
**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Exigences et lignes
directrices pour la réalisation des
tests d'épreuve microbiologique —**

Partie 1:

**Tests de croissance pour étudier le
potentiel de croissance, le temps
de latence et le taux de croissance
maximal**

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/86711410-9ada-4741-9b55-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/86711410-9ada-4741-9b55-171000000000/iso-20976-1-2019)

1 *Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for
conducting challenge tests of food and feed products —*

*Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and
maximum growth rate*



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 20976-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/86711410-9ada-4741-9b55-1749a0478096/iso-20976-1-2019>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2019

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +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	v
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	4
4.1 Généralités	4
4.2 Estimation du potentiel de croissance	6
4.3 Estimation des paramètres de la cinétique de croissance (temps de latence et taux de croissance maximal)	7
5 Appareillage	7
6 Milieux de culture et réactifs	8
7 Plan de l'étude et échantillonnage	8
7.1 Généralités	8
7.2 Définition des critères de décision concernant le potentiel de croissance	8
7.3 Nombre de lots et critères de sélection	8
7.4 Préparation des unités pour essai	9
7.5 Nombre d'unités pour essai à inoculer	9
8 Choix des souches	9
9 Préparation de l'inoculum	10
9.1 Généralités	10
9.2 Préparation des suspensions de cellules végétatives	10
9.3 Préparation des suspensions de spores	11
10 Inoculation des unités pour essai	11
11 Témoins	12
11.1 Aliments témoins	12
11.2 Unités témoins	12
12 Conservation des unités pour essai	12
12.1 Généralités	12
12.2 Estimation du potentiel de croissance	13
12.3 Estimation des paramètres de la cinétique de croissance (temps de latence et taux de croissance)	13
13 Analyse	13
14 Expression des résultats	14
14.1 Généralités	14
14.2 Potentiel de croissance (Δ)	14
14.3 Paramètres de la cinétique de croissance (temps de latence et taux de croissance)	14
15 Rapport d'essai	15
15.1 Généralités	15
15.2 Objectif de l'étude et type de test de croissance	15
15.3 Protocole expérimental	15
15.4 Analyse d'échantillon	16
15.5 Résultats	16
15.6 Conclusions	17
15.7 Documents de référence	17
Annexe A (informative) Évaluation de la variabilité inter-lots prenant en compte le pH et l'a_w	18
Annexe B (normative) Nombre minimum d'unités à préparer pour l'étude du test de croissance	19

Annexe C (informative) Exemples de protocoles de préparation des inocula	20
Annexe D (informative) Exemples de procédures permettant d'estimer le potentiel de croissance, le temps de latence et le taux de croissance maximal à partir des tests de croissance	23
Annexe E (informative) Utilisation de la simulation pour évaluer une population microbienne pour différentes conditions de température	27
Bibliographie	28

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 20976-1:2019

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/86711410-9ada-4741-9b55-1749a0478096/iso-20976-1-2019>

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/fr/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 20976 se trouve sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Selon les principes généraux du Codex Alimentarius sur l'hygiène alimentaire, il est de la responsabilité des exploitants du secteur alimentaire de maîtriser les dangers microbiologiques dans les aliments et de gérer les risques microbiens. Par conséquent, l'exploitant du secteur alimentaire doit mettre en place des mesures de maîtrise^[11] validées, au sein du système HACCP (analyse des dangers et points critiques pour leur maîtrise), et conduire des études afin d'évaluer la conformité aux critères de sécurité alimentaire tout au long de la chaîne alimentaire.

Dans le cadre de l'évaluation des risques microbiens, plusieurs approches complémentaires sont développées afin d'estimer les risques posés par les microorganismes pathogènes ou d'altération dans la chaîne alimentaire. L'évaluation des risques microbiens est adoptée par les organismes de réglementation sous les auspices de l'agence internationale chargée des normes alimentaires. Le test de croissance fait partie des approches reconnues utilisées pour valider les mesures de maîtrise au sein du système HACCP, ainsi que pour évaluer la sécurité microbiologique et la qualité des aliments, les procédés de production alimentaire, les conditions de stockage des aliments et les recommandations relatives à la préparation des aliments pour les consommateurs.

