
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour le dénombrement de
Bacillus cereus présumés en petit
nombre — Technique du nombre le plus
probable et méthode de recherche**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* —
Most probable number technique and detection method*

ISO 21871:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0dd036ae-0f6c-47e9-aca8-963c226ef120/iso-21871-2006>



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 21871:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0dd036ae-0f6c-47e9-aca8-963c226ef120/iso-21871-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0dd036ae-0f6c-47e9-aca8-963c226ef120/iso-21871-2006>

© ISO 2006

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	1
4 Principe	2
4.1 Méthode de dénombrement	2
4.2 Méthode de recherche	2
5 Diluant, milieu de culture et réactifs	2
5.1 Généralités	2
5.2 Diluant	2
5.3 Milieu d'enrichissement sélectif liquide: bouillon de tryptone, soja et polymyxine (TSPB)	3
5.4 Milieu sélectif solide: gélose à la polymyxine, au pyruvate, au jaune d'œuf et au bleu de bromothymol (PEMBA)	4
5.5 Milieu sélectif solide: gélose au mannitol, au jaune d'œuf et à la polymyxine (MYP)	6
5.6 Solutions de coloration pour l'identification au microscope	7
5.7 Gélose au sang de mouton	8
6 Appareillage et verrerie	9
7 Échantillonnage	9
8 Préparation de l'échantillon pour essai	10
9 Mode opératoire	10
9.1 Méthode de dénombrement	10
9.2 Méthode de recherche	12
10 Calcul et expression des résultats	12
10.1 Méthode de dénombrement pour la détermination du nombre le plus probable (MPN)	12
10.2 Méthode de recherche	13
11 Rapport d'essai	13
Annexe A (normative) Représentation schématique du mode opératoire de dénombrement	14
Bibliographie	15

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.

L'ISO 21871 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 21871:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0dd036ae-0f6c-47e9-aca8-963c226ef120/iso-21871-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0dd036ae-0f6c-47e9-aca8-963c226ef120/iso-21871-2006>

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que la présente méthode horizontale ne convienne pas exactement, dans tous ses détails, à certains produits. Dans ce cas, d'autres méthodes spécifiques des produits concernés peuvent être employées, si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques. Dans la mesure du possible, il convient néanmoins de s'efforcer d'appliquer la méthode horizontale.

À la prochaine révision de la présente Norme internationale, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là sur l'ampleur avec laquelle la présente méthode horizontale aura été suivie et sur 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 instantanée et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou nationales ne concordant pas avec la présente méthode horizontale existent peut-être déjà. Lors de la révision de telles normes, il serait souhaitable de les aligner sur la présente Norme internationale de sorte qu'à terme, les seules divergences restantes se limitent à celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 21871:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0dd036ae-0f6c-47e9-aca8-963c226ef120/iso-21871-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0dd036ae-0f6c-47e9-aca8-963c226ef120/iso-21871-2006>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 21871:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0dd036ae-0f6c-47e9-aca8-963c226ef120/iso-21871-2006>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présumés en petit nombre — Technique du nombre le plus probable et méthode de recherche

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale pour la recherche ou le dénombrement de *Bacillus cereus* présumés viables en petit nombre par la technique du nombre le plus probable. La présente Norme internationale s'applique

- aux produits destinés à la consommation humaine ou animale, et
- aux échantillons d'environnement du secteur agroalimentaire.

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 (toutes les parties), *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

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

***Bacillus cereus* présumé**

microorganisme formant à la surface d'un milieu de culture sélectif des colonies, caractéristiques ou non, et qui donne des réactions de confirmation positives quand les essais sont effectués selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

NOTE Pour les besoins d'une méthode d'essai pratique, cette définition des *Bacillus cereus* présumés, sur laquelle repose le mode opératoire, ne couvre pas uniquement les souches de *Bacillus cereus*. L'essai de confirmation ne permet notamment pas de distinguer les *Bacillus cereus* des autres espèces de *Bacillus* étroitement apparentées mais moins communément rencontrées comme les *Bacillus weihenstephanensis*, *Bacillus anthracis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycooides*.

4 Principe

4.1 Méthode de dénombrement

4.1.1 Ensemencement de trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif liquide double concentration [5.3.1.1 a)] avec une quantité déterminée de la dilution primaire (suspension mère).

4.1.2 Ensemencement de trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif liquide simple concentration [5.3.1.1 b)] avec une quantité déterminée de la dilution primaire (suspension mère). Puis, dans les mêmes conditions, ensemencement du milieu d'enrichissement sélectif liquide simple concentration [5.3.1.1 b)] avec des quantités déterminées des différentes dilutions décimales de la dilution primaire (suspension mère).

