

NORME INTERNATIONALE **ISO 15213-1**

Première édition
2023-01

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Clostridium* spp. —

Partie 1:

Dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfite-réductrices par la technique de comptage des colonies

[ISO 15213-1:2023](https://standards.iso.org/iso/15213-1-2023)

<https://standards.iso.org/iso/15213-1-2023> *Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection and enumeration of *Clostridium* spp. —*

*Part 1: Enumeration of sulfite-reducing *Clostridium* spp. by colony-count technique*



Numéro de référence
ISO 15213-1:2023(F)

© ISO 2023

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 15213-1:2023](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1132d699-4297-4fd0-8e1a-5932712cc27b/iso-15213-1-2023)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1132d699-4297-4fd0-8e1a-5932712cc27b/iso-15213-1-2023>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2023

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
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	2
3 Termes et définitions	2
4 Principe	3
4.1 Généralités	3
4.2 Préparation des dilutions	3
4.3 Dénombrement	3
4.4 Confirmation	3
5 Milieux de culture et réactifs	3
6 Équipement et consommables	4
7 Échantillonnage	4
8 Préparation de l'échantillon pour essai	5
9 Mode opératoire	5
9.1 Généralités	5
9.2 Prise d'essai, suspension mère et dilutions	5
9.3 Traitement thermique pour la sélection des spores	5
9.4 Ensemencement et incubation	6
9.5 Dénombrement des colonies caractéristiques	6
9.6 Confirmation des bactéries <i>Clostridium</i> spp. sulfito-réductrices	7
10 Expression des résultats	7
11 Validation de la méthode	8
11.1 Étude interlaboratoires	8
11.2 Caractéristiques de performance	8
12 Rapport d'essai	9
13 Assurance qualité	9
Annexe A (normative) Logigramme du mode opératoire	10
Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs	12
Annexe C (informative) Caractéristiques de performance de la méthode	15
Annexe D (informative) Protocole spécial pour le dénombrement des bactéries <i>Clostridium</i> spp. sulfito-réductrices dans les aliments pour animaux	18
Bibliographie	22

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 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).

Cette première édition de l'ISO 15213-1 annule et remplace l'ISO 15213:2003, qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- le domaine d'application a été élargi pour inclure les échantillons prélevés au stade de la production primaire;
- le domaine d'application de la méthode ne mentionne plus les «bactéries sulfite-réductrices» mais les «bactéries *Clostridium* spp. sulfite-réductrices»; les colonies caractéristiques sur les boîtes de gélose sulfite-fer (ISA) sont donc confirmées;
- la teneur en sulfite dans la gélose sulfite-fer a été réduite de 1,0 g/l à 0,5 g/l;
- le traitement thermique de 10 min à 80 °C a été rendu facultatif, il est appliqué si la flore annexe est élevée ou pour le dénombrement uniquement des spores de bactéries *Clostridium* spp. sulfite-réductrices dans l'échantillon;
- la possibilité d'utiliser des tubes pour l'ensemencement a été supprimée;
- la possibilité d'incuber les échantillons à 50 °C pour le dénombrement des bactéries sulfite-réductrices thermophiles a été supprimée;
- une description de la méthode de confirmation des colonies caractéristiques a été ajoutée;

- le logigramme à l'[Annexe A](#) qui donne une brève description du mode opératoire a été révisé;
- les caractéristiques de performances ont été ajoutées à l'[Annexe C](#);
- l'[Annexe D](#) a été ajoutée pour fournir un protocole spécial pour le dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfite-réductrices dans les aliments pour animaux.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 15213 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.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 15213-1:2023](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/1132d699-4297-4fd0-8e1a-5932712cc27b/iso-15213-1-2023>

Introduction

Les bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices sont des bactéries anaérobies strictes, Gram-positives, en forme de bâtonnet, produisant des spores. Les espèces les plus connues de ce genre sont les suivantes: *Clostridium* (*C.*) *perfringens*, *C. bifermentans*, *C. sporogenes* et *C. botulinum*. Certaines espèces peuvent provoquer des intoxications alimentaires. Comme toutes les bactéries ubiquitaires, elles se trouvent principalement dans l'environnement. Les espèces *Clostridium* sont présentes dans le sol et dans le tube digestif des animaux et des humains.

