2001  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85fe9b7d-62ff-40ee-8c39-4b3e25fcee4/iso-16649-1-2001>

# Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* $\beta$ -glucuronidase positive —

## Partie 1:

## Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D glucuronate

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 16649 spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive dans des produits alimentaires destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation des animaux. Elle utilise une technique de comptage des colonies après revivification au moyen de membranes puis incubation à 44 °C sur un milieu solide contenant un substrat chromogénique pour la détection de l'enzyme  $\beta$ -glucuronidase.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85fe9b7d-62ff-40ee-8c39-4b3e25ffcee4/iso-16649-1-2001>

**AVERTISSEMENT** — Certaines souches d'*Escherichia coli* qui ne poussent pas à 44 °C et, en particulier, celles qui sont  $\beta$ -glucuronidase négative, telles que les *Escherichia coli* O157, ne peuvent pas être mises en évidence.

### 2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 16649. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente partie de l'ISO 16649 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

ISO 6887-1, *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, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.*

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 16649, les termes et définitions suivants s'appliquent.

#### 3.1

##### ***Escherichia coli* β-glucuronidase positive**

bactéries qui, à 44 °C, forment des colonies bleues caractéristiques sur le milieu tryptone-bile-glucuronide (TBX), dans les conditions spécifiées dans la présente partie de l'ISO 16649

#### 3.2

##### **dénombrement des *Escherichia coli* β-glucuronidase positive**

détermination du nombre d'unités formant colonie (UFC) d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive, par millilitre ou par gramme d'échantillon, lorsque l'essai et les calculs sont effectués selon la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 16649

### 4 Principe

4.1 Ensemencement d'une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère sur les membranes de cellulose posées sur le milieu de glutamate modifié (MMGA), puis incubation à 37 °C pendant 4 h.

Dans les mêmes conditions, ensemencement de deux boîtes par dilution, en utilisant les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou à partir de la suspension mère.

4.2 Isolement par transfert des membranes du MMGA sur le milieu tryptone-bile-glucuronide (TBX), puis incubation à 44 °C pendant 18 h à 24 h.

4.3 Calcul du nombre d'UFC d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre d'UFC bleues caractéristiques (voir l'article 10).

### 5 Diluant et milieux de culture

Pour la pratique courante en laboratoire, voir l'ISO 7218.

#### 5.1 Diluant

Voir l'ISO 6887-1 ou la Norme internationale spécifique traitant du produit à analyser.

#### 5.2 Milieux de culture

##### 5.2.1 Milieu de revivification: Milieu au glutamate modifié (MMGA)

### 5.2.1.1 Composition

Glutamate de sodium	6,35 g
Lactose	10,0 g
Formiate de sodium	0,25 g
L(-)-Cystine	0,02 g
L(-)-Acide aspartique	0,02 g
L(+)-Arginine	0,024 g
Thiamine	0,001 g
Acide nicotinique	0,001 g
Acide pantothénique	0,001 g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O)	0,100 g
Citrate de fer ammoniacal(III) <sup>a</sup>	0,010 g
Chlorure de calcium dihydraté (CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O)	0,010 g
Dihydrogénophosphate de potassium (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0,900 g
Chlorure d'ammonium	2,5 g
Agar-agar	9 g à 18 g <sup>b</sup>
Eau	1 000 ml

<sup>a</sup> Teneur en fer d'au moins 15 % (en masse).

<sup>b</sup> Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

iTech STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 5.2.1.2 Préparation

Dissoudre le chlorure d'ammonium dans l'eau. Ajouter les autres composants et porter à ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de  $6,7 \pm 0,2$  à 25 °C.

Répartir à raison de 500 ml au maximum dans des récipients appropriés (6.10).

Stériliser pendant 10 min à l'autoclave (6.1) réglé à 115 °C.

### 5.2.1.3 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Verser dans des boîtes de Petri stériles (6.11), de 12 ml à 15 ml du milieu, et laisser se solidifier.

Sécher les boîtes (voir l'ISO 7218). Les boîtes de Petri peuvent être conservées à  $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  jusqu'à 5 jours.

Il convient de laisser sécher suffisamment les boîtes pour permettre à l'humidité en excédent de disparaître dans les 15 min qui suivent l'étalement de l'inoculum (1 ml).

### 5.2.2 Milieu sélectif: milieu tryptone-bile-glucuronide (TBX)

### 5.2.2.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	20,0 g
Sels biliaires N° 3	1,5 g
Acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronique (BCIG)	144 μmol <sup>a</sup>
Sulfoxyde de diméthyle (DMSO) <sup>b</sup>	3 ml
Agar-agar	9 g à 18 g <sup>c</sup>
Eau	1 000 ml

<sup>a</sup> Soit, par exemple, 0,075 g de sel de cyclohexylammonium.

