

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 16649-2:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e82de8f4-fc53-4c74-bbd5-1c1c1c3f284a/iso-16649-2-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e82de8f4-fc53-4c74-bbd5-1c1c1c3f284a/iso-16649-2-2001>

© 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
Web 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 16649-2 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 β -glucuronidase positive*:

- *Partie 1: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate*
- *Partie 2: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -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* β -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.

ITIH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 16649-2:2001
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e82de8f4-fc53-4c74-bbd5-1c1c1c3f284a/iso-16649-2-2001>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive —

Partie 2:

Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronate

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 16649 spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -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 incubation à 44 °C sur un milieu solide contenant un substrat chromogénique pour la détection de l'enzyme β -glucuronidase.

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

2 Références normatives

[ISO 16649-2:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e82de8f4-fc53-4c74-bbd5-1c1c1c3f284a/iso-16649-2-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e82de8f4-fc53-4c74-bbd5-1c1c1c3f284a/iso-16649-2-2001>

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 en double du milieu tryptone-bile-glucuronide (TBX) avec une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

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.

Incubation des boîtes à $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 18 h à 24 h pour détecter la présence de colonies qui, à partir de leurs caractéristiques, sont considérées comme étant des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive.

4.2 Calcul du nombre d'UFC d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positive par gramme ou par millilitre d'échantillon, à partir du nombre de colonies 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 Milieu de culture: Milieu tryptone-bile-glucuronide (TBX)

5.2.1 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 ^a
Sulfoxyde de diméthyle (DMSO) ^b	3 ml
Agar-agar	9 g à 18 g ^c
Eau	1 000 ml

^a Soit, par exemple, 0,075 g de sel de cyclohexylammonium.

^b 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 diluent recommandé par le fabricant peut être utilisé.

^c Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.2.2 Préparation

Dissoudre le BCIG dans le sulfoxyde de diméthyle ou dans le diluent 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 . Refroidir immédiatement le milieu dans le bain d'eau (6.3) à une température comprise entre 44 °C et 47 °C .

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 **Étuve**, réglable à $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- 6.3 **Bain d'eau**, pouvant être maintenu à une température comprise entre 44 °C et 47 °C .
- 6.4 **Tubes à essai, bouteilles ou flacons**, de capacités appropriées.
- 6.5 **Micropipettes** ou **pipettes à écoulement total**, à large ouverture et de capacités nominales de 1 ml et 10 ml, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml.
- 6.6 **Boîtes de Petri**, de diamètre d'environ 90 mm.
- 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.

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.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

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

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 À l'aide d'une pipette stérile ou d'une micropipette (6.5), transférer dans une boîte de Petri stérile (6.6) 1 ml de l'échantillon pour essai (s'il est liquide), ou 1 ml de la suspension mère (10^{-1}) dans le cas d'autres produits.

Ensemencer deux boîtes par dilution.

Si nécessaire, répéter ces opérations avec les dilutions décimales suivantes, en utilisant une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution.

9.2.2 Couler dans chaque boîte de Petri environ 15 ml du milieu TBX (5.2), refroidi préalablement dans le bain d'eau (6.3) à une température comprise entre 44 °C et 47 °C.

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

Le temps s'écoulant entre le dépôt de l'inoculum dans la boîte de Petri et l'ajout du milieu ne doit pas dépasser 15 min.

9.2.3 Retourner les boîtesensemencées (9.2.2) de façon que le bas soit tourné vers le haut et les placer dans une étuve (6.2) réglée à 44 °C pendant 18 h à 24 h. Le temps total d'incubation ne doit pas être supérieur à 24 h.

AVERTISSEMENT — Si la présence de micro-organismes stressés est soupçonnée, incuberd'abord pendant 4 h à une température de 37 °C, puis pendant 18 h à 24 h à une température de 44 °C. La température d'incubation ne doit pas dépasser 45 °C.

9.3 Comptage des unités formant colonie (UFC)

Après la période d'incubation spécifiée (9.2.3), compter les UFC caractéristiques d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive dans chaque boîte contenant moins de 150 UFC caractéristiques et moins de 300 UFC au total (UFC caractéristiques et non caractéristiques).

