34

NORME INTERNATIONALE

ISO 6391

Première édition
1988-11-15

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION
МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ

Viandes et produits à base de viande — Dénombrement des *Escherichia coli* — Méthode par comptage des colonies obtenues sur membranes à 44 °C

Meat and meat products — Enumeration of Escherichia coli *— Colony count technique at 44 °C using membranes*

Numéro de référence
ISO 6391 : 1988 (F)

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 projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6391 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale.

© **Organisation internationale de normalisation, 1988** ●

Imprimé en Suisse

Introduction

Bien que, pour des raisons d'ordre statistique bien admises, le plus petit nombre de colonies susceptible d'être compté sur boîte de milieu sélectif ait été fixé à 15, il est souvent souhaitable, à des fins pratiques, d'estimer la présence d'*Escherichia coli* en-dessous de ce seuil. Les limites de confiance de telles estimations figurent en annexe A.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 6391:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/95ada643-bf8a-44ac-9622-6ba320af7964/iso-6391-1988

Viandes et produits à base de viande — Dénombrement des *Escherichia coli* — Méthode par comptage des colonies obtenues sur membranes à 44 °C

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour le dénombrement des *Escherichia coli* dans la viande et les produits à base de viande.

La méthode permet de rechercher les *E. coli* typiques (biotype 1) et les variantes lactose négatif ou anaérogènes.[1)]

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication de cette norme, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur cette Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 3100-1 : —[2)], *Viandes et produits à base de viande — Échantillonnage et préparation des échantillons pour essai — Partie 1 : Échantillonnage.*

ISO 3100-2 : 1988, *Viandes et produits à base de viande — Échantillonnage et préparation des échantillons pour essai — Partie 2 : Préparation des échantillons pour essai pour l'examen microbiologique.*

ISO 6887 : 1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

3 Définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

Escherichia coli: Bactéries qui, à 44 °C, forment des colonies indole-positives (roses) caractéristiques sur membranes en acétate de cellulose appliquées sur gélose tryptonée biliée, dans les conditions spécifiées dans la présente Norme internationale.

4 Principe

En général, la recherche d'*E. coli* nécessite trois étapes successives.

4.1 Revivification

Inoculation d'une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai, si le produit considéré est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère, dans le cas d'autres produits, sur des membranes en acétate de cellulose appliquées sur gélose au glutamate modifiée et incubation à 37 °C pendant 4 h.

NOTE — Ce mode opératoire permet la revivification des *E. coli* ayant été endommagés par le froid ou la dessiccation au cours d'un stockage, ou ayant subi l'action de la chaleur ou un traitement chimique. Il permet également la diffusion de concentrations élevées d'hydrates de carbone fermentescibles présents dans l'échantillon pour essai, ce qui évite leur interférence avec la production d'indole au moment de l'isolement.

4.2 Isolement

Après la revivification, transfert des membranes de la gélose au glutamate modifiée, sur la gélose tryptonée biliée. Incubation à 44 °C pendant 18 h à 20 h.

4.3 Recherche

Mise en évidence de la présence d'*E. coli* sur membrane par la production d'indole à partir de chaque colonie.

4.4 Calcul

Calcul du nombre d'*E. coli* par millilitre ou par gramme d'échantillon à partir du nombre de colonies indole-positives obtenues sur les membranes à des niveaux de dilutions choisis pour donner un résultat significatif.

1) ANDERSON, J.M. et BAIRD-PARKER, A.C. *J. Appl. Bacteriol.* **39**, 1975: 111-117.

2) À publier.

5 Diluant, milieux de culture et réactif

5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des *E. coli* dans les conditions de l'essai.

Mesurer le pH du milieu, de sorte qu'après stérilisation il soit au pH demandé.

Si le diluant et les milieux ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité entre 0 °C et 5 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

5.2 Diluant

Voir ISO 6887.