Le présent document fournit les règles techniques, calculs et approches pour l'évaluation de la capacité des microorganismes inoculés à croître, survivre ou être inactivés dans les matières premières, les produits intermédiaires ou produits finis pendant toute la durée de conservation des produits soit dans des conditions de transformation, de distribution, d'entreposage et d'utilisation des aliments raisonnablement prévisibles. L'objectif et le domaine d'application du document sont la détermination du plan expérimental et la sélection des conditions de l'étude. Les autorités réglementaires peuvent avoir des recommandations différentes et ces différences ont été incluses dans la mesure du possible. Toutefois, il convient parfois d'intégrer des exigences spécifiques pour obtenir l'approbation réglementaire du test de croissance.

Les cinétiques de croissance et d'inactivation étant clairement différentes, la série ISO 20976 est constituée de deux parties, sous le titre général *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences et lignes directrices pour la réalisation des tests d'épreuve microbiologique*:

- *Partie 1: Tests de croissance pour étudier le potentiel de croissance, le temps de latence et le taux de croissance maximal*
- *Partie 2: Tests d'inactivation pour étudier le potentiel d'inactivation et les paramètres de cinétique (à venir)*

L'utilisation de la série ISO 20976 nécessite une expertise dans les secteurs pertinents tels que la microbiologie des aliments, la science des aliments, la transformation des aliments et les statistiques. L'expertise statistique englobe la compréhension de la théorie d'échantillonnage et des plans d'expérience, l'analyse statistique des données microbiologiques et une vue d'ensemble des concepts mathématiques scientifiquement reconnus et disponibles employés en microbiologie prévisionnelle. Même si de nombreux modèles mathématiques sont disponibles pour décrire et prévoir la croissance bactérienne, le concept gamma (concept γ)^[22] est particulièrement utile pour la réalisation de simulations en utilisant les données générées à partir du test de croissance, par exemple pour évaluer la croissance à des températures de conservation autres que celles soumises à essai, ou pour aider à concevoir de meilleures formulations et conditions de conservation des aliments, et ainsi améliorer la qualité microbienne et/ou la sécurité de l'aliment considéré.

Pour des raisons pratiques, le terme «aliment» inclut l'alimentation humaine et animale.

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences et lignes directrices pour la réalisation des tests d'épreuve microbiologique —

Partie 1:

Tests de croissance pour étudier le potentiel de croissance, le temps de latence et le taux de croissance maximal

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie les protocoles de mise en œuvre de tests de croissance sur les bactéries végétatives et sporulées dans les matières premières, les produits intermédiaires ou produits finis.

L'utilisation du présent document peut être étendue aux levures qui ne forment pas de mycélium.

2 Références normatives

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

ISO 18787:2017, *Produits agricoles et alimentaires — Détermination de l'activité de l'eau*

3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>;
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>.

3.1

spore bactérienne

forme de résistance prise par certaines bactéries qui reste en état de dormance jusqu'à l'étape de *germination* (3.9)

3.2

lot

groupe ou série de produits identifiables obtenus par un procédé donné dans des conditions pratiquement identiques et produits dans un endroit donné et au cours d'une période de production déterminée

Note 1 à l'article: Le lot est déterminé par des paramètres établis au préalable par l'organisation et il peut être décrit par d'autres termes.

[SOURCE: Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission]

3.3

valeur cardinale

valeurs minimale, optimale et maximale d'un paramètre physico-chimique (par exemple, température, pH, a_w) caractérisant la croissance d'une souche microbienne donnée

3.4

unité témoin

unité d'aliment identique à l'unité pour essai (3.24), mais qui n'est pas contaminée artificiellement (utilisée comme blanc)

3.5

test d'épreuve microbiologique

étude de la croissance ou étude de l'inactivation d'un ou plusieurs microorganismes inoculés artificiellement dans un aliment, la première s'effectuant lors d'un test de croissance, la seconde lors d'un test d'inactivation

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

3.6

point expérimental

résultat d'analyse d'une unité pour essai (3.24) par unité de poids ($\log_{10}$ ufc/g), par unité de volume ($\log_{10}$ ufc/ml) ou par unité de surface ($\log_{10}$ ufc/cm²)

ISO 20976-1:2019
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/86711410-9ada-4741-9b55-174a7a5065d6/iso-20976-1-2019>

Note 1 à l'article: Pour des cas spécifiques, les résultats de dénombrement peuvent être exprimés en $\log_{10}$ NPP.

3.7

phase de croissance exponentielle

phase dans laquelle la population microbienne se multiplie exponentiellement aussi rapidement que possible; la croissance dépend du milieu et de l'environnement de croissance (température, humidité, etc.)