Si elles font partie des boîtes retenues, il convient de tenir compte des boîtes contenant 0 UFC caractéristique dans les différentes méthodes de calcul définies à l'article 10.

iTeh STANDARD PREVIEW

10 Expression des résultats (standards.iteh.ai)

10.1 Généralités

ISO 16649-2:2001

Le calcul défini en 10.2 tient compte des cas le plus fréquemment rencontrés lors de la réalisation d'essais conformément aux bonnes pratiques de laboratoire. Certains cas spéciaux, relativement improbables, peuvent se présenter (par exemple des nombres d'UFC très différents entre les deux boîtes d'une même dilution ou dans une proportion très différente de celle du facteur de dilution entre les boîtes de deux dilutions successives). Il est alors nécessaire que les résultats du comptage soient examinés, interprétés et, éventuellement, refusés par un microbiologiste compétent.

10.2 Calcul

Pour qu'un résultat soit valide, il est, en général, estimé nécessaire de compter les UFC caractéristiques sur au moins 1 boîte contenant un minimum de 15 UFC caractéristiques.

Calculer le nombre, N , d'UFC d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive présentes dans l'échantillon pour essai, par millilitre ou par gramme, comme étant la moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de l'équation suivante:

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

où

$\sum a$ est la somme des UFC comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives, dont une au moins contient au minimum 15 UFC bleues;

V est le volume d'inoculum, en millilitres, appliqué à chaque boîte;

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 facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue [$d = 1$ dans le cas où l'échantillon pour essaiensemencé directement (produits liquides) est retenu].

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs (voir l'ISO 7218).

Retenir comme résultat le nombre d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positive par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits), exprimé comme un nombre entier à deux chiffres significatifs (si inférieur à 100) ou comme un nombre situé entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

10.3 Estimation des petits nombres

10.3.1 Si les deux boîtes [au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) ou de la première dilutionensemencée ou retenue] contiennent moins de 15 UFC caractéristiques, calculer le nombre estimé, N_E , d'UFC d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positive présentes dans l'échantillon pour essai comme étant la moyenne arithmétique, Y , des UFC caractéristiques comptées sur deux boîtes parallèles, au moyen de l'équation suivante:

$$N_E = \frac{\sum c}{V \cdot n \cdot d} \quad (2)$$

où

$\sum c$ est la somme des UFC caractéristiques comptées sur les deux boîtes;

V est le volume d'inoculum, en millilitres, appliqué à chaque boîte;

n est le nombre de boîtes retenues ($n = 2$ dans ce cas);

d est le facteur de dilution de la suspension mère ou de la première dilution inoculée ou retenue [$d = 1$ dans le cas où l'échantillon pour essaiensemencé directement (produits liquides) est retenu].

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs (voir l'ISO 7218).

Exprimer les résultats comme suit:

— nombre estimé d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positive par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits): $N_E = Y$.

10.3.2 Si les deux boîtes [au niveau de l'échantillon pour essai (produits liquides) ou de la suspension mère (autres produits) de la première dilutionensemencée ou retenue] ne contiennent aucune UFC caractéristique, exprimer le résultat comme suit:

— moins de $1/d$ d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positive par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits),

où d est le facteur de dilution de la suspension mère ou de la première dilution inoculée ou retenue [$d = 1$ dans le cas où l'échantillon pour essaiensemencé directement (produits liquides) est retenu].

10.3.3 Si, pour les deux boîtes d'une première dilution d_1 , le nombre total d'UFC caractéristiques et non caractéristiques est supérieur à 300 avec des UFC bleues visibles et si, pour les deux boîtes de la dilution suivante d_2 contenant moins de 300 UFC, aucune UFC bleue n'est dénombrable, exprimer le résultat comme suit:

— moins de $1/d_2$ et plus de $1/d_1$ d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positive par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits),

où d_1 et d_2 sont les facteurs de dilution correspondant aux dilutions d_1 et d_2 .