5.3 Milieu de revivification — Gélose au glutamate modifiée

Composition[1]

Glutamate de sodium	6,35 g
Lactose	10,0 g
Formiate de sodium	0,25 g
L(−)-cystine	0,02 g
L(−)-acide aspartique	0,02 g
L(+)-arginine	0,024 g
Thiamine	0,001 g
Acide nicotinique	0,001 g
Acide pantothénique	0,001 g
Sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,100 g
Citrate ammoniacal de fer(III) [au moins 15 % Fe (*m/m*)]	0,010 g
Chlorure de calcium ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	0,010 g
Monohydrogénophosphate de potassium	0,90 g
Chlorure d'ammonium	2,5 g
Agar-agar	12 g à 18 g[2]
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre le chlorure d'ammonium dans l'eau. Ajouter les autres composants et les dissoudre en les portant à ébullition. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 6,7 à 25 °C. Répartir, par quantités de 100 ml, dans des récipients appropriés (6.6), et stériliser à l'autoclave (6.1) à 115 °C pendant 10 min.

Préparation des boîtes de gélose

Répartir le milieu refroidi à environ 45 °C, par quantités de 12 ml à 15 ml dans les boîtes de Petri stériles (6.7) et laisser se solidifier. Les boîtes peuvent être conservées entre 0 °C et +5 °C pendant 4 jours.

Juste au moment de l'emploi, faire sécher soigneusement les boîtes dans une étuve (6.5) à 50 °C, de préférence couvercles entr'ouverts et surface de la gélose retournée.

NOTE — La gélose doit être suffisamment sèche, pour éviter un excès d'humidité au cours des 15 min qui suivent l'étalement de l'inoculum (1 ml).

5.4 Milieu sélectif — Gélose tryptonée biliée[3]

Composition

Tryptone	20,0 g[4]
Sels biliaires (purifiés)	1,5 g[5]
Agar-agar	12 g à 18 g[2]
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en les portant à ébullition. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,2 à 25 °C. Répartir le milieu par quantités de 100 ml dans des fioles appropriées et stériliser à l'autoclave (6.1) pendant 15 min à 121 °C.

Répartir le milieu refroidi à environ 45 °C, par quantités de 12 ml à 15 ml dans des boîtes de Petri stériles (6.7) et laisser se solidifier. Les boîtes peuvent être conservées entre 0 °C et +5 °C pendant 4 jours.

Juste avant l'emploi, sécher soigneusement les boîtes de gélose dans l'étuve (6.5) à 50 °C pendant 30 min ou jusqu'à séchage de la gélose, après avoir retiré les couvercles et retourné les boîtes.

1) *The bacteriological examination of drinking water supplies*, 1982 Report No. 71, London, Her Majesty's Stationery Office.

2) Selon les prescriptions du fabricant.

3) DELANEY, J.E., MCCARTHY, J.A. et GRASSO, R.J. *Wat. Sewage Wks*, 1962: 109; 289.

4) Certaines marques, favorisant la production d'indole, ne donnent pas de résultats satisfaisants.

5) Le sel biliaire Oxoid N° 3 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.

5.5 Réactif pour la recherche de l'indole

Composition

p-Diméthylaminobenzaldéhyde	5 g
Acide chlorhydrique, $c(HCl) = 1$ mol/l	100 ml

Préparation

Dissoudre le réactif dans la solution d'acide chlorhydrique et le conserver entre 0 °C et +5 °C.

6 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont convenables.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment:

6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou **en chaleur humide (autoclave).**

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, les milieux de culture, l'échantillon et les dilutions, sauf s'il est livré stérile (particulièrement le matériel en plastique), doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes :

a) au four (6.1), en le maintenant à une température de 170 °C à 175 °C durant au moins 1 h;

b) à l'autoclave (6.1), en le maintenant à une température de 121 °C ± 1 °C durant au moins 20 min.

6.2 Appareil pour l'homogénéisation

Un des appareils suivants doit être utilisé

a) un homogénéisateur mécanique à viande, taille laboratoire, stérilisable, muni d'une plaque perforée, dont les trous ont un diamètre maximal de 4 mm;

b) un homogénéisateur, de type péristaltique (Stomacher), avec des sacs stériles en plastique.

6.3 Étuve, réglable à 35 °C ± 1 °C ou 37 °C ± 1 °C.

