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

Partie 3:

**Technique du nombre le plus probable
utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3
 β -D-glucuronate**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli —
Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-
indolyl- β -D-glucuronide*



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/TS 16649-3:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f35e148c-e2c9-4431-ab8c-62f7e952857a/iso-ts-16649-3-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f35e148c-e2c9-4431-ab8c-62f7e952857a/iso-ts-16649-3-2005>

© ISO 2005

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.

Dans d'autres circonstances, en particulier lorsqu'il existe une demande urgente du marché, un comité technique peut décider de publier d'autres types de documents normatifs:

- une Spécification publiquement disponible ISO (ISO/PAS) représente un accord entre les experts dans un groupe de travail ISO et est acceptée pour publication si elle est approuvée par plus de 50 % des membres votants du comité dont relève le groupe de travail;
- une Spécification technique ISO (ISO/TS) représente un accord entre les membres d'un comité technique et est acceptée pour publication si elle est approuvée par 2/3 des membres votants du comité.

Une ISO/PAS ou ISO/TS fait l'objet d'un examen après trois ans afin de décider si elle est confirmée pour trois nouvelles années, révisée pour devenir une Norme internationale, ou annulée. Lorsqu'une ISO/PAS ou ISO/TS a été confirmée, elle fait l'objet d'un nouvel examen après trois ans qui décidera soit de sa transformation en Norme internationale soit de son annulation.

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/TS 16649-3 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 utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3 β -D-glucuronate (Spécification technique)*

Introduction

La présente Spécification technique a pour but de fournir un guide général pour l'examen des produits qui ne font pas l'objet de Normes internationales existantes; elle doit être prise en compte par les organismes qui élaborent les méthodes d'essai microbiologiques destinées à être appliquées aux produits alimentaires pour la consommation humaine ou l'alimentation des animaux. En raison de la diversité des produits relevant de ce domaine d'application, il est possible que ces lignes directrices ne soient pas applicables dans tous les détails à certains produits. Pour certains autres produits, il peut être nécessaire d'utiliser des méthodes différentes. Néanmoins, il est souhaitable de s'efforcer dans tous les cas d'appliquer ces lignes directrices chaque fois que possible, et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

Lors du prochain réexamen périodique de la présente Spécification technique, il sera tenu compte de toutes les informations indiquant dans quelle mesure les lignes directrices ont été suivies, ainsi que des 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 ces lignes directrices. Dans les cas où il existe déjà des Normes internationales pour le produit à soumettre à essai, il convient de les suivre, mais lorsque de telles normes viendront en révision, il serait souhaitable de les aligner avec les exigences de la présente Spécification technique et de ne conserver que les seules divergences justifiées indispensables pour des raisons techniques.

(standards.iteh.ai)

[ISO/TS 16649-3:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f35e148c-e2c9-4431-ab8c-62f7e952857a/iso-ts-16649-3-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f35e148c-e2c9-4431-ab8c-62f7e952857a/iso-ts-16649-3-2005>

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

Partie 3:

Technique du nombre le plus probable utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3 β -D-glucuronate

1 Domaine d'application

La présente Spécification technique spécifie une méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positives par la technique de mise en culture en milieu liquide et par le calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 37 °C, puis à 44 °C. La présente Spécification technique est applicable

- aux produits alimentaires destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation des animaux, et
- aux échantillons environnementaux dans la zone de production et de manutention des produits alimentaires.

Cette méthode convient pour le dénombrement des cellules d'*Escherichia coli* qui ont pu souffrir de déshydratation, de congélation, d'exposition à un environnement salin (marin par exemple) ou avoir été endommagées par des désinfectants, par exemple des produits contenant du chlore.

L'applicabilité de la présente Spécification technique est limitée par le fait que la méthode est sujette à une importante variabilité. La méthode doit être appliquée et les résultats interprétés à la lumière des informations fournies à l'Article 11.