Les bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices, y compris *C. perfringens*, sont couramment utilisées en tant qu'indicateurs microbiens de contamination clostridienne lors de la fabrication d'aliments (par exemple, la production de viande). Elles peuvent produire des spores thermorésistantes. En dehors de l'industrie laitière, l'utilisation des bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices en tant qu'indicateur microbien est limitée à un nombre relativement restreint d'aliments. Son application actuelle à des aliments non laitiers est soit une indication de contamination fécale (notamment *C. perfringens*, voir aussi l'ISO 15213-2 et l'ISO/TS 15213-3) et/ou un indicateur de contrôle d'hygiène/de procédés lié à la croissance et à la survie potentielles de bactéries sporulées anaérobies.

Le présent document décrit la méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices dans les aliments, les aliments pour animaux, les échantillons environnementaux et les échantillons prélevés au stade de la production primaire. La méthode de dénombrement de *C. perfringens* est décrite dans l'ISO 15213-2. La méthode de détection de *C. perfringens* est décrite dans l'ISO/TS 15213-3. Ces trois parties sont publiées sous la forme d'une série de Normes internationales, car les méthodes sont étroitement liées les unes aux autres. Ces méthodes sont souvent utilisées conjointement dans un laboratoire et les milieux et leurs caractéristiques de performance peuvent être similaires.

Les principales modifications techniques énumérées dans l'Avant-propos et introduites dans le présent document par rapport à l'ISO 15213:2003 sont considérées comme des modifications significatives (voir l'ISO 17468).

Ces modifications ont un impact majeur sur les caractéristiques de performance de la méthode.

Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Clostridium* spp. —

Partie 1:

Dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices par la technique de comptage des colonies

AVERTISSEMENT — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel que les essais de dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices ne soient effectués que dans des laboratoires correctement équipés, sous la surveillance d'un microbiologiste expérimenté, et qu'un grand soin soit apporté à l'élimination de tous les matériaux incubés. Il convient que les utilisateurs du présent document connaissent les pratiques de laboratoire normales. Le présent document ne prétend pas couvrir la totalité des aspects liés à la sécurité qui pourraient découler de son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de mettre en place des pratiques de santé et de sécurité appropriées.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie le dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices par la technique de comptage des colonies.

Le présent document s'applique:

- aux produits destinés à la consommation humaine;
- aux produits destinés à l'alimentation animale;
- aux échantillons environnementaux prélevés dans les secteurs de la production et de la distribution des aliments; et
- aux échantillons prélevés au stade de la production primaire.

NOTE Cette méthode a été validée dans le cadre d'une étude interlaboratoires pour les catégories d'aliments suivantes:

- les produits à base de viande prêts à consommer et prêts à réchauffer;
- les œufs et ovoproduits (dérivés);
- les fruits et légumes transformés;
- les préparations et céréales pour nourrissons;
- les aliments composés ou les composants de repas.

Elle a également été validée pour les catégories suivantes:

- les produits destinés à l'alimentation animale et les aliments pour animaux;
- les échantillons environnementaux (production d'aliments ou d'aliments pour animaux).

ISO 15213-1:2023(F)

Cette méthode ayant été validée pour au moins cinq catégories d'aliments, elle s'applique à un large éventail d'aliments. Pour des informations détaillées sur la validation, voir l'Article 11 et l'Annexe C. Étant donné que cette méthode n'est pas couramment utilisée pour les échantillons au stade de la production primaire, cette catégorie n'a pas été incluse dans l'étude interlaboratoires. Par conséquent, aucune caractéristique de performance n'a été déterminée pour cette catégorie.

Cette méthode horizontale a été initialement développée pour l'examen de tous les échantillons provenant de la chaîne alimentaire. Sur la base des informations disponibles au moment de la publication du présent document, cette méthode est considérée comme parfaitement adaptée à l'examen de tous les échantillons provenant de la chaîne alimentaire. Cependant, en raison de la grande diversité des produits de la chaîne alimentaire, il est possible que cette méthode horizontale ne soit pas appropriée dans ses moindres détails à tous les produits. Néanmoins, il est attendu que les modifications requises soient réduites au minimum afin qu'elles n'entraînent pas de déviation significative de cette méthode horizontale.