6.4 Étuve, réglable à 44 °C ± 0,5 °C.

6.5 Enceinte de séchage ou **étuve,** ventilée par convection, réglable à 50 °C ± 1 °C.

6.6 Tubes à essais, de 18 mm × 180 mm et **fioles** de 125 ml à 300 ml, pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture.

6.7 Boîtes de Petri, en verre ou en matière plastique, de 90 mm ou 100 mm de diamètre.

6.8 Membranes en acétate de cellulose, de 0,45 µm à 1,2 µm de diamètre des pores et de 85 mm de diamètre.

6.9 Pipettes, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, de 1 ml de capacité nominale, graduées en 0,1 ml et dont l'orifice d'écoulement a un diamètre de 2 mm à 3 mm.

6.10 Étaleurs, en plastique ou en verre, par exemple, du type crosses de hockey, fabriqués avec des baguettes de verre, d'environ 3,5 mm de diamètre et 20 cm de longueur par exemple, coudées à angle droit à environ 3 cm de l'une de leurs extrémités et dont les extrémités coupées ont été polies par chauffage.

6.11 Bain d'eau, ou équipement similaire, réglable à 45 °C ± 0,5 °C.

6.12 Bain d'eau, ou équipement similaire, réglable à 50 °C ± 0,5 °C.

6.13 Lampe UV à grande longueur d'onde (365 nm), équipée d'un filtre permettant de supprimer les radiations UV inférieures à 310 nm.

6.14 pH-mètre, précis à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

7 Échantillonnage

Voir l'ISO 3100-1.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Opérer à partir d'un échantillon d'au moins 200 g, conformément à l'ISO 3100-2 en utilisant l'appareil pour homogénéisation (6.2).

Procéder dès que possible à l'examen de l'échantillon pour essai. Il peut être conservé, si nécessaire, à une température comprise entre 0 °C et +5 °C, pendant 1 h au plus.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir l'ISO 6887.

9.2 Revivification

9.2.1 En utilisant des pinces stériles, déposer aseptiquement une membrane en acétate de cellulose (6.8) sur la surface séchée de deux boîtes de gélose au glutamate modifiée (5.3); éviter d'emprisonner des bulles d'air sous la membrane. Aplatir la membrane avec précaution en utilisant un étaleur stérile (6.10).

À l'aide d'une pipette stérile (6.9), déposer au centre de chaque membrane 1 ml de l'échantillon pour essai, s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère, dans le cas d'autres produits. À l'aide d'un étaleur stérile (6.10), répartir l'inoculum de façon uniforme sur toute la surface de la membrane en évitant de faire déborder l'inoculum de la membrane.

9.2.2 En utilisant une nouvelle pipette (6.9), inoculer des quantités identiques des autres dilutions de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère sur les autres membranes, comme décrit en 9.2.1.

9.2.3 Laisser les boîtes inoculées en position horizontale à la température du laboratoire pendant environ 15 min jusqu'à ce que l'inoculum se soit imprégné dans la membrane. Incuber les boîtes de Petri retournées à 37 °C ou 35 °C[1] pendant 4 h dans l'étuve (6.3).

9.3 Passage sur milieu sélectif

9.3.1 En utilisant des pinces stériles à extrémité arrondie, transférer la membrane de la gélose au glutamate modifiée sur la gélose biliée tryptonée (5.4).

NOTE — La membrane humide doit adhérer à la surface de la gélose. Éviter d'emprisonner des bulles d'air. **Ne pas** utiliser un étaleur.

9.3.2 Faire incuber les boîtes, en les retournant, à 44 °C pendant 18 h à 24 h dans l'étuve (6.4). Ne pas empiler les boîtes par plus de trois unités.

9.4 Recherche de la production d'indole par les colonies développées sur les membranes

9.4.1 Étiqueter les couvercles de chaque boîte afin de pouvoir les repérer.

9.4.2 À l'aide d'une pipette, déposer 2 ml de réactif pour la recherche de l'indole (5.5) dans un couvercle retourné placé horizontalement.

