
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour le dénombrement des
levures et moisissures —**

Partie 2:
**Technique par comptage des colonies
dans les produits à activité d'eau
inférieure ou égale à 0,95**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the enumeration of yeasts and moulds —*

*Part 2: Colony count technique in products with water activity less than
or equal to 0,95*



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 21527-2:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b0fca40-f356-488a-8b9b-bd2ae5e787bd/iso-21527-2-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b0fca40-f356-488a-8b9b-bd2ae5e787bd/iso-21527-2-2008>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2008

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

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 21527-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

L'ISO 21527 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures*:

- *Partie 1: Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95*
- *Partie 2: Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau inférieure ou égale à 0,95*

La présente partie de l'ISO 21527, conjointement avec l'ISO 21527-1 annule et remplace l'ISO 7698:1990, l'ISO 7954:1987 et l'ISO 13681:1995.

Introduction

En raison de la grande diversité des produits alimentaires, il est possible que l'application de la méthode horizontale spécifiée dans l'ISO 21527 (toutes les parties) ne soit pas appropriée à certains produits. Dans ce cas, il est possible d'employer des méthodes différentes, spécifiques à ces produits, si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques justifiées. Néanmoins, tous les efforts doivent être faits pour appliquer la méthode horizontale, comme spécifié dans l'ISO 21527 (toutes les parties), dans la mesure du possible.

Lorsque l'ISO 21527 (toutes les parties) sera réexaminée, il sera tenu compte de toutes les informations disponibles à ce moment-là, pour estimer dans quelle mesure cette méthode horizontale aura été suivie 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, qui ne sont pas conformes à la méthode horizontale spécifiée dans l'ISO 21527 (toutes les parties), existent peut-être déjà. Il est souhaitable que ces normes soient modifiées de façon à se conformer à l'ISO 21527 (toutes les parties) lors de leur révision, afin que, finalement, les seules déviations qui restent soient celles nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 21527-2:2008](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b0fca40-f356-488a-8b9b-bd2ae5e787bd/iso-21527-2-2008)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2b0fca40-f356-488a-8b9b-bd2ae5e787bd/iso-21527-2-2008>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures —

Partie 2:

Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau inférieure ou égale à 0,95

AVERTISSEMENT — Il est essentiel que le dénombrement des moisissures soit effectué avec le plus grand soin pour protéger l'opérateur et pour empêcher la contamination de l'atmosphère par des spores de moisissures.

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 21527 spécifie une méthode horizontale de dénombrement des levures osmophiles et des moisissures xérophiles dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation des animaux, dont l'activité de l'eau est inférieure ou égale à 0,95 [fruits secs, gâteaux, confitures, viande séchée, poisson salé, grains, céréales et produits à base de céréales, farines, noix, épices et condiments, etc. (voir Annexe A)], au moyen de la technique par comptage des colonies à 25 °C ± 1 °C (Référence [3]).

La présente partie de l'ISO 21527 ne s'applique pas aux produits déshydratés dont l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0,60 (céréales déshydratées, produits oléagineux, épices, légumineuses, graines, poudres pour boissons instantanées, produits anhydres pour animaux domestiques, etc.) et ne permet pas le dénombrement des spores de moisissures (Référence [3]). La présente partie de l'ISO 21527 ne s'applique pas à l'identification de la flore fongique ou à l'examen des aliments pour la recherche de mycotoxines. La méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 21527 n'est pas appropriée au dénombrement des moisissures halophiles xérophiles (c'est-à-dire *Polypaecilum pisce*, *Basipetospora halophila*), pouvant notamment se trouver sur le poisson séché.

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 — Exigences générales et recommandations*

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 (toutes les parties), *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture*

ISO 21527-1, *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et moisissures — Partie 1: Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans l'ISO 21527-1 ainsi que les suivants s'appliquent.

3.1

levure osmophile

moisissure xérophile

champignon capable de se développer avec une activité d'eau inférieure ou égale à 0,95

4 Principe

4.1 Des boîtes de Petri préparées en utilisant un milieu de culture sélectif défini sont ensemencées. En fonction du nombre de colonies attendu, une quantité spécifique de l'échantillon pour essai (si le produit est liquide) ou de la suspension mère (dans le cas d'autres produits) ou des dilutions décimales de l'échantillon/suspension sont utilisées.