4.1.3 Incubation des tubes de milieu d'enrichissement sélectif liquide double et simple concentration (5.3) pendant 48 h à 30 °C.

4.1.4 Ensemencement du milieu sélectif solide (5.4 ou 5.5) à partir de milieu d'enrichissement sélectif liquide (5.3).

4.1.5 Incubation du milieu sélectif solide (5.4 ou 5.5) pendant 18 h à 48 h à 37 °C (5.4) ou à 30 °C (5.5) et examen des boîtes pour s'assurer de la présence de colonies qui sont considérées, du point de vue de leurs caractéristiques, comme devant être des *Bacillus cereus* présumés.

4.1.6 Confirmation des colonies suspectes au moyen d'un test à l'hémolyse (9.1.5.3) ou par un examen microscopique (9.1.5.4).

4.1.7 Calcul du nombre le plus probable de *Bacillus cereus* présumés par gramme ou par millilitre d'échantillon en fonction des tables des nombres les plus probables (NPP).

4.2 Méthode de recherche

4.2.1 Ensemencement du milieu d'enrichissement sélectif (5.3) avec une quantité spécifiée de la suspension initiale de l'échantillon à soumettre à l'essai.

4.2.2 Incubation du tube pendant 48 h à 30 °C.

4.2.3 Inoculation du milieu sélectif solide (5.4 ou 5.5) à partir du milieu liquide d'enrichissement sélectif (5.3).

4.2.4 Incubation du milieu sélectif solide (5.4 ou 5.5) pendant 18 h à 48 h à 37 °C (5.4) ou à 30 °C (5.5) et examen des boîtes pour s'assurer de la présence de colonies qui sont considérées, du point de vue de leurs caractéristiques, comme devant être des *Bacillus cereus* présumés.

4.2.5 Confirmation des colonies suspectes au moyen d'un test à l'hémolyse (9.1.5.3) ou par un examen microscopique (9.1.5.4).

4.2.6 Les résultats sont donnés par «présence» ou «absence» de *Bacillus cereus* présumés dans des grammes ou des millilitres de produit.

5 Diluant, milieu de culture et réactifs

5.1 Généralités

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

5.2 Diluant

Voir l'ISO 6887 (toutes les parties), l'ISO 8261 et toute norme spécifique du produit à examiner.

5.3 Milieu d'enrichissement sélectif liquide: bouillon de tryptone, soja et polymyxine (TSPB) (voir Référence [1])

5.3.1 Milieu de base

5.3.1.1 Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
Extrait enzymatique de caséine	34,0 g	17,0 g
Extrait enzymatique de soja	6,0 g	3,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	10,0 g	5,0 g
Glucose	5,0 g	2,5 g
Hydrogénophosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)	5,0 g	2,5 g
Eau	1 000 ml	1 000 ml

5.3.1.2 Préparation

Dissoudre les ingrédients ou le milieu de base complet dans de l'eau en chauffant et en agitant. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C.

Répartir le milieu par quantités de 10 ml [milieu double concentration (5.3.1.1 a)] et 9 ml [milieu simple concentration (5.3.1.1 b)] dans des tubes à essai d'approximativement [par exemple 16 mm × 160 mm (6.7)].

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

5.3.2 Solution de sulfate de polymyxine B

5.3.2.1 Composition

Sulfate de polymyxine B	500 000 unités (l'équivalent d'environ 0,05 g)
Eau	50 ml

5.3.2.2 Préparation

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

5.3.3 Milieu complet

Juste avant l'emploi, ajouter 200 µl (de milieu double concentration) ou 100 µl (de milieu simple concentration) de la solution de sulfate de polymyxine B (5.3.2) dans chacun des tubes contenant le milieu de base (5.3.1).

5.3.4 Essais de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture

Se reporter à l'ISO/TS 11133-2 pour les définitions de la sélectivité et de la productivité. Le Tableau 1 présente les essais de performance applicables au bouillon de tryptone, soja et polymyxine (TSPB).