9.4.3 À l'aide de pinces, soulever la membrane de la boîte de gélose correspondante et la déposer dans le réactif. Si nécessaire, incliner le couvercle de façon à ce que la totalité de la surface de la membrane soit imprégnée de réactif. Au bout de 5 min, retirer l'excès de réactif à la pipette.

9.4.4 Placer la membrane sous la lampe UV (6.13) pendant 30 min. Les colonies indole-positives développent une couleur rose.

9.5 Interprétation

Dénombrer les colonies indole-positives (roses) sur les membranes contenant, de préférence, entre 15 et 150 colonies roses.

10 Expression des résultats

À l'aide des critères suivants, déterminer le nombre d'*E. coli* présents.

10.1 Mode de calcul

10.1.1 Si une ou deux membranes correspondant à une certaine dilution présentent entre 15 et 150 colonies roses, calculer la moyenne arithmétique d'un nombre de colonies dénombrées sur les deux membranes.

Ne retenir ensuite que deux chiffres significatifs, en opérant de la façon suivante:

— si le nombre est inférieur à 100, l'arrondir au plus proche multiple de 5;

— si le nombre est supérieur à 100 et se termine par un 5, l'arrondir au plus proche multiple de 20;

— si le nombre est supérieur à 100 et ne se termine pas par un 5, l'arrondir au plus proche multiple de 10.

Multiplier cette valeur par l'inverse du taux de dilution correspondant pour obtenir le nombre de *E. coli* par millilitre ou par gramme de produit selon le cas. Exprimer ce résultat par un nombre compris entre 1,0 et 9,0 multiplié par 10^n, n étant la puissance appropriée de 10.

10.1.2 S'il existe des membranes présentant entre 15 et 150 colonies roses aux niveaux de deux dilutions consécutives, calculer le nombre d'*E. coli* pour chaque dilution en procédant comme spécifié en 10.1.1 et prendre comme résultat la moyenne arithmétique des deux valeurs obtenues, sauf si le rapport de la valeur la plus forte à la valeur la plus faible est supérieur à 2; dans ce dernier cas, retenir comme résultat la valeur la plus faible.

10.1.3 S'il n'y a pas de colonies roses sur les membranes au niveau de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère, donner le résultat sous la forme:

— moins de 1 *E. coli* par millilitre (échantillons liquides), ou

— moins de 1 × s *E. coli* par gramme, (échantillons solides) $1/s$ étant le taux de dilution de la suspension mère.

10.1.4 S'il y a moins de 15 colonies roses sur les membranes au niveau de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère, calculer la moyenne des dénombrements de colonies et arrondir au nombre entier supérieur.

Exprimer le résultat sous la forme:

— N *E. coli* par millilitre (échantillons liquides), ou

— $N \times s$ *E. coli* par gramme (échantillons solides), $1/s$ étant le taux de dilution de la suspension mère,

où N est la moyenne arithmétique des dénombrements de colonies.

1) La température devrait faire l'objet d'un accord entre les parties concernées et être indiquée dans le rapport d'essai.

10.2 Fidélité

10.2.1 Fidélité du dénombrement d'un nombre élevé (entre 15 et 150)

Pour des raisons d'ordre uniquement statistique, dans 95 % des cas, les limites de confiance de cette méthode[1] varient de ± 16 % à ± 52 %. En pratique, des variations plus importantes encore peuvent être observées et, en particulier, entre les résultats obtenus par différents microbiologistes.

10.2.2 Fidélité du dénombrement des petits nombres (moins de 15)

Les limites de confiance pour estimer les petits nombres sont données dans l'annexe A.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le rapport d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

1) COWELL et MORISETTI. *J. Sci. Food Agric.* **20**, 1969, 573.

Annexe A

(normative)

Limites de confiance pour estimer les dénombrements

Les limites de confiance au niveau de 95 % pour estimer les dénombrements, quand le nombre moyen de colonies comptées sur doubles boîtes inoculées à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère est inférieur à 15 *E. coli*, sont données dans le tableau A.1.

Tableau A.1

Nombre d'*E. coli*	Limites de confiance au niveau de 95 %	
	inférieure	supérieure
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23