
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour le dénombrement de
Bacillus cereus présomptifs — Technique
par comptage des colonies à 30 °C**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the enumeration of presumptive Bacillus cereus — Colony-count
technique at 30 °C*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 7932:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4fe512f/iso-7932-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4fe512f/iso-7932-2004>



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 7932:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4fe512f/iso-7932-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4fe512f/iso-7932-2004>

© 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
0 Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives.....	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Diluant, milieux de culture et réactifs	2
6 Appareillage et verrerie	4
7 Échantillonnage	5
8 Préparation de l'échantillon pour l'essai	5
9 Mode opératoire	5
9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions	5
9.2 Ensemencement et incubation	5
9.3 Comptage des colonies	6
9.4 Confirmation	6
10 Expression des résultats.....	7
10.1 Comptage des colonies de <i>B. cereus</i> présumptifs	7
10.2 Aucune colonie	7
10.3 Fidélité.....	7
11 Rapport d'essai	8
Annexe A (normative) Limites de confiance des estimations des petits nombres de colonies	9
Annexe B (informative) Résultats de l'essai interlaboratoires.....	10
Bibliographie	13

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 7932 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 7932:1993) et le Rectificatif technique 1 (ISO 7932:1993/Cor.1:1997).

Dans la présente édition, les essais de confirmation [gélose MYP (mannitol/jaune d'œuf/polymyxine), fermentation du glucose, réaction de Voges-Proskauer et réduction des nitrates] sont remplacés par les suivants:

- hémolyse;
- gélose MYP.

La présente édition introduit des données de fidélité obtenues lors d'un essai interlaboratoires basé sur l'ISO 7932:1993 avec les essais de confirmation suivants: gélose MYP, fermentation du glucose, réaction de Voges-Proskauer et réduction des nitrates.

0 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 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 10 min à 80 °C.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7932:2004

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4fe512f/iso-7932-2004>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs — Technique par comptage des colonies à 30 °C

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs revivifiables par comptage des colonies à 30 °C. Elle est applicable aux

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

NOTE Dans le but de mettre en œuvre une méthode pratique, l'étape de confirmation consiste uniquement à la caractérisation des colonies sur le milieu MYP et au test de l'hémolyse. Le terme «présomptif» a donc été introduit de façon à souligner le fait que l'étape de confirmation ne permet pas de faire la différence entre *B. cereus* et d'autres espèces proches mais néanmoins moins rencontrées, comme *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides*. Un test de mobilité effectué en plus peut toutefois aider à la différenciation entre *B. cereus* et *B. anthracis*, dans les cas où la présence de ce dernier est suspectée.

2 Références normatives

[ISO 7932:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4f1e512f/iso-7932-2004)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4f1e512f/iso-7932-2004)

[0ddb4f1e512f/iso-7932-2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4f1e512f/iso-7932-2004)

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

ISO/TS 11133-2:2003, *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* présomptifs**

micro-organisme qui forme des colonies typiques à la surface d'un milieu de culture sélectif et qui donne une réaction de confirmation positive (quand les essais sont exécutés selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale)

NOTE Voir la Note de l'Article 1.

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

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

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

5.1 Diluant

Voir l'ISO 6887-1 et la norme spécifique du produit à analyser.

5.2 Milieu gélosé (voir [1])

5.2.1 Milieu de base

5.2.1.1 Composition <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4f1e512f/iso-7932-2004>

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

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

5.2.1.2 Préparation

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte que le pH du milieu complet (5.2.4), après stérilisation, soit égal à $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C.

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

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

5.2.2 Solution de polymyxine B

5.2.2.1 Composition

Sulfate de polymyxine B	10 ⁶ UI
Eau	100 ml

5.2.2.2 Préparation

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

5.2.3 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 % (fraction volumique) 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 ajouter quatre parties en volume d'eau stérile. Transférer de façon aseptique dans un flacon stérile et mélanger vigoureusement.

Porter le mélange au bain d'eau (6.4) réglé entre 44 °C et 47 °C pendant 2 h et entreposer à 5 °C ± 3 °C pendant 18 h à 24 h pour permettre au précipité de se former.

Recueillir aseptiquement l'émulsion surnageante.

L'émulsion peut être conservée à 5 °C ± 3 °C au maximum pendant 72 h.

5.2.4 Milieu complet (agar-agar MYP) ISO 7932:2004

5.2.4.1 Composition

Milieu de base (5.2.1)	90 ml
Solution de polymyxine B (5.2.2)	1,0 ml
Émulsion de jaune d'œuf (5.2.3)	10,0 ml

5.2.4.2 Préparation

Faire fondre le milieu de base puis le refroidir au bain d'eau (6.4) réglé entre 44 °C et 47 °C.

Ajouter les autres liquides en mélangeant soigneusement après chaque addition.

Refroidir le milieu complet dans un bain d'eau (6.4) réglé entre 44 °C et 47 °C.

5.2.5 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Couler 15 ml à 20 ml de milieu complet (5.2.4) dans des boîtes de Petri (6.6) stériles et laisser se solidifier.

Les boîtes peuvent être conservées, avant séchage, jusqu'à 4 jours au maximum à 5 °C ± 3 °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 à une température comprise entre 37 °C et 55 °C jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

5.2.6 Essais de performance

Voir l'ISO/TS 11133:2003, Annexe B.

5.3 Gélose au sang de mouton

5.3.1 Milieu de base: Sang base n° 2

5.3.1.1 Composition

Protéose peptone ou peptone équivalente	15 g
Hydrolysate de foie	2,5 g
Extrait de levure	5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Agar-agar	12 g à 18 g ^a
Eau	1 000 ml

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

5.3.1.2 Préparation

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

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

Répartir le milieu dans des flacons et stériliser à 121 °C pendant 15 min.

5.3.2 Sang de mouton défibriné

[ISO 7932:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4f1e512f/iso-7932-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0ddb4f1e512f/iso-7932-2004>

5.3.2.1 Milieu complet

5.3.2.1.1 Composition

Milieu de base (5.3.1)	100 ml
Sang de mouton défibriné	5 ml à 7 ml

5.3.2.1.2 Préparation

Refroidir le milieu de base (5.3.1) à une température comprise entre 44 °C et 47 °C, puis ajouter le sang de mouton défibriné. Mélanger.

Verser au moins 12 ml de milieu complet dans les boîtes de Petri stériles (6.6) et laisser solidifier.

6 Appareillage et verrerie

NOTE Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses 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 à une température comprise entre $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $55\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.3 Étuve, réglable à $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4 Bains d'eau, réglables de 44 °C à 47 °C .

6.5 pH-mètre, ayant une précision de réglage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .

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

6.7 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 et ayant une ouverture nominale de 2 mm à 3 mm.

6.8 Étaleurs en verre ou en plastique (type crosse de hockey), d'environ 3,5 mm de diamètre et 20 cm de longueur, coudés à angle droit à environ 3 cm de l'une de leurs extrémités; les extrémités coupées doivent être polies par chauffage.

7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ni 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/142c2e41-f666-4e53-9b99-0d0b41f63127/iso-7932-2004>

8 Préparation de l'échantillon pour l'essai

Préparer l'échantillon pour 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 6887-1 et à la Norme internationale spécifique du produit concerné.

9.2 Ensemencement et incubation

9.2.1 Transférer, avec une pipette stérile (6.7), 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 milieu gélosé (5.2.5). Répéter l'opération avec les dilutions décimales suivantes si nécessaire.

9.2.2 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 (6.8) 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.