Note 1 à l'article: La Figure 1 décrit les trois phases de la cinétique de croissance microbienne.

3.8

temps de génération

T_g

temps nécessaire à la multiplication par 2 des microorganismes, également désigné par temps de doublement

3.9

germination

mécanisme dans lequel une spore bactérienne (3.1) germe pour devenir une cellule végétative (3.25)

3.10

potentiel de croissance

Δ

différence entre le logarithme décimal de la concentration la plus élevée de la population microbienne cible ($\log_{\max}$) et le logarithme décimal de la concentration initiale de cette population microbienne ($\log_i$)

Note 1 à l'article: Le $\log_{\max}$ et le $\log_i$ font référence à des concentrations et sont exprimés en $\log_{10}$ ufc/g ou $\log_{10}$ ufc/ml ou $\log_{10}$ ufc/cm².

3.11**taux de croissance maximal**

paramètre de cinétique caractérisant la *phase de croissance exponentielle* (3.7), représenté par la pente de la courbe montrant l'évolution du logarithme naturel ($\mu_{\max}$) ou du logarithme décimal ($V_{\max}$) de la population en fonction du temps, dans des conditions de croissance constantes

3.12**inoculum**

suspension microbienne à la concentration souhaitée utilisée pour contaminer les *unités pour essai* (3.24)

3.13**phase de latence**

phase, directement après l'inoculation, durant laquelle la population microbienne s'adapte à l'environnement, avant d'entrer en *phase de croissance exponentielle* (3.7)

Note 1 à l'article: La [Figure 1](#) décrit les trois phases de la cinétique de croissance microbienne.

3.14**temps de latence**

λ

paramètre de cinétique en unité de temps qui caractérise la *phase de latence* (3.13)

3.15**valeur de pH**

mesure de la concentration d'acidité ou de basicité d'un matériau en solution aqueuse

[SOURCE: ISO 5127:2017, 3.12.2.29, modifié — Les Notes 1 et 2 à l'article ont été supprimées.]

3.16**modèle primaire**

modèle mathématique décrivant les changements du dénombrement de la population microbienne en fonction du temps

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/86711410-9ada-4741-9b55-1749a0478096/iso-20976-1-2019>

3.17**laboratoire organisateur**

laboratoire ayant la responsabilité de gérer les *tests d'épreuve microbiologique* (3.5)

3.18**échantillonnage**

sélection d'une ou plusieurs unités ou portions d'aliment, de telle sorte que les unités ou portions sélectionnées sont représentatives de cet aliment

3.19**point d'échantillonnage**

moment auquel les *unités pour essai* (3.24) sont analysées et qui est représenté en tant que *point expérimental* (3.6) sur le graphique de cinétique

3.20**modèle secondaire**

modèle mathématique décrivant les effets des facteurs environnementaux (par exemple, température, pH, a_w) sur les paramètres du *modèle primaire* (3.16) (par exemple, le taux de croissance)

3.21**sporulation**

mécanisme par lequel une *cellule végétative* (3.25) forme une spore

3.22**phase stationnaire**

phase dans laquelle la population microbienne est à son niveau maximal

Note 1 à l'article: La [Figure 1](#) décrit les trois phases de la cinétique de croissance microbienne.

3.23

prise d'essai

échantillon représentatif mesuré (volume ou masse) et prélevé sur l'*unité pour essai* (3.24) pour servir à l'analyse

[SOURCE: ISO 6887-1:2017, 3.5, modifié — La fin de la définition, «sur l'échantillon pour laboratoire pour servir à la préparation de la suspension mère», a été modifiée, et la Note 1 à l'article a été supprimée.]

3.24

unité pour essai

quantité (volume ou masse) mesurée de l'aliment utilisé pour l'inoculation

3.25

cellule végétative

état d'une forme microbienne qui est capable de croître dans des conditions environnementales favorables

3.26

activité de l'eau

a_w
rapport entre la pression de vapeur d'eau dans la denrée alimentaire et la pression de vapeur de l'eau pure à la même température

[SOURCE: ISO 18787:2017, 3.1, modifié — La définition a été condensée, et la formule et les Notes 1 et 2 à l'article ont été supprimées.]

iTeh STANDARD PREVIEW **(standards.iteh.ai)**

4 Principe

4.1 Généralités

ISO 20976-1:2019

L'objectif de cette étude doit être clairement défini (par exemple, évaluation/validation de la durée de conservation de l'aliment en tant que mesure de maîtrise, évaluation de la stabilité microbienne). Le plan expérimental doit être en conformité avec cet objectif et doit tenir compte des étapes de la chaîne alimentaire pour lesquelles la croissance microbienne est évaluée. Les critères de décision doivent être clairement définis (voir 7.2).