Des boîtes supplémentaires peuvent être ensemencées dans les mêmes conditions; en utilisant des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.2 Les boîtes sont ensuite mises à incuber en aérobiose à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant cinq jours à sept jours. Puis, si nécessaire, les boîtes de gélose sont laissées au repos à la lumière du jour pendant un jour à deux jours.

4.3 Les colonies/propagules sont alors comptées et, si nécessaire (pour distinguer les colonies de levures des colonies de bactéries), l'identité des colonies douteuses est confirmée par examen à la loupe binoculaire ou au microscope.

4.4 Le nombre de levures et de moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon est calculé à partir du nombre de colonies/propagules/germes obtenus sur les boîtes choisies à des taux de dilution permettant d'obtenir des colonies pouvant être dénombrées. Les moisissures et les levures sont comptées séparément, si nécessaire.

5 Diluant et milieu de culture

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO/TS 11133 (toutes les parties).

5.1 Diluant

5.1.1 Généralités

Voir l'ISO 6887 (toutes les parties), l'ISO 8261 et la Norme internationale spécifique portant sur le produit concerné.

L'utilisation d'un diluant comportant une quantité suffisante de soluté [par exemple une solution de 20 % à 35 % (concentration en masse) de glycérol ou de D-glucose] est recommandée pour réduire le choc osmotique des moisissures xérophiles et des levures osmophiles lorsque des dilutions en série sont effectuées avant l'ensemencement (Références [1], [3]).

NOTE Il est possible d'ajouter des agents tensioactifs, tels que le poly(oxyéthylène) sorbitan monooléate [par exemple Tween 80¹⁾] (0,05 % concentration en masse) pour réduire l'agglutination des spores de moisissures et des conidies (Référence [3]).

1) Tween 80 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

Sauf dans le cas d'une préparation spécifique de l'échantillon pour essai, il est recommandé d'utiliser de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse) comme diluant.

5.1.2 Composition de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse)

Digestat enzymatique de tissus animaux et végétaux	1,0 g
Eau	1 000 ml

5.1.3 Préparation de l'eau peptonée à 0,1 % (concentration en masse)

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de manière qu'après stérilisation celui-ci soit de $7,0 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.2 Milieu de culture

5.2.1 Gélose dichloran à 18 % (concentration en masse) de glycérol (DG18) (Références [4], [5], [6])

5.2.1.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	5,0 g
D-Glucose ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$)	10,0 g
Phosphate monopotassique (KH_2PO_4)	1,0 g
Sulfate de magnésium ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitro-aniline)	0,002 g
Glycérol anhydre	220 g
Gélose	12 g à 15 g ^a
Chloramphénicol	0,1 g
Eau, distillée ou déionisée	1 000 ml
^a En fonction du pouvoir gélifiant de la gélose.	

5.2.1.2 Préparation

5.2.1.2.1 Généralités

Mettre tous les ingrédients, excepté le chloramphénicol, en suspension dans l'eau et porter à ébullition pour dissoudre complètement. Si nécessaire, ajuster le pH (6.4), de sorte qu'après stérilisation, il soit de $5,6 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ajouter 10 ml de solution à 1 % (concentration en masse) dans l'éthanol de chloramphénicol et mélanger. Répartir le milieu dans des récipients appropriés (6.5). Stériliser à l'autoclave à $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 15 min.

Refroidir immédiatement le milieu dans un bain-marie (6.3) maintenu à une température comprise entre $44\text{ }^{\circ}\text{C}$ et $47\text{ }^{\circ}\text{C}$. Refroidir à une température inférieure à $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ et répartir par portions de 15 ml dans des boîtes de Petri stériles (6.6).

Laisser le milieu se solidifier et sécher, si nécessaire, la surface des boîtes, comme décrit dans l'ISO 7218 et l'ISO/TS 11133 (toutes les parties).

Utiliser immédiatement ou conserver dans l'obscurité, conformément à l'ISO/TS 11133 (toutes les parties), jusqu'au moment voulu.

ATTENTION — Éviter l'exposition du milieu à la lumière, car les produits de décomposition cytotoxiques peuvent causer la sous-évaluation de la mycoflore dans les échantillons.