AVERTISSEMENT — La méthode décrite dans la présente Spécification technique ne permet pas de détecter les souches d'*Escherichia coli* qui ne se développent pas à 44 °C et, en particulier, celles qui sont β -glucuronidase négatives, comme *Escherichia coli* O157 et quelques autres souches d'*E. coli* pathogènes.

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, *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*

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 *Escherichia coli* β -glucuronidase positive
bactéries qui, à 44 °C, forment des colonies bleues ou bleues-vertes caractéristiques sur le milieu tryptone-bile-glucuronate dans les conditions spécifiées dans la présente Spécification technique

3.2 *Escherichia coli* β -glucuronidase positives
détermination du nombre le plus probable d'*Escherichia coli* β -glucuronidase positives, par millilitre ou par gramme d'échantillon, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente Spécification technique

4 Principe

4.1 Ensemencement de trois tubes¹⁾ de milieu sélectif liquide d'enrichissement double concentration avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

4.2 Ensemencement de trois tubes¹⁾ de milieu liquide d'enrichissement simple concentration avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Puis, dans les mêmes conditions, ensemencement du milieu avec des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.3 Incubation des tubes de milieu double ou simple concentration à 37 °C pendant 24 h. Examen des tubes pour détecter une éventuelle production d'acide, signifiant une fermentation du lactose.

4.4 Pour chaque tube de milieu présentant une production d'acide, mettre en subculture sur gélose tryptone-bile-glucuronate.

1) On peut utiliser cinq tubes, voir 9.2.1.

4.5 Incubation de la gélose tryptone-bile-glucuronate à 44 °C pendant 20 h à 24 h. Examen de la gélose tryptone-bile-glucuronate pour déceler la présence éventuelle de colonies bleues ou bleues-vertes, signifiant la présence d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive.

4.6 Détermination du nombre le plus probable d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive (voir l'ISO 7218), en fonction du nombre de tubes de milieu dont les subcultures ont produit des colonies bleues ou bleues-vertes sur gélose tryptone-bile-glucuronate.

5 Diluants et milieux de culture

Pour la pratique courante en laboratoire, voir l'ISO 7218.

5.1 Diluants

Voir l'ISO 6887 ou l'ISO 8261.

5.2 Milieux de culture

5.2.1 Milieu au glutamate modifié (milieu d'enrichissement sélectif)

5.2.1.1 Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
Glutamate de sodium	12,7 g	6,35 g
Lactose	20,0 g	10,0 g
Formiate de sodium	0,5 g	0,25 g
L-Cystine	0,04 g	0,02 g
L(-)-Acide aspartique	0,048 g	0,024 g
L(+)-Arginine	0,04 g	0,02 g
Thiamine	0,002 g	0,001 g
Acide nicotinique	0,002 g	0,001 g
Acide pantothénique	0,002 g	0,001 g
Sulfate de magnésium septahydraté	0,2 g	0,1 g
Citrate de fer(III) ammoniacal	0,02 g	0,01 g
Chlorure de calcium dihydraté	0,02 g	0,01 g
Hydrogénophosphate de dipotassium	1,8 g	0,9 g
Pourpre de bromocrésol	0,02 g	0,01 g
Chlorure d'ammonium	5,0 g	2,5 g
Eau	1 000 ml	1 000 ml

5.2.1.2 Préparation

Dissoudre le chlorure d'ammonium dans l'eau. Ajouter les autres composants, ou le milieu complet déshydraté, et dissoudre par chauffage, si nécessaire.

Pour augmenter la stabilité du milieu déshydraté pendant le stockage, le glutamate de sodium peut être fourni séparément.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation il soit de $6,7 \pm 0,1$ à 25 °C.

Déposer le milieu en volumes de 10 ml dans des tubes à essai de 16 mm × 160 mm (6.6) dans le cas du milieu simple concentration, et dans des tubes à essai de 18 mm × 180 mm ou 20 mm × 200 mm (6.6) dans le cas du milieu double concentration.

Stériliser pendant 10 min à l'autoclave (6.1) réglé à 116 °C; ou alors chauffer à 100 °C pendant 30 min trois jours consécutifs.

