
Norme internationale



3811

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

Viandes et produits à base de viande — Recherche et dénombrement des bactéries présumées coliformes et présumées *Escherichia coli* (Méthode de référence)

Meat and meat products — Detection and enumeration of presumptive coliform bacteria and presumptive Escherichia coli (Reference method)

Première édition — 1979-11-15

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 3811:1979

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/345bcace-463d-447c-b19f-9a681b231b24/iso-3811-1979>

CDU 637. 5 : 576.851.48

Réf. n° : ISO 3811-1979 (F)

Descripteurs : produit alimentaire, produit à base de viande, analyse microbiologique, comptage, bactérie, bactérie coliforme.

Prix basé sur 5 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 correspondant. 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.

La Norme internationale ISO 3811 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, Produits agricoles alimentaires, et a été soumise aux comités membres en mai 1975.

Les comités membres des pays suivants l'ont approuvée :

<u>ISO 3811:1979</u>		
Afrique du Sud, Rép. d'	Éthiopie	Pays-Bas
Allemagne, R. F.	France	Pologne
Autriche	Ghana	Roumanie
Brésil	Hongrie	Tchécoslovaquie
Canada	Inde	Thaïlande
Chili	Iran	Turquie
Danemark	Irlande	Yougoslavie
Espagne	Mexique	

Les comités membres des pays suivants l'ont désapprouvée pour des raisons techniques :

Australie
Nouvelle-Zélande
Royaume-Uni

Viandes et produits à base de viande — Recherche et dénombrement des bactéries présumées coliformes et présumées *Escherichia coli* (Méthode de référence)

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de référence pour la recherche et le dénombrement des bactéries présumées coliformes et présumées *Escherichia coli* (*E. coli*) dans les viandes et les produits à base de viande.

2 Références

ISO 3100, *Viandes et produits à base de viande — Échantillonnage*.

ISO 3565, *Viandes et produits à base de viande — Recherche des salmonellae (Méthode de référence)*.

3 Définitions

3.1 bactéries présumées coliformes : Micro-organismes qui, à 30 °C, provoquent la fermentation du lactose avec production de gaz, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée.

3.2 bactéries présumées *Escherichia coli* : Bactéries présumées coliformes qui, à 44 °C, provoquent la fermentation du lactose avec production de gaz et qui, à 44 °C, produisent de l'indole à partir du tryptophane, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée.

3.3 dénombrement des bactéries présumées coliformes et présumées *Escherichia coli* : Nombre de bactéries présumées coliformes et présumées *E. coli* trouvé par gramme de viande ou de produit à base de viande, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée.

4 Principe

Hachage d'un échantillon pour essai, puis macération d'une prise d'essai avec un diluant stérile dans un homogénéisateur mécanique. À partir de la macération, préparation de dilutions décimales qui sont ensemencées en triple dans un milieu sélectif liquide. D'après le nombre de tubes présentant une production de gaz après incubation à 30 °C, détermination du nombre le plus probable (NPP) de bactéries présumées coliformes par gramme au moyen de la table NPP (voir l'annexe).

Pour le dénombrement des bactéries présumées *E. coli*, ensemencement, puis incubation à 44 °C, de tubes contenant le milieu sélectif liquide et de tubes contenant de l'eau tryptonée,

à partir des tubes positifs pour le dénombrement des bactéries présumées coliformes, c'est-à-dire ceux qui ont présenté un dégagement gazeux. Détermination du nombre le plus probable de bactéries présumées *E. coli* au moyen de la table NPP (voir l'annexe), d'après le nombre de tubes incubés pour lesquels il y a production de gaz dans le milieu sélectif, et production d'indole dans l'eau tryptonée.

5 Milieux de culture, diluant et réactif

5.1 Composants de base

Pour améliorer la fidélité des résultats, il est recommandé d'utiliser des composants de base déshydratés de qualité constante et des produits chimiques de pureté analytique, ou des milieux complets déshydratés. L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou de l'eau de pureté au moins équivalente.

5.2 Milieux de culture

5.2.1 Bouillon lactosé bilié au vert brillant (milieu sélectif)

Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
peptone	20,0 g	10,0 g
lactose	20,0 g	10,0 g
bile de bœuf déshydratée	40,0 g	20,0 g
vert brillant répon- dant aux spécifica- tions de l'annexe de l'ISO 3565	0,026 6 g	0,013 3 g
eau	1 000 ml	1 000 ml

NOTE — Étant donné que le milieu complet ne donne pas toujours les résultats attendus, il est nécessaire de contrôler ses propriétés avant utilisation. (À cet effet, une méthode fera l'objet d'une Norme internationale ultérieure.)

