

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
20976-2

Première édition  
2022-10

---

---

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

Partie 2:

**Tests d'inactivation pour étudier  
le potentiel d'inactivation et  
les paramètres de la cinétique  
d'inactivation**

[ISO 20976-2:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/20976-2:2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/20976-2:2022> *Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for  
conducting challenge tests of food and feed products —*

*Part 2: Challenge tests to study inactivation potential and kinetic  
parameters*



Numéro de référence  
ISO 20976-2:2022(F)

© ISO 2022

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 20976-2:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/23a7a1f3-426b-45fd-be69-53bee1a514df/iso-20976-2-2022>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2022

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  
E-mail: [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web: [www.iso.org](http://www.iso.org)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>v</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>6</b>
<b>5</b> <b>Appareillage</b> .....	<b>7</b>
<b>6</b> <b>Milieux de culture et réactifs</b> .....	<b>8</b>
<b>7</b> <b>Plan de l'étude et échantillonnage</b> .....	<b>8</b>
7.1 Généralités .....	8
7.2 Définition du niveau cible de réduction pour l'étude d'inactivation .....	9
7.3 Nombre de lots .....	9
7.4 Préparation des unités pour essai .....	9
7.5 Nombre d'unités témoins et d'unités pour essai .....	10
<b>8</b> <b>Choix des souches</b> .....	<b>10</b>
<b>9</b> <b>Préparation de l'inoculum</b> .....	<b>10</b>
9.1 Généralités .....	10
9.2 Préparation des cellules végétatives .....	11
9.3 Préparation des spores .....	11
<b>10</b> <b>Inoculation des unités pour essai</b> .....	<b>11</b>
<b>11</b> <b>Témoins</b> .....	<b>13</b>
11.1 Témoins non inoculés .....	13
11.2 Témoins inoculés .....	13
<b>12</b> <b>Traitement des unités pour essai</b> .....	<b>13</b>
<b>13</b> <b>Analyse</b> .....	<b>13</b>
<b>14</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>14</b>
14.1 Généralités .....	14
14.2 Potentiel d'inactivation .....	15
14.3 Paramètres de la cinétique d'inactivation .....	15
14.3.1 Généralités .....	15
14.3.2 Paramètres primaires de la cinétique d'inactivation .....	15
14.3.3 Paramètres secondaires de la cinétique d'inactivation .....	16
14.4 Simulation de l'inactivation .....	17
<b>15</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>17</b>
15.1 Généralités .....	17
15.2 Objectif de l'étude, type de test d'inactivation et niveau cible de réduction .....	17
15.3 Protocole expérimental .....	18
15.4 Analyse d'échantillon .....	19
15.5 Résultats .....	19
15.6 Conclusions .....	19
15.7 Documents de référence .....	20
<b>Annexe A (informative) Choix du type et du lieu de l'étude d'inactivation</b> .....	<b>21</b>
<b>Annexe B (normative) Nombre minimal d'unités à préparer pour les études d'inactivation</b> .....	<b>22</b>
<b>Annexe C (informative) Exemples de techniques d'inoculation</b> .....	<b>24</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>26</b>

## 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](http://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](http://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 [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*, en collaboration avec le comité technique CEN/TC 463, *Microbiologie de la chaîne alimentaire*, du Comité européen de normalisation (CEN) conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

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](http://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, les exploitants du secteur alimentaire mettent en place des mesures de maîtrise validées, au sein du système HACCP (analyse des dangers et points critiques pour leur maîtrise), et conduisent 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. Les tests d'épreuve microbiologique font 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 destinées aux consommateurs.

C'est pourquoi le présent document fournit les règles techniques, calculs et approches pour l'évaluation de la capacité d'un microorganisme inoculé à croître, survivre ou être inactivé 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 champ de l'étude consistent à déterminer le plan expérimental et à sélectionner les conditions de l'étude, ainsi qu'à évaluer l'importance de l'inactivation microbienne. Les autorités réglementaires peuvent avoir des recommandations différentes et ces différences ont été incluses dans la mesure du possible. Toutefois, il peut parfois s'avérer nécessaire d'intégrer des exigences spécifiques pour obtenir l'approbation réglementaire du test d'épreuve microbiologique.

Les études de croissance et d'inactivation étant clairement différentes, la série ISO 20976 est constituée de deux parties, publiées 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 la cinétique d'inactivation.*

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.

Pour des raisons pratiques, le terme «aliment» inclut les aliments pour animaux.



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

## Partie 2:

# Tests d'inactivation pour étudier le potentiel d'inactivation et les paramètres de la cinétique d'inactivation

## 1 Domaine d'application

Le présent document spécifie les protocoles de mise en œuvre de tests d'inactivation microbologique pour les études d'inactivation sur les bactéries végétatives et les spores bactériennes dans les matières premières et les ingrédients, les produits intermédiaires ou finis.

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

## 2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils 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 20976-2:2022

ISO 6887 (toutes les parties), *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbologique*

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*

## 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 <https://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)

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.1]

### 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, Article 2 (e)<sup>[10]</sup>, modifié — La Note 1 à l'article a été ajoutée et, dans la version anglaise de la norme, «food obtained through» remplace «products obtained from».]

