
**Microbiologie des aliments — Méthodes
horizontales pour la recherche et le
dénombrement des
Enterobacteriaceae —**

Partie 2:
Méthode par comptage des colonies

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)
*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods
for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae —*

Part 2: Colony-count method

ISO 21528-2:2004

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004>



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 21528-2:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004>

© ISO 2004

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.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
4.1 Préparation de la suspension initiale et des dilutions décimales	2
4.2 Isolement	2
4.3 Confirmation	2
4.4 Calcul	2
5 Diluants, milieux de culture et réactifs	3
6 Appareillage et verrerie	5
7 Échantillonnage	5
8 Préparation de l'échantillon soumis à l'essai	6
9 Mode opératoire	6
9.1 Généralités	6
9.2 Prise d'essai, suspension-mère et dilutions	6
9.3 Ensemencement et incubation	6
9.4 Comptage et sélection des colonies pour confirmation	7
9.5 Repiquage des colonies sélectionnées	7
9.6 Essais de confirmation biochimique	7
10 Expression des résultats	7
11 Rapport d'essai	8
Annexe A (normative) Limites de confiance des estimations des petits nombres de colonies	9
Bibliographie	10

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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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 du présent document 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.

Cette première édition de la présente partie de l'ISO 21528, ensemble avec l'ISO 21528-1, annulent et remplacent les normes suivantes:

- ISO 5552:1997, *Viande et produits à base de viande — Recherche et dénombrement des Enterobacteriaceae sans ressuscitation — Technique de NPP et technique de comptage de colonies*;
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-4276131247f/iso-21528-2-2004>
- ISO 7402:1993, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement sans revivification des Enterobacteriaceae — Technique NPP et méthode par comptage des colonies*;
- ISO 8523:1991, *Microbiologie — Directives générales pour la recherche des Enterobacteriaceae avec pré-enrichissement*.

L'ISO 21528-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

L'ISO 21528 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des Enterobacteriaceae*:

- *Partie 1: Recherche et dénombrement à l'aide de la technique NPP avec préenrichissement*
- *Partie 2: Méthode par comptage des colonies*

Introduction

La présente partie de l'ISO 21528 se propose de fournir des directives générales pour l'examen des produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement et devant être prises en compte en considération par les organismes élaborant des méthodes d'essai microbiologiques destinées à être appliquées à des aliments. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tout leur détail, ne conviennent pas à certains produits et que, pour certains autres produits, il soit 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 partie de l'ISO 21528 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 la méthode horizontale décrite dans le présent document. Il serait souhaitable que lorsque ces normes viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente partie de l'ISO 21528 si bien que, finalement, les seules divergences restant seront celles nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

ITEH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21528-2:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21528-2:2004

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004>

Microbiologie des aliments — Méthodes horizontales pour la recherche et le dénombrement des Enterobacteriaceae —

Partie 2: Méthode par comptage des colonies

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 21528 décrit une méthode pour le dénombrement des Enterobacteriaceae sans préenrichissement. Elle est applicable

- aux produits pour l'alimentation humaine et animale, et
- aux échantillons d'environnement pour la production et la distribution des aliments.

Le dénombrement est effectué par comptage des colonies après incubation à 37 °C (ou 30 °C)¹⁾ en milieu solide.

Il est recommandé d'utiliser cette technique lorsque le nombre cherché est supposé être supérieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à essai.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004>

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 6887-1:1999, *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 6887-2, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 2: Règles spécifiques pour la préparation des viandes et produits à base de viande*

ISO 6887-3, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 3: Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche*

ISO 6887-4, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 4: Règles spécifiques pour la préparation de produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche*

1) En général, on choisit l'incubation à 37°C lorsque les entérobactéries sont recherchées en tant qu'indicateur d'hygiène. Alternativement, la température de 30°C peut être choisie lorsque le dénombrement des entérobactéries est entreprise dans le cadre d'un procédé technologique et comprend les entérobactéries psychrotrophe.

ISO 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*, et Amendement 1:2001

ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

ISO/TS 11133-2, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1 Enterobacteriaceae
microorganismes formant des colonies caractéristiques sur gélose au cristal violet, à la bile et au glucose, fermentant le glucose et donnant une réaction oxydase négative lorsque les essais sont effectués selon les méthodes spécifiées dans la présente partie de l'ISO 21528

3.2 dénombrement des Enterobacteriaceae
nombre d'Enterobacteriaceae par millilitre ou par gramme d'échantillon soumis à essai, lorsque les essais sont effectués conformément à la présente partie de l'ISO 21528

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21528-2:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004)

4 Principe
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6242f689-2aa1-47b6-bc89-a4276131247f/iso-21528-2-2004>

4.1 Préparation de la suspension initiale et des dilutions décimales

Préparation de la suspension initiale et des dilutions décimales à partir de l'échantillon soumis à essai.

4.2 Isolement

Ensemencement (technique d'ensemencement dans la masse) du milieu gélosé à la bile, au cristal violet et au glucose, 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 la suspension mère dans le cas des autres produits. Recouvrement avec une couche du même milieu.

Dans les mêmes conditions, préparation d'autres paires de boîtes avec les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation des boîtes à 37 °C (ou 30 °C)¹⁾ pendant 24 h ± 2 h.

4.3 Confirmation

Repiquage des colonies d'Enterobacteriaceae présumées sur milieu non sélectif et confirmation au moyen d'essais de fermentation de glucose et de recherche d'oxydase.

4.4 Calcul

À partir du nombre de colonies caractéristiques confirmés par boîte, calcul du nombre d'Enterobacteriaceae par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

5 Diluants, milieux de culture et réactifs

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218, l'ISO/TS 11133-1 et l'ISO/TS 11133-2.

5.1 Diluant

Voir l'ISO 6887.

5.2 Milieux de culture

5.2.1 Gélose à la bile, au cristal violet et au glucose

5.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de tissus animaux	7,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Sels biliaires N° 3	1,5 g
Glucose	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,002 g
Agar	9 g à 18 g ^a
Eau	1 000 ml
^a Selon le pouvoir gélifiant de l'agar.	

ISO 21528-2:2004

5.2.1.2 Préparation

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après ébullition, il soit de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des fioles stériles (6.5) de 500 ml de capacité maximale.

Ne pas stériliser le milieu.

Utiliser le milieu fondu dans les 4 h suivant sa préparation.

5.2.1.3 Essai de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture

Se reporter à l'ISO/TS 11133-1 pour les définitions des termes sélectivité et productivité. Se reporter à l'ISO/TS 11133-2:2003, Tableau B.1, afin de conduire les essais de performance.

5.2.2 Gélose nutritive

5.2.2.1 Composition

Extrait de viande	3,0 g
Digestat enzymatique de tissus animaux	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar	9 g à 18 g ^a
Eau	1 000 ml
^a Selon le pouvoir gélifiant de l'agar.	