5.2.2 Gélose tryptone-bile-glucuronate (deuxième milieu sélectif)

5.2.2.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	20,0 g
Sels biliaires n° 3	1,5 g
Bromo-5-chloro-4-indolyl-3 β-D-glucuronate (BCIG)	144 μmol ^a
Sulfoxyde de diméthyle (DMSO) ^b	3 ml
Agar-agar	9 g à 18 g ^c
Eau	1 000 ml

^a 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 et d'équipements de protection individuelle appropriés lors de sa manipulation est conseillée.

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

5.2.2.2 Préparation

Dissoudre le BCIG dans le sulfoxyde de diméthyle. 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.

5.2.2.3 Préparation des boîtes de milieu gélosé

Verser dans des boîtes de Petri stériles (6.9) de 12 ml à 15 ml du milieu fondu, et laisser se solidifier.

Sécher les boîtes (6.3) (voir l'ISO 7218). Les boîtes de Petri peuvent être conservées à 5 °C ± 3 °C jusqu'à 5 jours.

Il convient de laisser sécher suffisamment les boîtes pour permettre à l'humidité en excédent de disparaître dans les 15 min qui suivent l'étalement de l'inoculum.

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

Se reporter à l'ISO/TS 11133-1 et à l'ISO/TS 11133-2 pour les définitions de la sélectivité et de la productivité. Le Tableau 1 et le Tableau 2 présentent les essais de performance applicables au milieu au glutamate modifié et à la gélose tryptone-bile-glucuronate

Tableau 1 — Essais de performance sur le milieu au glutamate modifié

Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Méthode de référence	Critères	Réactions caractéristiques
Productivité	37 °C/24 h	<i>E. coli</i> ATCC 25922 or 8739	Semi-quantitative	Production d'acide	Couleur vire au jaune
Sélectivité	37 °C/24 h	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 or 19433	Qualitative	Pas de croissance	—

Tableau 2 — Essais de performance sur la Géluse tryptone-bile-glucuronate

Fonction	Incubation	Souches de contrôle	Méthode de référence	Critères	Réactions caractéristiques
Productivité	44 °C/20 h à 24 h	<i>E. coli</i> ATCC 25922 ou 8739	Qualitative	Bonne croissance (2)	Colonies bleues ou blues-vertes
		<i>E. coli</i> NCTC 13216 (faiblement β -glucuronidase positive)	Qualitative	Bonne croissance (2)	Colonies bleues ou blues-vertes
Sélectivité	37 °C/24 h	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212 ou 19433	Qualitative	Pas de croissance	—

iTeh STANDARD PREVIEW

6 Appareillage et verrerie (standards.iteh.ai)

Il est admis de remplacer la verrerie réutilisable par un appareillage jetable si celui-ci a les mêmes spécifications.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b35e148c-e2c9-4431-ab8c-62f7e952857a/iso-ts-16649-3-2005>

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave). Voir l'ISO 7218.

6.2 Étuves, réglables respectivement à 37 °C ± 1 °C et 44 °C ± 1 °C.

6.3 Enceinte de séchage ou étuve ventilée, pouvant être maintenue à une température comprise entre 25 °C ± 1 °C et 50 °C ± 1 °C, ou **hotte à flux laminaire.**

6.4 Réfrigérateur (pour le stockage des milieux préparés), réglable à 5 °C ± 3 °C.

6.5 pH-mètre, ayant une résolution de 0,01 unité pH et ayant une précision de lecture de ± 0,1 unité pH à 25 °C. Le pH-mètre doit être équipé d'un système de compensation de température, soit manuel soit automatique.

6.6 Tubes à essai, mesurant environ 16 mm × 160 mm et 18 mm × 180 mm ou 20 mm × 200 mm.

6.7 Pipettes à écoulement total, de capacités 1 ml et 10 ml, graduées en 0,1 ml.

6.8 Anses bouclées, en platine iridié ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre, ou anses bouclées stériles à usage unique de 10 µl.

6.9 Boîtes de Petri, de diamètre environ 90 mm.