### 3.3

#### produits en vrac

produits qui ne sont pas séparés en individus ou en unités

[SOURCE: ISO/TS 17728:2015, 3.3.1]

### 3.4

#### 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

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.5]

### 3.5

#### unité témoin

unité d'aliment identique à l'*unité pour essai* (3.34), mais qui n'est pas inoculée artificiellement (utilisée comme blanc)

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.4, modifié — «inoculée» remplace «contaminée».]

### 3.6

#### valeur D

#### réduction décimale

temps ou dose nécessaire pour obtenir une réduction de 90 % du microorganisme soumis à essai dans les conditions indiquées (par exemple: température, pH ou composition chimique) dans le cas d'une *cinétique d'inactivation* (3.10) log-linéaire

### 3.7

#### valeur $\delta$

#### première réduction décimale

temps ou dose nécessaire pour obtenir la première réduction de 90 % du microorganisme soumis à essai dans les conditions indiquées (par exemple: température, pH ou composition chimique) dans le cas d'une *cinétique d'inactivation* (3.10) non log-linéaire

### 3.8

#### point expérimental

résultat d'analyse d'une *unité pour essai* (3.34) par unité de masse, par unité de volume ou par unité de surface

Note 1 à l'article: Les résultats de dénombrement peuvent être exprimés en  $\log_{10}$  ou nombre le plus probable (NPP).

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.6, modifié — Dans la définition, «masse» remplace «poids» et les unités ont été supprimées. Dans la Note 1 à l'article, «Pour des cas spécifiques» a été supprimé et «ou nombre le plus probable (NPP)» remplace «NPP».]



**3.9****germination**

mécanisme dans lequel une *spore bactérienne* (3.1) commence sa transformation en *cellule végétative* (3.36)

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.9, modifié — «commence sa transformation en» remplace «germe pour devenir une».]

**3.10****cinétique d'inactivation**

variation dans le temps de la concentration du microorganisme cible soumis à un procédé d'inactivation

**3.11****paramètre d'inactivation**

estimation mathématique qui décrit la résistance/sensibilité de l'organisme cible au *traitement* (3.35), obtenue par l'ajustement de *modèles primaires* (3.18) et de *modèles secondaires* (3.24)

Note 1 à l'article: Des exemples de ces paramètres sont les valeurs  $D$ ,  $\delta$  et  $p$  pour les modèles primaires et  $z$  pour les modèles secondaires.

**3.12****potentiel d'inactivation**

valeur  $\Delta$

**destruction logarithmique****réduction logarithmique**

différence dans la concentration logarithmique ( $\log_{10}$  ufc/g, ou ml, ou  $\text{cm}^2$ ) du microorganisme cible entre un point de temps antérieur et un point de temps postérieur, exprimée en  $\log_{10}$

Note 1 à l'article: Dans le présent document, le terme «potentiel d'inactivation» fait référence au type d'étude d'inactivation et les termes «destruction logarithmique» et «réduction logarithmique» font référence au résultat obtenu.

**3.13****traitement d'inactivation**

procédé utilisé pour détruire ou inactiver le microorganisme cible

**3.14****inoculum**

suspension microbienne à la concentration souhaitée utilisée pour contaminer les *unités pour essai* (3.34)

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.12]

**3.15****valeur k**

pente de la courbe d'inactivation

**3.16****valeur p**

paramètre décrivant la forme de la courbe d'inactivation

**3.17****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 à l'article ont été supprimées.]

**3.18**

**modèle primaire**

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

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.16]

**3.19**

**laboratoire organisateur**

laboratoire ayant la responsabilité de gérer les *tests d'épreuve microbiologique* (3.4)

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.17]

**3.20**

**installation pilote**

lieu de fabrication utilisé pour réaliser une expérience ou un essai avant de la ou le reproduire à plus grande échelle

**3.21**

**installation de production**

lieu où les produits sont fabriqués à grande échelle

**3.22**

**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

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.18]

**3.23**

**point d'échantillonnage**

moment auquel les *unités pour essai* (3.34) sont prélevées pour analyses

Note 1 à l'article: Lors de l'évaluation de la *cinétique d'inactivation* (3.10), ces points sont représentés comme des *points expérimentaux* (3.8) sur le graphique d'inactivation.

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.19, modifié — «prélevées pour analyses» remplace «analysées et qui est représenté en tant que point expérimental sur le graphique de cinétique» et la Note 1 à l'article a été ajoutée.]

**3.24**

**modèle secondaire**

modèle mathématique décrivant les effets des facteurs du procédé d'inactivation (par exemple, température, pH,  $a_w$ ) sur les paramètres du *modèle primaire* (3.18) (par exemple, la valeur  $D$ ,  $\delta$ )

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.20, modifié — «du procédé d'inactivation» remplace «environnementaux» et «(par exemple, la valeur  $D$ ,  $\delta$ )» remplace «(par exemple, le taux de croissance)».]