Préparation

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté, en portant à l'ébullition.

Ajuster le pH au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,2 \pm 0,1$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Répartir le milieu, par quantités de 10 ml, dans des tubes de culture (6.2.1) (16 mm \times 160 mm contenant des cloches de Durham dans le cas du milieu simple concentration, ou 20 mm \times 200 mm dans le cas du milieu double concentration) ou dans des flacons avec bouchon à vis, de même capacité.

Stériliser le milieu à $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 15 min.

Les cloches de Durham doivent émerger d'au moins 1 cm au-dessus du niveau du liquide.

S'il y a des bulles, les éliminer si possible en secouant ou en tapant légèrement sur les tubes. Ne pas utiliser les tubes renfermant des bulles de gaz.

5.2.2 Eau tryptonée

Composition

tryptone	10,0 g
chlorure de sodium	5,0 g
eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté, en portant à l'ébullition.

Ajuster le pH au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,3 \pm 0,2$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Répartir le milieu, par quantités de 5 à 10 ml, dans des tubes de culture (6.2.1) ou dans des flacons avec bouchons à vis, de même capacité.

Stériliser le milieu à $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 15 min.

5.3 Diluant

Composition

peptone	1,0 g
chlorure de sodium	8,5 g
eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté, en portant à l'ébullition.

Ajuster le pH au moyen d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,1$ à $25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Répartir le diluant, par quantités de 100 à 300 ml, dans des flacons ou des bouteilles munis de bouchons à vis, ayant une capacité voisine du double du volume réparti. Transfé-

rer le reste dans des tubes, ou dans des petits flacons ou des petites bouteilles munis de bouchons à vis, en quantité telle qu'après stérilisation, ils en contiennent 9,0 ml.

Stériliser le diluant à $121 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 15 min.

5.4 Réactif pour la recherche de l'indole (réactif de Kovacs)

Composition

<i>p</i> -diméthylaminobenzaldéhyde	5,0 g
alcool amylique	75,0 ml
acide chlorhydrique (ρ_{20} 1,18 à 1,19 g/ml)	25,0 ml

Préparation

Dissoudre l'aldéhyde dans l'alcool en chauffant doucement au bain d'eau (environ 50 à $55\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Refroidir et ajouter l'acide.

Mettre à l'abri de la lumière et conserver à $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ environ.

Le réactif doit être jaune clair à brun clair.

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

6 Appareillage et verrerie

6.1 Appareillage

6.1.1 Hachoir mécanique à viande, type de laboratoire, stérile, muni d'une plaque perforée dont les trous ont un diamètre ne dépassant pas 4 mm.

6.1.2 Homogénéisateur mécanique, ayant une fréquence de rotation comprise entre 8 000 et 45 000 min^{-1} , avec bols en verre ou en métal, de capacité convenable, résistant aux conditions de stérilisation.

6.1.3 Appareillage pour la stérilisation de la verrerie, des bols de l'homogénéisateur, des milieux de culture, etc.

6.1.4 Incubateur, pour maintenir les tubesensemencés à $30 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.1.5 Bain d'eau, pour maintenir les tubesensemencés à $44 \pm 0,1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2 Verrerie

La verrerie doit résister à des stérilisations répétées.

6.2.1 Fioles et tubes de culture (16 mm \times 160 mm et 20 mm \times 200 mm). Il est également possible d'utiliser des petites bouteilles munies de bouchons à vis, de même capacité.

6.2.2 Pipettes graduées, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, d'une capacité nominale de 1,0 ml et de 10,0 ml, graduées respectivement en 0,1 ml et 1 ml avec une ouverture d'écoulement de 2 à 3 mm de diamètre.

6.3 Stérilisation de la verrerie, etc.

Stériliser la verrerie selon l'une des méthodes suivantes :

- stérilisation en chaleur humide à 121 ± 1 °C durant au moins 20 min;
- stérilisation en chaleur sèche à 170 °C minimum durant au moins 1 h.

7 Échantillonnage

Opérer à partir d'un échantillon représentatif d'au moins 200 g. Voir ISO 3100.

L'échantillon représentatif peut être conservé dans le laboratoire à une température de 0 à 5 °C, mais pas plus de 1 h.