<sup>b</sup> Le sulfoxyde de diméthyle est nocif par inhalation et contact. L'utilisation d'une hotte fermée lors de sa manipulation est conseillée. Du fait de cette toxicité, un diluant recommandé par le fabricant peut être utilisé.

<sup>c</sup> Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

### 5.2.2.2 Préparation

Dissoudre le BCIG dans le sulfoxyde de diméthyle ou dans le diluant recommandé par le fabricant. Dissoudre tous les composants dans l'eau et porter à ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de  $7,2 \pm 0,2$  à 25 °C.

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

### 5.2.2.3 Préparation des boîtes de milieu sélectif

Procéder comme décrit en 5.2.1.3.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/85fe9b7d-62ff-40ee-8c39-4b3e25ffcee4/iso-16649-1-2001>  
 ISO 16649-1:2001

## 6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit.

**6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).**

**6.2 Étuves**, réglables respectivement à  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  et à  $44 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ .

**6.3 Enceinte de séchage ou étuve ventilée**, pouvant être maintenue à une température comprise entre  $25 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  et  $50 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ , ou **hotte à flux laminaire**.

**6.4 Réfrigérateur** (pour le stockage des milieux préparés), réglable à  $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$ .

**6.5 Membranes stériles et non inhibitrices**, fabriquées en acétate de cellulose ou en esters mixtes de cellulose, ayant une ouverture de pores de  $0,45 \text{ μm}$  à  $1,2 \text{ μm}$  et un diamètre de 85 mm.

**6.6 Pincés à extrémité plate**, stériles, d'environ 12 cm de longueur.

**6.7 pH-mètre**, ayant une précision de lecture de  $\pm 0,1$  unité pH.

Son seuil minimal de mesure doit être de 0,01 unité pH. Le pH-mètre doit être équipé d'un système de compensation de température soit manuel soit automatique.

**6.8 Pipettes à écoulement total**, à large ouverture et d'une capacité nominale de 1 ml, graduées en 0,1 ml.

**6.9 Éprouvettes graduées**, d'une capacité adaptée pour la préparation des milieux.



**6.10 Tubes à essai, bouteilles ou flacons**, de capacité adaptée à la stérilisation et à la conservation des milieux de culture.

**6.11 Boîtes de Petri**, de diamètre d'environ 90 mm.

**6.12 Étaleurs**, en verre ou en plastique, par exemple baguettes en verre en forme de crosses de hockey faites à partir d'une tige de verre d'environ 3,5 mm de diamètre et 20 cm de longueur, coudées à angle droit à 3 cm environ des extrémités et dont les bords de coupe sont rendus lisses par chauffage.

## 7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié pendant le transport ou le stockage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 16649. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique sur l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé aux parties concernées de conclure un accord à ce sujet.

## 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 aux parties concernées de conclure un accord à ce sujet.

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

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

[ISO 16649-1:2001](#)

[standards/sist/85fe9b7d-62ff-40ee-8c39-4b3e25f1cee4/iso-16649-1-2001](#)

Voir l'ISO 6887-1 et toute Norme internationale spécifique appropriée au produit concerné.

### 9.2 Revivification

**9.2.1** Au moyen de pinces stériles (6.6), placer de façon aseptique une membrane (6.5) sur la surface sèche de chacune des deux boîtes de milieu MMGA (5.2.1.3), en évitant d'enfermer des bulles d'air en dessous des membranes. Si nécessaire, aplatir doucement les membranes avec un étaleur stérile (6.12).

Au moyen d'une pipette stérile (6.8), transférer 1 ml de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère au centre de chaque membrane. Au moyen d'un étaleur stérile, étaler l'inoculum de façon uniforme sur toute la surface de la membrane, en évitant tout débordement hors de la membrane.

**9.2.2** Si nécessaire, répéter les opérations décrites en 9.2.1 avec les dilutions décimales suivantes, en utilisant une nouvelle pipette stérile et un nouvel étaleur pour chaque dilution.

**9.2.3** Laisser les boîtes ensemencées en position horizontale à température ambiante pendant environ 15 min jusqu'à ce que l'inoculum soit imprégné par la gélose. Incuber les boîtes pendant 4 h ± 1 h dans une étuve (6.2) réglée à 37 °C, avec la surface de la membrane/gélose tournée vers le haut.

### 9.3 Transfert sur le milieu sélectif et incubation

**9.3.1** Après la revivification, transférer, à l'aide de pinces stériles (6.6), les membranes du milieu MMGA sur les boîtes de milieu TBX (5.2.2.3).

**AVERTISSEMENT — La membrane humide adhère à la surface de la gélose. Éviter d'enfermer des bulles d'air. Ne pas utiliser d'étaleur.**