
Norme internationale



7937

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

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* — Méthode par comptage des colonies

Microbiology — General guidance for enumeration of Clostridium perfringens — Colony count technique

Première édition — 1985-07-01

CDU 579.67.087.23 : 579.852.13

Réf. n° : ISO 7937-1985 (F)

Descripteurs : analyse microbiologique, détection, micro-organisme, produit alimentaire, comptage des bactéries.

Prix basé sur 7 pages

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 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.

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 7937 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* — Méthode par comptage des colonies

0 Introduction

0.1 La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen de produits non traités dans les Normes internationales existant actuellement et pour la référence par les organismes élaborant des méthodes d'essais microbiologiques destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes. Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, ces directives, et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies 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 concordent pas avec ces directives, existent peut-être déjà. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à essayer, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient alignées sur la présente Norme internationale, si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

0.2 Pour des raisons pratiques, la définition de *Clostridium perfringens* donnée au chapitre 3 et utilisée comme base pour le mode opératoire, ne décrit pas exclusivement les souches de *Clostridium perfringens*. En particulier, les essais de confirmation sont inadéquats pour distinguer *Clostridium perfringens* des autres espèces de *Clostridium* proches, mais moins communément rencontrées, telles que *C. paraperfringens*, *C. absolum*, etc.

0.3 Pour des raisons statistiques, il est admis que la limite du nombre de colonies le plus bas à compter par boîte est de

15, mais il est souvent demandé, pour des besoins pratiques, de procéder à un comptage sur des nombres encore inférieurs de *Clostridium perfringens*. Les limites de confiance de telles déterminations (estimation des petits nombres) sont données en annexe.

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* revivifiables dans les produits destinés à la consommation humaine où à l'alimentation animale.

2 Référence

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

3 Définitions

Dans le cadre de la présente Norme internationale, les définitions suivantes sont applicables.

3.1 *Clostridium perfringens*: Bactéries qui forment des colonies noires dans le milieu sélectif spécifié et qui donnent des réactions de confirmation positives lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

3.2 dénombrement de *C. perfringens*: Détermination du nombre de bactéries *Clostridium perfringens* revivifiables et confirmées par millilitre ou par gramme d'échantillon lorsque l'essai est effectué suivant la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

4 Principe

4.1 Ensemencement des boîtes de Petri avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Dans les mêmes conditions, ensemencement des dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Mélange avec un milieu sélectif (ensemencement dans la masse) et addition d'une couche du même milieu par dessus.

4.2 Incubation en anaérobiose des boîtes à 35 °C ou 37 °C¹⁾ durant 20 h.

4.3 Calcul du nombre de colonies caractéristiques, à partir du nombre des colonies noires visibles sur les boîtes.

4.4 Soumission des colonies caractéristiques aux opérations de confirmation et calcul du nombre de *C. perfringens* par millilitre ou par gramme d'échantillon.

5 Diluant, milieux de culture et réactifs

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. De même, des réactifs préparés commercialement peuvent être également utilisés. Les instructions 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 déionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance de *Clostridium perfringens* dans les conditions de l'essai.

Les mesures du pH doivent être faites au moyen d'un pH-mètre (6.5), réglé à la température de 25 °C.

Si le diluant et les milieux de culture ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité à une température d'environ 4 °C, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

5.2 Diluant

Voir ISO 6887 et la Norme spécifique traitant du produit à examiner.

5.3 Gélose tryptose-sulfite à la cyclosérine (SC)²⁾ exempte de jaune d'œuf

5.3.1 Milieu de base

Composition

Tryptose ³⁾	15,0 g
Sojatone ³⁾	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Bisulfite disodique (Na ₂ S ₂ O ₅), anhydre	1,0 g
Citrate de fer(III) ammoniacal ⁴⁾	1,0 g
Agar-agar	12,0 à 18,0 g ⁵⁾
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,6 à 25 °C.

Transvaser le milieu de base dans des tubes ou flacons de capacité maximale de 500 ml.

Stériliser durant 10 min à 121 °C.

Conserver au réfrigérateur à 4 ± 2 °C.

Ne pas utiliser le milieu plus de 2 semaines après sa préparation.

Préparation des boîtes de gélose en vue de la confirmation

Répartir par quantités de 15 ml le milieu de base liquéfié et refroidi à environ 45 °C dans des boîtes de Petri et laisser se solidifier.

Immédiatement avant l'emploi, faire sécher les boîtes de préférence ouvertes, avec la surface de la gélose orientée vers le bas, dans une étuve (6.2) à 50 °C durant 30 min.