La connaissance de l'exploitant du secteur alimentaire concernant ses produits (par exemple, caractéristiques ou procédé de production) doit être combinée avec l'expertise en microbiologie des aliments et sciences analytiques pour garantir la robustesse de l'étude. Le laboratoire organisateur doit avoir des connaissances et compétences en microbiologie des aliments, sciences et technologies des aliments, ainsi qu'en statistique pour concevoir et conduire les études, interpréter les résultats et tirer les conclusions. Les analyses doivent être conduites dans le cadre d'un système d'assurance qualité (par exemple, conformément à l'ISO/IEC 17025).

Les tests de croissance visent à étudier le potentiel de croissance ou la cinétique de croissance (temps de latence et taux de croissance maximal), afin d'évaluer par exemple la durée de conservation de l'aliment en tant que mesure de maîtrise, ou la stabilité microbienne d'un aliment.

Les études du potentiel de croissance sont particulièrement appropriées pour:

- valider la durée de conservation microbiologique d'un aliment dans des conditions raisonnablement prévisibles d'utilisation et de conservation entre la production et la consommation, en garantissant que les critères microbiologiques pertinents sont satisfaits tout au long de la durée de conservation du produit;
- évaluer si un produit, soumis à essai dans des conditions spécifiques, permet la croissance du microorganisme inoculé.

Un potentiel de croissance ne sera valide que pour les caractéristiques spécifiques de l'aliment et les conditions appliquées pour l'étude. Si les critères microbiologiques ne sont pas satisfaits ou si

les conditions (par exemple, formulation de l'aliment, caractéristiques physico-chimiques, type et/ou concentration des conservateurs ajoutés, conditionnement, température de conservation) sont modifiées, une nouvelle étude du potentiel de croissance doit être conduite afin de valider ces nouvelles conditions.

Les études de cinétique de croissance sont particulièrement appropriées pour:

- évaluer le ou les effets des caractéristiques intrinsèques (par exemple, pH, a_w , conservateurs) et extrinsèques (par exemple, composition en gaz, température) ayant un impact significatif sur le comportement du microorganisme cible;
- fournir des données pour les modèles développés pour simuler l'impact de ces facteurs sur le comportement microbien dans l'aliment étudié pour des conditions de conservation raisonnablement prévisibles (temps et température);
- comparer les résultats de simulation pour garantir que les critères microbiologiques pertinents sont satisfaits tout au long de la durée de conservation de l'aliment.

Les études de cinétique de croissance sont utilisées pour estimer et valider la durée de conservation microbiologique d'un aliment. Elles sont particulièrement adaptées dans les dernières étapes du développement d'un aliment, y compris la reformulation, un nouveau conditionnement et d'autres conditions de transformation.

Une étude de cinétique de croissance peut fournir davantage d'informations qu'une étude de potentiel de croissance. Toutefois, les études de cinétique de croissance sont plus complexes en termes de plan de l'étude, d'exécution, d'interprétation et d'exploitation des résultats, en particulier dans le cas où divers facteurs sont inclus.

Le comportement d'une population microbienne dans un aliment, c'est-à-dire la cinétique de croissance du microorganisme, dépend des caractéristiques de l'aliment (par exemple, a_w , pH, concentrations en conservateurs, etc.), des conditions de conservation de l'aliment (température, format de conditionnement et composition en gaz), des procédés alimentaires, de l'état physiologique des microorganismes et des interactions avec la flore annexe pouvant être présente naturellement dans l'aliment.

La cinétique de croissance microbienne est définie par trois phases majeures (voir [Figure 1](#)).

- a) Phase de latence: Cette phase est caractérisée par le temps de latence (λ), qui correspond au point d'intersection entre la tangente de la phase de croissance exponentielle (tracée en coordonnées semi-logarithmiques) et la ligne horizontale passant par la concentration cellulaire initiale[15][18]. Pour les microorganismes sporulés, le temps de latence inclut la germination des spores et l'émergence.

Le temps de latence dépend des caractéristiques de l'aliment (par exemple, physico-chimiques et microbiologiques), des taux d'inoculation et des conditions de conservation (par exemple, température, humidité relative, composition en gaz). Le temps de latence dépend également de l'état physiologique du microorganisme contaminant l'aliment et de toutes conditions de stress pouvant impacter le comportement des cellules ou spores.