Cette technique est adaptée, sans toutefois s'y limiter, au dénombrement des micro-organismes dans les échantillons d'essai avec un minimum de 10 colonies dénombrées par boîte. Cela correspond à un niveau de contamination attendu supérieur à 10 UFC/ml pour les échantillons liquides ou supérieur à 100 UFC/g pour les échantillons solides.

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 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 microbiologique*

ISO 7218, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques*

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 19036:2019, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Estimation de l'incertitude de mesure pour les déterminations quantitatives*

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

bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices

genre de micro-organismes de la famille des *Clostridiaceae*, généralement capables de croître dans/ sur la gélose sulfite-fer (ISA) dans des conditions anaérobies, formant des colonies plus ou moins caractéristiques et présentant certaines propriétés lors d'essais de confirmation biochimique

Note 1 à l'article: Les essais de confirmation biochimique sont décrits en 9.6.

3.2

dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices

détermination du nombre d'unités formant colonies (UFC) de bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices (3.1) par gramme, par millilitre, par centimètre carré ou par dispositif d'échantillonnage, lors de l'essai spécifié

Note 1 à l'article: Les essais spécifiés sont décrits à l'[Article 9](#).

4 Principe

4.1 Généralités

Une quantité déterminée de l'échantillon d'essai liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits, est déposée dans une boîte de Petri vide et bien mélangée à un milieu de culture gélosé fondu spécifié, constituant ainsi une boîte coulée. D'autres boîtes sont préparées dans les mêmes conditions à partir de dilutions décimales de l'échantillon pour essai. Après solidification du milieu de culture gélosé, une surcouche est utilisée afin de prévenir le développement des colonies à la surface du milieu. Si l'objectif est de ne dénombrer que les spores, un traitement thermique de 10 min à 80 °C doit être effectué avant la mise en culture.

Lorsqu'il est attendu que le nombre d'UFC soit au niveau ou proche de la limite de détection, il est préférable d'utiliser des boîtes en double exemplaire. En cas d'utilisation de boîtes en double exemplaire, il convient que la somme des colonies sur les deux boîtes soit au minimum égale à 10. Dans ce cas, il est attendu que le niveau de contamination soit supérieur à 5 UFC/ml pour les échantillons liquides ou supérieur à 50 UFC/g pour les échantillons solides.

La technique d'ensemencement en profondeur avec une surcouche est particulièrement appropriée pour le dénombrement de produits susceptibles de contenir des colonies envahissantes et qui peuvent masquer les colonies des micro-organismes cibles.

Le dénombrement des bactéries *Clostridium* spp. sulfito-réductrices exige de suivre quatre étapes successives comme précisé à l'[Annexe A](#).

4.2 Préparation des dilutions

Pour la préparation des dilutions décimales à partir des prises d'essai, suivre le mode opératoire spécifié dans la série ISO 6887.

4.3 Dénombrement

Les boîtes sont incubées dans des conditions anaérobies à 37 °C pendant 48 h. Après incubation, le nombre de colonies caractéristiques, présentant une coloration noire ou grise à jaune-brun, est calculé. La couleur des colonies et de la zone environnante change en raison de la formation de sulfure de fer(II) à la suite de la réaction entre les ions sulfure et le fer trivalent [Fe(III)] présents dans le milieu.

4.4 Confirmation

Les colonies caractéristiques sont prélevées pour confirmation.

NOTE Si aucune confirmation n'est effectuée, les résultats peuvent être consignés sous la mention «bactéries anaérobies sulfito-réductrices».

5 Milieux de culture et réactifs

Suivre les pratiques courantes de laboratoire conformément à l'ISO 7218. La composition des milieux de culture et des réactifs et leur préparation sont spécifiées à l'[Annexe B](#). Pour les essais de performance des milieux de culture, suivre les modes opératoires conformément à l'[Annexe B](#) et à l'ISO 11133.

6 Équipement et consommables

Le matériel à usage unique est une alternative acceptable à la verrerie réutilisable, à condition que ses spécifications soient appropriées. Le matériel courant de laboratoire de microbiologie (voir l'ISO 7218) et, en particulier, ce qui suit doit être utilisé.