Si elles sont préparées à l'avance, les boîtes non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température ambiante ou plus de 1 jour à 4 °C.

5.3.2 Solution de D-cyclosérine

Composition

D-cyclosérine (n'utiliser que de la poudre blanche cristalline)	4,0 g
Eau	100 ml

1) La température d'incubation doit faire l'objet d'accord entre les parties concernées et doit être indiquée dans le procès-verbal d'essai.

2) SC était désigné à l'origine comme TSC exempt d'EY (HAUSCHILD and HILSHEIMER. *Appl. Microbiol.* 27 (1974) pp. 78-82).

3) Les dénominations «tryptose» et «sojatone» ne sont utilisées actuellement que par certains fabricants de milieux. Tout autre digestat pancréatique de caséine ou de soja fournissant des résultats comparables peut être utilisé.

4) Ce réactif doit contenir au moins 15 % (m/m) de fer.

5) Selon les instructions du fabricant.

Préparation

Dissoudre la D-cyclosérine dans l'eau et stériliser la solution par filtration.

Conserver au réfrigérateur à 4 ± 2 °C.

Ne pas utiliser la solution plus de quatre semaines après sa préparation.

5.3.3 Milieu complet

Avant l'ensemencement (voir 9.2), ajouter 1 ml de la solution stérilisée de D-cyclosérine (5.3.2) par 100 ml de milieu de base stérile (5.3.1) liquéfié à 50 °C.

5.4 Milieu thioglycolate liquide**Composition**

Digestat pancréatique de caséine	15,0 g
L-cystine	0,5 g
Dextrose (d-glucose)	5,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Chlorure de sodium	2,5 g
Thioglycolate de sodium (mercaptoacétate)	0,5 g
Agar-agar	1,0 à 5,0 g ¹⁾
Resazurine	0,001 g
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition.

Ajuster le pH de façon qu'après stérilisation, il soit de 7,1 à 25 °C.

Répartir dans des tubes par quantités de 10 ml et stériliser à 121 °C durant 15 min.

5.5 Milieu nitrate-mobilité**Composition**

Peptone	5,0 g
Extrait de viande de bœuf	3,0 g
Galactose	5,0 g
Glycérol	5,0 g
Nitrate de potassium (KNO ₃)	1,0 g
Hydrogène-orthophosphate disodique (Na ₂ HPO ₄)	2,5 g
Agar-agar	1,0 à 5,0 g ¹⁾
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition.

Ajuster le pH de façon qu'après stérilisation, il soit de 7,3 à 25 °C.

Répartir le milieu dans des tubes par quantités de 10 ml et stériliser à 121 °C durant 15 min.

Si la préparation n'est pas utilisée le jour même, conserver au réfrigérateur à 4 ± 2 °C; juste avant l'emploi chauffer dans l'eau bouillante ou par courant de vapeur pendant 15 min, puis refroidir rapidement pour amener à la température d'incubation.

Ne pas utiliser le milieu plus de 4 semaines après sa préparation.

5.6 Milieu lactosé à la gélatine**Composition**

Tryptose ²⁾	15,0 g
Extrait de levure	10,0 g
Lactose	10,0 g
Gélatine	120,0 g
Rouge de phénol	0,05 g
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants à l'exception du lactose et du rouge de phénol dans l'eau.

Ajuster le pH de façon qu'après stérilisation il soit de 7,5 à 25 °C.

Ajouter le lactose et le rouge de phénol, répartir par quantités de 10 ml dans des tubes et stériliser à 121 °C durant 15 min.

Si la préparation n'est pas utilisée le jour même, conserver au réfrigérateur à 4 ± 2 °C.

Juste avant l'emploi, chauffer dans l'eau bouillante ou sous courant de vapeur durant 15 min, puis refroidir rapidement à la température d'incubation.

Ne pas utiliser le milieu plus de 3 semaines après sa préparation.

5.7 Réactif pour la recherche des nitrites**5.7.1 Solution d'acide amino-5 naphthalène-2 sulfonique (5-2 ANSA)**

Dissoudre 0,1 g de 5-2 ANSA dans 100 ml de solution d'acide acétique à 15 % (V/V). Filtrer sur papier filtre.

Conserver dans un flacon de verre brun bien bouché (de préférence muni de compte-gouttes) à 4 °C.

5.7.2 Solution d'acide sulfanilique

Dissoudre 0,4 g d'acide sulfanilique dans 100 ml de solution d'acide acétique à 15 % (V/V). Filtrer sur papier filtre.

1) Selon les instructions du fabricant.