Tableau 1 — Essais de performance sur le bouillon de tryptone, soja et polymyxine (TSPB)

Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Méthode de contrôle	Critères	Réactions caractéristiques
Productivité	48 h à 30 °C	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 ou la même souche, enregistrée dans d'autres collections	Semi-quantitative	≥ 10 ufc sur PEMBA ou MYP	Colonies caractéristiques sur PEMBA ou MYP (voir en 5.4.5 ou 5.5.6)
Sélectivité	48 h à 30 °C	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ou 8739 ou la même souche, enregistrée dans d'autres collections	Semi-quantitative	Inhibition totale	—

5.4 Milieu sélectif solide: gélose à la polymyxine, au pyruvate, au jaune d'œuf et au bleu de bromothymol (PEMBA) (voir Référence [2])

5.4.1 Milieu de base

5.4.1.1 Composition

Extrait enzymatique de caséine	1,0 g
D-Mannitol	10,0 g
Pyruvate de sodium	10,0 g
Sulfate de magnésium, MgSO ₄ , 7 H ₂ O	0,1 g
Chlorure de sodium	2,0 g
Hydrogénophosphate disodique (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	0,25 g
Bleu de bromothymol	0,12 g
Agar-agar	9 g à 18 g ^a
Eau	940 ml

^a En fonction du pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.4.1.2 Préparation

Dissoudre les constituants ou le milieu de base complet déshydraté dans de l'eau en chauffant et en agitant.

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

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

5.4.2 Solution de sulfate de polymyxine B

Préparer comme décrit en 5.3.2.

5.4.3 Émulsion de jaune d'œuf

Utiliser des œufs de poule frais et propres, à la coquille intacte. Nettoyer les œufs dans du détergent liquide au moyen d'une brosse. Les rincer à l'eau courante, les plonger dans de l'éthanol à 70 % (fraction volumique) pendant 30 s et les sécher. En travaillant en asepsie, casser chaque œuf et séparer le jaune du blanc par transferts répétés du jaune d'une demi-coquille à l'autre. Placer les jaunes dans une éprouvette graduée stérile et ajouter quatre parties, en volume, d'eau stérile. Transférer de façon aseptique dans un flacon stérile (6.7) et mélanger vigoureusement.

Réchauffer le mélange à l'aide d'un bain d'eau (6.4) réglé à 47 °C pendant 2 h. Entreposer ensuite pendant 18 h à 24 h à 3 °C ± 2 °C pour permettre au précipité de se former.

Recueillir aseptiquement l'émulsion surnageante.

L'émulsion peut être conservée à 3 °C ± 2 °C au maximum pendant 72 h.

Les deux milieux sélectifs solides décrits dans la présente Norme internationale ont d'abord été préparés à partir d'une émulsion de jaune d'œuf à 20 % préparée selon la Référence [3]. Des émulsions de jaune d'œuf prêtes à l'emploi sont aujourd'hui disponibles dans le commerce, parfois à d'autres concentrations. Elles peuvent être utilisées. Toutefois, les instructions du fabricant, en particulier celles concernant la durée de conservation, doivent être suivies. De plus, des dispositions doivent être prises pour s'assurer que les émulsions en question sont compatibles avec les milieux de culture décrits en 5.4 et 5.5.

5.4.4 Milieu complet (gélose PEMBA)

5.4.4.1 Composition

Milieu de base (5.4.1)	940 ml
Solution de sulfate de polymyxine B (5.4.2)	10 ml
Émulsion de jaune d'œuf (5.4.3)	50 ml

5.4.4.2 Préparation

Fondre le milieu de base et le refroidir à l'aide d'un bain d'eau (6.4) réglé à 47 °C.

Porter les autres constituants à cette même température, puis les ajouter un à un tout en remuant en continu.

5.4.4.3 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Couler environ 12,5 ml de milieu complet dans des boîtes de Petri (6.9) et les laisser se solidifier.

NOTE Pour des raisons techniques^[2], on utilise 12,5 ml au lieu des 15 ml usuels.

Les boîtes peuvent être conservées jusqu'à quatre jours à 3 °C ± 2 °C, avant le séchage.

Juste avant l'emploi, sécher les boîtes dans une enceinte de séchage ou une étuve (6.2) réglée entre 25 °C et 50 °C jusqu'à ce que la surface de la gélose soit sèche, de préférence après avoir retiré les couvercles et retourné les boîtes.

5.4.5 Essais de performance pour l'assurance qualité du milieu de culture

Se reporter à l'ISO/TS 11133-2 pour les définitions de la sélectivité et de la productivité. Le Tableau 2 présente les essais de performance applicables à la gélose au pyruvate, à la polymyxine, au jaune d'œuf, au mannitol et au bleu de bromothymol (PEMBA).

Tableau 2 — Essai de performance de la gélose au pyruvate, à la polymyxine, au jaune d'œuf, au mannitol et au bleu de bromothymol (PEMBA)

Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Méthode de contrôle	Critères	Réactions caractéristiques
Productivité	18 h à 48 h à 37 °C	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 ou la même souche, enregistrée dans d'autres collections	Qualitative	Bonne croissance	Colonies bleu turquoise avec un halo de précipitation
Sélectivité	18 h à 48 h à 37 °C	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ou 8739 ou la même souche, enregistrée dans d'autres collections	Qualitative	Inhibition totale	—