6.1 Appareillage approprié pour créer une anaérobiose, jarre à fermeture étanche ou tout autre appareillage approprié permettant d'obtenir et de maintenir des conditions d'anaérobiose pendant toute la durée de l'incubation du milieu de culture. D'autres systèmes de performances équivalentes, tels que les chambres d'anaérobiose, peuvent être utilisés. Suivre les instructions du fabricant pour l'installation et l'entretien.

La composition de l'atmosphère requise peut être obtenue par addition d'un mélange gazeux (par exemple d'une bouteille de gaz) après évacuation de l'air de la jarre, par déplacement de l'atmosphère dans une chambre d'anaérobiose ou par tout autre moyen approprié (par exemple les systèmes gazeux disponibles dans le commerce). En règle générale, l'incubation anaérobiose nécessite une atmosphère contenant moins de 1 % (fraction volumique) d'oxygène, entre 9 % et 13 % (fraction volumique) de dioxyde de carbone.

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

6.3 Étuve, réglable à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.4 pH-mètre, ayant une exactitude d'étalonnage de $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .

6.5 Réfrigérateur, réglable à $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

6.6 Flacons, fioles ou tubes stériles d'une capacité appropriée. Des flacons, fioles ou tubes avec capuchons à vis en métal ou en plastique non toxique peuvent être utilisés.

6.7 Pipettes graduées ou pipettes automatiques stériles, de capacités nominales 10 ml et 1 ml.

6.8 Anses stériles, d'environ 1 μl de volume, ou aiguille ou fil à ensemercer.

6.9 Boîtes de Petri stériles, d'environ 90 mm de diamètre et (facultatif) de grandes dimensions (environ 140 mm de diamètre).

6.10 Bain-marie à régulation thermostatique, réglable à une température comprise entre 44 °C et 47 °C et à une température de $80\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Suivre la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées parviennent à un accord sur ce sujet.

Des techniques d'échantillonnage recommandées sont décrites dans les documents suivants:

- l'ISO/TS 17728 pour les aliments et les aliments pour animaux;
- l'ISO 707 pour le lait et les produits laitiers;
- l'ISO 6887-3 pour les mollusques crus, les tuniciers et les échinodermes de zones de production primaire;

- l'ISO 13307 pour le stade de la production primaire;
- l'ISO 17604 pour les carcasses;
- l'ISO 18593 pour les surfaces.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif du produit étudié. Il convient que l'échantillon n'ait pas été endommagé ni modifié au cours du transport ou du stockage.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai à partir de l'échantillon de laboratoire, conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. Suivre les modes opératoires spécifiés dans la série ISO 6887. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées s'accordent sur ce sujet.

9 Mode opératoire

9.1 Généralités

Un logigramme du mode opératoire est présenté à l'[Annexe A](#).

9.2 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Suivre les modes opératoires conformément à la série ISO 6887 et à la Norme internationale spécifique du produit concerné.

Préparer une seule série de dilutions décimales à partir de la prise d'essai si le produit est liquide et à partir de la suspension mère dans le cas des autres produits.

Un protocole spécial pour la préparation de la suspension mère des échantillons d'aliments pour animaux est donné à l'[Annexe D](#).

9.3 Traitement thermique pour la sélection des spores

S'il ne s'agit que de dénombrer les spores, chauffer la série de dilutions décimales à 80 °C au bain-marie (6.10) pendant 10 min ± 1 min. Le traitement thermique doit être effectué dans les 15 min suivant la préparation de la suspension mère afin d'éviter toute germination des spores. Si le tube n'est pas placé dans le bain-marie dans les 15 min, il convient de le placer immédiatement dans un bac à glace pendant 2 h au maximum.

Durant le traitement thermique, il convient de surveiller la température en plaçant un thermomètre adapté dans un flacon de référence de taille identique au flacon de l'échantillon et contenant le même volume d'eau à la même température initiale que l'échantillon traité (6.6). Il convient de ne pas fermer hermétiquement les tubes durant le traitement thermique. Le temps nécessaire pour atteindre 80 °C ne doit pas dépasser 5 min et peut être réduit au minimum en veillant à ce que le niveau d'eau arrive au moins 4 cm au-dessus du niveau de l'échantillon et que le bain-marie soit équipé d'une pompe faisant circuler l'eau pour maximiser l'échange thermique.