2) Le nom de «tryptose» n'est actuellement utilisé que par certains fabricants. Tout autre digestat de caséine fournissant des résultats comparables peut être utilisé.

Conserver dans un flacon de verre brun bien bouché (de préférence muni de compte-gouttes) à 4 °C.

5.7.3 Préparation du réactif complet

Mélanger les volumes égaux des deux solutions (5.7.1 et 5.7.2) juste avant l'emploi.

Jeter immédiatement le réactif non utilisé.

5.8 Zinc pulvérulent

6 Appareillage et verrerie

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

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

6.1 Appareil pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave) (autoclave autonome ou faisant partie d'un appareillage pour préparer et répartir les milieux).

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

- a) au four, en le maintenant à une température de 170 à 175 °C durant au moins 1 h;
- b) à l'autoclave, en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C durant au moins 20 min.

6.2 Enceinte de séchage ou étuve, ventilé(e) par convection, (pour le séchage des boîtes de gélose), réglable à 50 ± 1 °C.

6.3 Étuve, réglable à 35 ± 1 °C ou 37 ± 1 °C selon la température adoptée¹⁾ (permettant de maintenir les milieux, boîtes et tubes ensemencés dans l'un ou l'autre de ces intervalles de température).

6.4 Jarres pour anaérobies, ou autre appareillage approprié pour la culture en anaérobiose.

6.5 pH-mètre, ayant une précision de réglage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C.

6.6 Anses bouclées, en platine iridié ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre et fil à ensemencer de même métal.

6.7 Appareil de filtration, pour la stérilisation des solutions.

6.8 Tubes à essais, de 18 mm de diamètre et 180 mm de longueur, et **flacons de culture**²⁾, pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture et l'incubation des milieux liquides.

6.9 Éprouvettes graduées, pour la préparation des milieux complets.

6.10 Pipettes graduées, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, de capacités nominales de 1 et 10 ml, graduées en 0,1 ml et 0,5 ml, respectivement avec une ouverture nominale de 2 à 3 mm de diamètre.

6.11 Poires en caoutchouc, à utiliser avec les pipettes servant à répartir les réactifs pour la recherche des nitrites.

6.12 Boîtes de Petri, en verre ou en plastique, de 90 à 100 mm de diamètre.

7 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Voir la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir ISO 6887 et la norme spécifique du produit concerné.

9.2 Ensemencement et incubation (technique d'ensemencement dans la masse)

À l'aide d'une pipette stérile, verser en double, 1 ml de chaque dilution de la suspension mère, ou de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, au centre des boîtes de Petri vides. Verser 15 à 20 ml de gélose SC (5.3.3) dans chaque boîte et bien mélanger avec l'inoculum en faisant tourner doucement chaque boîte. Lorsque le milieu s'est solidifié, ajouter une couche de 10 ml au-dessus de la même gélose SC. Laisser se solidifier et placer les boîtes, le dessus en haut, dans les jarres pour anaérobies ou tous autres récipients appropriés (6.4) et faire incuber à 35 °C ou 37 °C¹⁾ durant 20 h. Une incubation de plus longue durée peut avoir pour conséquence un excès de noircissement sur le bord du fond des boîtes.

1) La température d'incubation doit faire l'objet d'accord entre les parties concernées et doit être indiquée dans le procès-verbal d'essai.

2) Des flacons de culture munis de couvercles à vis en métal peuvent être utilisés.

9.3 Comptage des colonies

9.3.1 Après la période d'incubation spécifiée (voir 9.2), compter et noter le nombre de colonies caractéristiques sur les boîtes conformément à 9.3.2, 9.3.3, 9.3.4 et 9.3.5. Les colonies de *C. perfringens* sont noires.

9.3.2 Si les deux boîtes correspondant à une certaine dilution contiennent entre 15 et 150 colonies caractéristiques, compter les colonies caractéristiques sur chaque boîte et noter la moyenne arithmétique des dénombrements effectués sur les deux boîtes, sinon noter le nombre sur une boîte.

9.3.3 S'il existe des boîtes contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques pour deux dilutions consécutives, compter les colonies caractéristiques sur chaque boîte correspondant à la dilution respective et déterminer la moyenne arithmétique des dénombrements effectués sur les deux boîtes correspondant à chacune des deux dilutions comme spécifié en 9.3.2. Noter la moyenne arithmétique des deux valeurs obtenues, sauf dans le cas où le rapport de la valeur la plus haute à la valeur la plus basse est supérieure à 2; dans ce cas, retenir comme valeur la plus faible des deux.