5.2.1.2.2 Addition facultative de chlorhydrate de chlortétracycline

Lorsque la prolifération bactérienne peut représenter un problème, il est recommandé d'utiliser le chloramphénicol (50 mg/l) et la chlortétracycline (50 mg/l). Dans ce cas, préparer le milieu de base, comme décrit ci-dessus, avec seulement 50 mg de chloramphénicol, le répartir par quantités de 100 ml et stériliser. Préparer également une solution avec 0,1 % (concentration en masse) de chlorhydrate de chlortétracycline dans de l'eau (relativement instable en solution, elle doit être préparée extemporanément) et stériliser par filtration. Juste avant l'utilisation, ajouter 5 ml de cette solution de manière stérile à 100 ml du milieu de base et verser dans les boîtes. La gentamicine est déconseillée, car elle peut causer l'inhibition de certaines espèces de levures (Référence [3]).

5.2.1.2.3 Addition facultative d'éléments trace

Pour que les moisissures présentent toute leur morphologie, notamment tous les pigments qu'elles produisent habituellement, elles ont besoin d'éléments trace qui ne sont pas présents dans le DG18. Pour identifier les moisissures dans ce milieu, ajouter la solution d'élément trace suivante à 1 ml par litre de milieu, avant passage à l'autoclave: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,5 g; 100 ml (Référence [2]) d'eau, distillée ou déionisée.

5.2.1.3 Essai de performance pour l'assurance de qualité du milieu de culture (standards.iteh.ai)

5.2.1.3.1 Généralités

Le milieu DG18 est un milieu solide. La productivité et la sélectivité doivent être soumises à essai conformément à l'ISO/TS 11133 (toutes les parties) selon les spécifications suivantes:

5.2.1.3.2 Productivité

Incubation:	cinq jours à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$
Souches:	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763 <i>Wallemia sebi</i> ATCC 42694 <i>Aspergillus restrictus</i> ATCC 42693 <i>Eurotium rubrum</i> ATCC 42690 ou souches enregistrées comme équivalentes dans d'autres collections de fongiques
Milieux de référence:	milieux de culture SDA («Sabouraud Dextrose Agar») déjà validés
Méthode de contrôle:	quantitative
Critères:	rapport de productivité, $P_R \geq 0,5$
Réaction caractéristique:	colonies/propagules/germes caractéristiques selon chaque espèce

5.2.1.3.3 Sélectivité

Incubation:	cinq jours à 25 °C ± 1 °C
Souches:	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ou <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 ou souches enregistrées comme équivalentes dans d'autres collections de bactéries
Méthode de contrôle:	qualitative
Critères:	inhibition totale

6 Appareillage et verrerie

L'utilisation de matériel à usage unique est une alternative acceptable à l'utilisation de verrerie réutilisable, à condition qu'il réponde aux exigences spécifiées.

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

- 6.1 Étuve**, pouvant fonctionner à 25 °C ± 1 °C.
- 6.2 Pipettes à écoulement total**, stériles, d'une capacité nominale de 1 ml et graduées en 0,1 ml.
- 6.3 Bain-marie**, ou appareillage similaire, pouvant fonctionner de 44 °C à 47 °C.
- 6.4 pH-mètre**, précis à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.
- 6.5 Bouteilles, fioles et tubes**, pour bouillir et conserver les milieux de culture et pour effectuer des dilutions.
- 6.6 Boîtes de Petri**, stériles, en verre ou en plastique, de 90 mm à 100 mm de diamètre.
- 6.7 Microscope**, pour distinguer les levures des cellules bactériennes (fond clair, grossissement ×250 à ×1 000).
- 6.8 Étaleurs**, en verre ou en plastique (diamètre inférieur à 2 mm et de longueur 80 mm). Il convient que le diamètre des étaleurs ne dépasse pas 2 mm afin de minimiser la quantité d'échantillon y adhérant à la fin de l'étalement.
- 6.9 Loupe binoculaire**, (grossissement de ×6,5 à ×50) pour distinguer et différencier les colonies/cellules des levures et moisissures.

7 Échantillonnage

Il convient qu'un échantillon représentatif, non endommagé ou altéré au cours du transport ou de l'entreposage, ait été envoyé au laboratoire. L'échantillon pour laboratoire ne doit pas être congelé.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 21527. Il convient que l'échantillonnage soit effectué conformément à la Norme internationale spécifique appropriée au produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.