Commencer le temps de chauffage (10 min) lorsque la température de l'échantillon de référence atteint 80 °C. Après le traitement thermique, il convient que les échantillons soient refroidis immédiatement jusqu'à environ 20 °C.

Il convient que le traitement thermique réduise également la flore compétitive dans certaines matrices contenant un niveau élevé de flore annexe (par exemple, le lactosérum liquide, l'ensilage).

9.4 Ensemencement et incubation

9.4.1 Prendre deux boîtes de Petri stériles d'environ 90 mm de diamètre (6.9). Au moyen d'une pipette stérile (6.7), transférer dans chaque boîte 1 ml d'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère (dilution à 10^{-1}) dans le cas d'autres produits. Si des boîtes sont préparées à partir de plus d'une dilution, le nombre de boîtes par dilution peut être réduit à un (voir l'ISO 7218).

Lorsque, pour certains produits, il est nécessaire de procéder à l'estimation de petits nombres de bactéries *Clostridium* spp. sulfite-réductrices, la limite de dénombrement peut être diminuée d'un facteur de 10 en examinant 10 ml de la suspension mère dans trois grandes (140 mm) boîtes de Petri (6.9).

9.4.2 Prendre une autre boîte de Petri stérile (6.9). Utiliser une autre pipette stérile (6.7) pour déposer 1 ml de la dilution à 10^{-1} (produits liquides) ou 1 ml de la dilution à 10^{-2} (autres produits).

9.4.3 Si nécessaire, répéter le mode opératoire avec d'autres dilutions, en utilisant une nouvelle pipette stérile (6.7) pour chaque dilution décimale.

9.4.4 Le cas échéant et si possible, sélectionner uniquement les étapes de dilutions critiques (au moins deux dilutions décimales successives) afin d'ensemencer des boîtes de Petri (6.9) sur lesquelles pourront être dénombrées entre 10 et 150 colonies par boîte (de 90 mm de diamètre) ou entre 10 et 360 colonies par boîte (de 140 mm de diamètre).

9.4.5 Couler environ 12 ml à 15 ml pour les boîtes de Petri de 90 mm ou 45 ml à 50 ml pour les boîtes de Petri de 140 mm du milieu de culture gélose sulfite-fer (ISA) (Article B.2), fondu et tempéré entre 44 °C et 47 °C (6.10), dans chaque boîte de Petri (6.9).

9.4.6 Mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu de culture en faisant tourner les boîtes de Petri (6.9) et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface horizontale fraîche.

9.4.7 Après solidification complète, couler une surcouche d'environ 5 ml de milieu gélosé ISA (Article B.2) pour les boîtes de Petri de 90 mm (6.9) ou 10 ml pour les boîtes de Petri de 140 mm (6.9) afin de prévenir le développement des colonies à la surface du milieu. Laisser solidifier comme spécifié en 9.4.6.

9.4.8 Retourner les boîtes obtenues en 9.4.7 et incuber les boîtes à 37 °C (6.3) en anaérobiose (6.1).

9.5 Dénombrement des colonies caractéristiques

9.5.1 Après 48 h \pm 2 h d'incubation, examiner les boîtes (voir 9.4.8) afin de rechercher la présence de bactéries *Clostridium* spp. sulfite-réductrices présumées.

Les colonies caractéristiques, présentant une coloration noire ou grise à jaune-brun sur le milieu gélosé ISA, sont dénombrées.

Les boîtes doivent être dénombrées dans les 30 min qui suivent la fin de l'incubation en anaérobiose, car la couleur des colonies peut s'estomper rapidement et finir par disparaître du fait de l'exposition à l'oxygène. Si des jarres anaérobies sont utilisées, il convient de contrôler les boîtes jarre par jarre ou par petites fractions si l'incubation a été réalisée dans une étuve anaérobie (6.1, 6.3).

NOTE Un noircissement diffus et non spécifique du milieu peut se produire. La croissance de bactéries anaérobies, qui ne produisent que de l'hydrogène (et non du H₂S), peut également réduire le sulfite présent et provoquer un noircissement général du milieu, ce qui rend le dénombrement des colonies caractéristiques difficile.