9.3.4 Si des boîtes (voir 9.3.2) présentent des parties totalement noires ou s'il est difficile de compter les colonies caractéristiques bien isolées, compter les colonies sur les boîtes à la dilution suivante plus élevée, même si leur nombre est inférieur à 15, et procéder comme en 9.3.5.

9.3.5 S'il existe moins de 15 colonies caractéristiques sur les boîtesensemencées à partir de la suspension mère ou de l'échantillon pour essai (si le produit à examiner est liquide), compter le nombre réel de colonies caractéristiques sur chaque boîte et noter la moyenne arithmétique des dénombrements effectués sur les deux boîtes.

9.3.6 S'il n'existe aucune colonie caractéristique sur les boîtesensemencées à partir de la suspension mère ou de l'échantillon pour essai (si le produit à examiner est liquide), porter l'indication «pas de colonie observée».

9.4 Confirmation

9.4.1 Sélection et purification des colonies en vue de leur confirmation

Sélectionner un total de 10 colonies caractéristiques sur les boîtes dénombrées conformément à 9.3.2, 9.3.3 ou 9.3.4. S'il existe moins de 10 colonies sur les boîtes comptées, sélectionner toutes les colonies caractéristiques présentes. Confirmer ces colonies comme décrit en 9.4.2.

Si les boîtes sont envahies et s'il n'est pas possible de sélectionner des colonies caractéristiques bien isolées, ensemencer 10 colonies caractéristiques dans le milieu de thioglycolate

liquide (5.4). Incuber dans des conditions anaérobies à 35 °C ou 37 °C¹⁾ durant 18 à 24 h. Ensemencer par stries les colonies sur des boîtes de gélose de base SC (voir 5.3.1) et ajouter par-dessus une couche de 10 ml de la gélose de base SC.

Laisser se solidifier et incuber en anaérobiose à 35 °C ou 37 °C¹⁾ durant 18 à 24 h.

Choisir sur chaque boîte au moins une colonie caractéristique et bien distincte.

Confirmer cette colonie comme décrit en 9.4.2.

Si nécessaire, répéter l'ensemencement par stries sur boîtes de gélose de base SC jusqu'à ce que l'on obtienne des colonies noires caractéristiques bien isolées.

9.4.2 Confirmation biochimique

9.4.2.1 Confirmation à l'aide du milieu nitrate-mobilité

Ensemencer pour piqûre les colonies sélectionnées (voir 9.4.1) dans le milieu nitrate-mobilité (5.5). Incuber dans des conditions anaérobies à 35 °C ou 37 °C¹⁾ durant 24 h.

Examiner les tubes de milieu nitrate-mobilité afin de connaître le type de croissance le long de la piqûre d'ensemencement. La mobilité se manifeste par un développement diffus au milieu du tube à partir de la piqûre.

Effectuer l'essai pour rechercher des nitrites en ajoutant 0,2 à 0,5 ml du réactif pour la recherche des nitrites (5.7) dans chaque tube de milieu nitrate-mobilité.²⁾ L'apparition de coloration rouge confirme la réduction des nitrates en nitrites.

Si l'on n'observe pas de coloration rouge dans les 15 min, ajouter une faible quantité de zinc pulvérulent (5.8) et laisser reposer pendant 10 min. Si après addition de zinc pulvérulent l'on observe une coloration rouge, il n'y a pas eu réduction des nitrates.

9.4.2.2 Confirmation à l'aide du milieu lactosé à la gélatine

Ensemencer les colonies sélectionnées (voir 9.4.1) dans le milieu lactosé à la gélatine (5.6). Incuber dans des conditions anaérobies à 35 °C ou 37 °C¹⁾ durant 24 h.

Examiner les tubes de milieu lactosé à la gélatine afin de détecter la présence de gaz et une couleur jaune (due à l'acide) indiquant la fermentation du lactose. Refroidir les tubes pendant 1 h à 5 °C et vérifier s'il y a liquéfaction de la gélatine. Si le milieu est solidifié, réincuber durant 24 h supplémentaires et vérifier de nouveau s'il y a liquéfaction de la gélatine.

9.4.3 Interprétation

Les bactéries qui forment des colonies noires dans le milieu SC, ne sont pas mobiles, réduisent les nitrates en nitrites, produisent de l'acide et du gaz à partir du lactose et liquéfient la gélatine en 48 h, sont considérées comme étant des *C. perfringens*.

1) La température d'incubation doit faire l'objet d'accord entre les parties concernées et doit être indiquée dans le procès-verbal d'essai.

2) Pour des raisons de santé, il est souhaitable d'effectuer cet essai sous une hotte d'aspiration.