

---

---

**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*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 6391:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73a6f77b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997>



## Sommaire

Page

1	Domaine d'application.....	1
2	Références normatives .....	1
3	Définitions .....	1
4	Principe .....	2
5	Diluant, milieux de culture et réactif .....	2
6	Appareillage et verrerie .....	5
7	Echantillonnage .....	5
8	Préparation de l'échantillon pour essai .....	5
9	Mode opératoire.....	6
10	Expression des résultats .....	7
11	Rapport d'essai .....	8
<b>Annexe A (informative) Bibliographie.....</b>		<b>9</b>

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sis/75a0177b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997>

© ISO 1997

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'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse  
Internet central@iso.ch  
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé 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 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.

La Norme internationale ISO 6391 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 6, *Viande et produits à base de viande*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 6391:1988), dont elle constitue une révision technique.

L'annexe A de la présente Norme internationale est donnée uniquement à titre d'information.

## 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 a 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 peuvent être trouvées dans l'ISO 7218.

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

[ISO 6391:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73a6f77b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73a6f77b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997>

# 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* pour tous les types de viandes et les produits à base de viande, y compris la volaille.

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

NOTE 1 La méthode peut ne pas être adaptée à l'examen de viandes transformées ayant une teneur élevée en bactéries formant des spores en aérobiose.

NOTE 2 Quelques souches pathogènes d'*Escherichia coli* peuvent ne pas être détectées par cette méthode.

[ISO 6391:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73a6f77b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73a6f77b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997>

## 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, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente 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 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

ISO 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.*

## 3 Définitions

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

### 3.1

#### ***Escherichia coli***

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

## 4 Principe

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

### 4.1 Revivification

Inoculation d'une quantité spécifiée de suspension mère sur des membranes en acétate de cellulose appliquées soit sur gélose au glutamate modifiée soit sur une gélose tryptone soja, et incubation à 37 °C pendant 4 h.

NOTE — Ce mode opératoire permet la revivification des *Escherichia 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 s'ils sont 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 au tryptone-soja. Incubation à 44 °C pendant 18 h à 20 h.

### 4.3 Recherche

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

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 6391:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73a6f77b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997)

### 4.4 Calcul

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73a6f77b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997>

Calcul du nombre *Escherichia 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.

## 5 Diluant, milieux de culture et réactifs

### 5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218.

### 5.2 Diluant

Pour la préparation des dilutions, voir l'ISO 6887.

### 5.3 Milieu de revivification : Gélose au glutamate modifiée

#### 5.3.1 Composition

Glutamate de sodium	6,35 g
Lactose	10,0 g
Formate de sodium	0,25 g
L(-)-cystine	0,02 g
L(-)-acide aspartique	0,024 g
L(+)-arginine	0,02 g
Thiamine	0,001 g
Acide nicotinique	0,001 g
Acide pantothénique	0,001 g
Sulfate de magnésium (MgSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O)	0,100 g
Citrate ammoniacal de fer(II) [au moins 15 % Fe (m/m)]	0,010 g
Chlorure de calcium (CaCl <sub>2</sub> ,2H <sub>2</sub> O)	0,010 g
Monohydrogénophosphate de potassium	0,90 g
Chlorure d'ammonium	2,5 g
Agar-agar	12 g à 18 g <sup>1)</sup>
Eau	1 000 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

#### 5.3.2 Préparation

Dissoudre le chlorure d'ammonium dans l'eau. Ajouter les autres composants et les dissoudre en portant à ébullition. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de 6,7 à 7,5 °C. Répartir, par quantités de 100 ml, dans des récipients appropriés (6.5), et stériliser pendant 15 min à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C.

#### 5.3.3 Préparation des boîtes de gélose

Répartir le milieu refroidi à environ 47 °C dans le bain d'eau, par quantités de 12 ml à 15 ml dans les boîtes de Petri stériles (6.6) et laisser se solidifier. Les boîtes peuvent être conservées entre 0°C et + 5 °C jusqu'à une semaine.

Immédiatement avant utilisation sécher soigneusement les boîtes de gélose (par exemple dans une étuve (6.4) réglée à 50 °C), de préférence avec les couvercles enlevés et la surface de la gélose tournée vers le bas, jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu. Ne pas les sécher davantage.

NOTE — La gélose doit être suffisamment sèche pour que 1 ml d'inoculum soit totalement absorbé dans l'ensemble membrane/agar-agar en 15 min (voir 9.2.3).

## 5.4 Milieu sélectif : Gélose tryptonée bilée (voir la référence [3])

### 5.4.1 Composition

Tryptone	20,0 g <sup>1)</sup>
Sels biliaires (purifiés)	1,5 g <sup>2)</sup>
Agar-agar	12 g à 18 g <sup>3)</sup>
Eau	1 000 ml

1) Il convient d'utiliser des marques qui favorisent la production d'indole.

2) 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.

3) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

### 5.4.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en 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 pendant 15 min à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C.

## iTeh STANDARD PREVIEW

### 5.4.3 Préparation des boîtes de gélose

(standards.iteh.ai)

Répartir le milieu refroidi à environ 47 °C, par quantités de 12 ml à 15 ml dans des boîtes de Petri stériles (6.6) et laisser se solidifier. Les boîtes peuvent être conservées entre 0 °C et + 5 °C pendant 4 jours.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73a6f77b-4d7d-4bf8-b772-4973f8178074/iso-6391-1997>

Immédiatement avant l'utilisation, sécher soigneusement les boîtes de gélose [par exemple dans une étuve (6.4) réglée à 50 °C], de préférence avec les couvercles enlevés et la surface de la gélose tournée vers le bas, jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu. Ne pas les sécher davantage.

## 5.5 Réactifs pour la recherche de l'indole (réactif de Vracko et Sherris)

### 5.5.1 Composition

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

### 5.5.2 Préparation

Dissoudre le réactif dans l'acide chlorhydrique et le conserver à température ambiante pendant un mois maximum.

## 6 Appareillage et verrerie

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

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

Voir l'ISO 7218.

**6.2 Etuve**, réglable à  $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  ou  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

**6.3 Etuve**, réglable à  $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ .

**6.4 Enceinte de séchage ou étuve**, ventilée par convection, réglable à  $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .

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

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

**6.7 Membrane en acétate de cellulose**, de 0,45  $\mu\text{m}$  à 1,2  $\mu\text{m}$  de diamètre de pores et de 85 mm de diamètre.

**6.8 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.

**6.9 Etaleurs**, 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.

**6.10 Bain d'eau**, ou équipement similaire, réglable à  $47\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ .

**6.11 Lampe UV à grande longueur d'onde (365 nm)**, équipée d'un filtre permettant de supprimer les radiations UV en dessous de 310 nm.

**6.12 pH-mètre**, précis à  $\pm 0,1$  unité de pH à  $25\text{ °C}$ .

## 7 Echantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 3100-1 [4].

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon selon les spécifications de la Norme internationale relative au produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

Une méthode recommandée est donnée dans l'ISO 3100-2 [5].