**3.25**

**sporulation**

mécanisme par lequel une *cellule végétative* (3.36) forme une spore

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.21]

**3.26**

**substitut (surrogate)**

microorganisme non pathogène ayant une capacité de *survie* (3.27) similaire ou supérieure à celle du microorganisme pathogène, à la fois dans la matrice et dans les conditions de transformation étudiées

**3.27****survie**

état qui consiste à continuer à vivre ou à exister sans augmentation ou diminution significative de la viabilité

**3.28****niveau cible de réduction**

niveau cible d'inactivation exprimé en  $\log_{10}$

**3.29**

$t_0$

moment auquel le traitement commence

**3.30**

$t_{\text{fin}}$

moment auquel le traitement est terminé

**3.31**

$t_{\text{inoc}}$

moment auquel le microorganisme est inoculé dans l'aliment

**3.32**

$t_{x\text{D}}$

durée de traitement nécessaire pour une réduction de  $x$  log du microorganisme cible

**3.33****prise d'essai**

échantillon représentatif mesuré (volume ou masse) prélevé sur l'*unité pour essai* (3.34) pour servir à l'analyse

[SOURCE: ISO 6887-1:2017, 3.5, modifié — «l'unité pour essai pour servir à l'analyse» remplace «l'échantillon pour laboratoire pour servir à la préparation de la suspension mère» et la Note 1 à l'article a été supprimée.]

**3.34****unité pour essai**

quantité (volume ou masse) mesurée de l'aliment utilisé pour l'inoculation, le *traitement* (3.35) ultérieur et l'analyse

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.24, modifié — «le traitement ultérieur et l'analyse» a été ajouté.]

**3.35****traitement**

tout procédé, toute formulation ou toute caractéristique de produit, ou une combinaison de ceux-ci, destinés à inactiver le microorganisme cible

**3.36****cellule végétative**

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

[SOURCE: ISO 20976-1:2019, 3.25]

**3.37****activité de l'eau**

$a_w$

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

[SOURCE: ISO 18787:2017, 3.1, modifié — «pression de vapeur d'eau dans la denrée alimentaire sur la pression de vapeur de l'eau pure» remplace «pression partielle de vapeur d'eau en équilibre avec le

produit analysé sur la pression saturante de vapeur d'eau en équilibre avec l'eau pure», et la formule et les notes à l'article ont été supprimées.]

### 3.38

#### valeur z

modification du *traitement* (3.35) (par exemple, température, pH,  $a_w$ ) qui induit une variation de 10 fois de la *valeur D* (3.6)

Note 1 à l'article: La température, le pH et  $a_w$  peuvent être indexés à la valeur z pour indiquer le traitement évalué.

## 4 Principe

Les études d'inactivation sont conçues pour déterminer les variations dans la concentration du microorganisme cible pendant le test d'inactivation. Ces études peuvent être employées pour évaluer si l'inactivation microbienne est importante ou non dans une denrée alimentaire et pour quantifier la diminution du microorganisme cible dans des conditions de transformation et/ou une formulation donnée(s) du produit alimentaire. Le champ et l'objectif de l'étude doivent être clairement spécifiés (par exemple, évaluation/validation de l'efficacité du procédé alimentaire en tant que mesure de maîtrise, évaluation de la stabilité et de la survie microbiennes), y compris le niveau cible de réduction et les critères de décision. Le plan expérimental doit être en conformité avec cet objectif et doit tenir compte des étapes du procédé et de la chaîne alimentaire pour lesquelles l'inactivation microbienne est évaluée. La connaissance de l'exploitant du secteur alimentaire (par exemple, concernant les caractéristiques et le procédé de production de ses produits) doit être combinée avec l'expertise en microbiologie des aliments et sciences analytiques pour garantir la robustesse de l'étude (voir 14.3.2). Les études d'inactivation utilisent de préférence le microorganisme cible. Dans les études de tests d'inactivation réalisées dans les installations de production alimentaire, un substitut validé doit être utilisé à la place du microorganisme pathogène cible<sup>[26]</sup>.

Le laboratoire organisateur doit avoir des connaissances et des compétences en microbiologie des aliments, sciences et technologies des aliments, ainsi qu'en statistique pour concevoir et réaliser les études, interpréter les résultats et tirer les conclusions. Les analyses doivent être effectuées dans le cadre d'un système d'assurance qualité (par exemple, ISO/IEC 17025).

Pour réaliser une étude de test d'inactivation, il convient de préparer l'inoculum de sorte que les cellules ou spores microbiennes aient été adaptées aux conditions environnementales qui simulent l'environnement de transformation des aliments, favorisant ainsi la réponse microbienne naturelle une fois l'aliment inoculé.

La même souche microbienne peut présenter différentes formes en fonction du traitement (voir Figure 1) <sup>[14]</sup>. Les formes hétérogènes des courbes d'inactivation microbienne sont le résultat de la résistance microbienne, de la réponse adaptative ou de l'hétérogénéité des cellules<sup>[16]</sup>.