- b) Phase de croissance exponentielle: Cette phase est caractérisée par le taux de croissance maximal ($\mu_{\max}$ ou $V_{\max}$), qui correspond à l'augmentation maximale du logarithme naturel ou décimal du nombre de cellules par unité de temps.

Le taux de croissance correspond à la pente de la courbe montrant l'évolution du logarithme naturel ($\mu_{\max}$) ou décimal ($V_{\max}$) de la population en fonction du temps pendant la phase de croissance exponentielle. Les caractéristiques de l'aliment (par exemple, physico-chimiques et microbiologiques) et les conditions de conservation (par exemple, température, humidité relative, composition en gaz) peuvent influencer significativement le taux de croissance microbienne. Le taux de croissance d'une population microbienne n'est ni affecté par sa concentration initiale ni par son état physiologique.

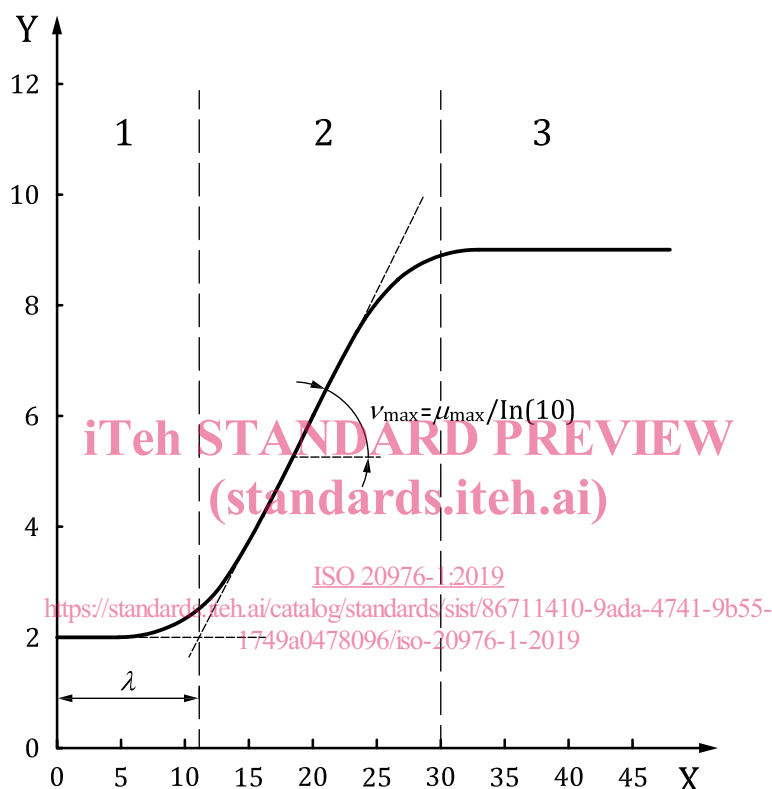
La relation entre le temps de génération (T_g) et $\mu_{\max}$ est fournie par la [Formule \(1\)](#):

$$\mu_{\max} = \ln(2) / T_g \quad (1)$$

La pente de la courbe représentant le $\log_{10}$ de la population bactérienne en fonction du temps, $V_{\max}$, et sa relation avec le taux de croissance maximal, est fournie par la [Formule \(2\)](#):

$$\mu_{\max} = V_{\max} \cdot \ln(10) \quad (2)$$

c) Phase stationnaire: Dans cette phase, la population microbienne est à son niveau maximal.



Légende

- Y $\log_{10}$ (ufc/g)
- X temps (jours)
- 1 phase de latence
- 2 phase de croissance exponentielle
- 3 phase stationnaire

Figure 1 — Cinétique de croissance microbienne avec trois phases majeures

4.2 Estimation du potentiel de croissance

Les caractéristiques de l'aliment (par exemple, physico-chimiques et microbiologiques) et les conditions de conservation (par exemple, température, humidité relative, composition en gaz) peuvent influencer significativement le potentiel de croissance microbienne.

L'inoculum doit être adapté à des conditions reproduisant l'exposition à différents stress que la cellule microbienne ou la spore pourraient rencontrer lors de la manipulation/transformation des aliments ou tout phénomène pouvant induire d'éventuelles adaptations des microorganismes, afin d'obtenir des comportements microbiens proches de ceux observés dans l'aliment en conditions naturelles.