8 Mode opératoire

8.1 Traitement préalable de l'échantillon

Broyer et mélanger deux fois l'échantillon dans le hachoir à viande (6.1.1). Commencer le plus tôt possible l'analyse de l'échantillon ayant subi le traitement préalable; il peut être conservé, si nécessaire, à une température comprise entre 0 et 5 °C, mais pas plus de 1 h.

8.2 Prise d'essai

Peser, à 0,1 g près, environ 10 g de l'échantillon prétraité (8.1) dans un bol d'homogénéisateur stérile (6.1.2).

8.3 Macération et dilution

8.3.1 Ajouter à la prise d'essai une quantité de diluant (5.3) correspondant à neuf fois sa masse. Faire fonctionner l'homogénéisateur (6.1.2), selon sa fréquence de rotation, pendant une durée telle que le nombre total de tours soit de 15 000 à 20 000. Toutefois, même avec l'homogénéisateur le plus lent, ce temps ne devra pas dépasser 2,5 min.

8.3.2 Procéder simultanément aux opérations suivantes (8.3.3 à 8.3.5) sur deux fractions distinctes de la macération (8.3.1).

8.3.3 Immédiatement après macération, prélever une fraction de 1 ml de la macération (8.3.1) avec une pipette stérile de 1 ml et la transférer dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile (5.3), en évitant tout contact entre la pipette et le diluant.

8.3.4 Mélanger soigneusement les liquides par aspiration et refoulement dix fois avec une pipette stérile, et transférer avec cette même pipette 1 ml de cette dilution (10^{-2}) dans un autre tube contenant 9 ml de diluant stérile (5.3), en évitant tout contact entre la pipette et le diluant.

8.3.5 Mélanger soigneusement les liquides avec une nouvelle pipette stérile, et répéter les opérations jusqu'à l'obtention du nombre requis de dilutions (jusqu'à 10^{-6}).

8.4 Bactéries présumées coliformes

8.4.1 Ensemencement

Transférer, avec une nouvelle pipette stérile, six fractions de 1 ml de la macération (8.3.1) (en les divisant en deux groupes de trois) et transférer trois fractions de 1 ml de chacune des cinq dilutions suivantes (8.3.3, 8.3.4 et 8.3.5) des deux séries de dilutions, dans des tubes contenant 10 ml du milieu sélectif simple concentration [5.2.1 b)]. Commencer par la dilution la plus élevée en remontant jusqu'à la plus petite (la macération), en remplissant et en vidant la pipette trois fois avant de transférer les prélèvements de 1 ml dans les tubes contenant le milieu liquide. Lorsqu'on suppose le nombre de bactéries coliformes peu élevé, transférer également six fractions de 10 ml (en les divisant en deux groupes de trois), dans des tubes contenant 10 ml du milieu sélectif double concentration [5.2.1 a)], en utilisant une pipette stérile de 10 ml.

8.4.2 Incubation

Maintenir les tubes, préparés selon 8.4.1, dans l'incubateur (6.1.4) à 30 ± 1 °C, durant 48 ± 2 h.

8.4.3 Interprétation

Après incubation, examiner les tubes et compter comme positifs les tubes dans lesquels on observe une culture et une production de gaz d'au moins 1/10 du volume de la cloche de Durham.

8.5 Bactéries présumées *Escherichia coli*

8.5.1 Ensemencement

En utilisant une pipette stérile de 1 ml pour chaque tube, ense-mencer 1 goutte des cultures contenues dans les tubes présumés coliformes positifs (8.4.3), sur 10 ml du milieu sélectif simple concentration [5.2.1 b)] et sur 10 ml d'eau tryptonée (5.2.2), les deux milieux étant préalablement chauffés à 44 °C.

8.5.2 Incubation

Maintenir les tubes, préparés selon 8.5.1, au bain d'eau (6.1.5) à $44 \pm 0,1$ °C, durant 48 h.

8.5.3 Interprétation

8.5.3.1 Production de gaz

Examiner les tubes contenant le milieu sélectif ensemencé après 48 h d'incubation au maximum.

Compter comme positifs les tubes dans lesquels on observe une culture et une production de gaz d'au moins 1/10 du volume de la cloche de Durham.

8.5.3.2 Production d'indole

Après 48 h d'incubation, ajouter 0,5 ml de réactif pour la recherche de l'indole (5.4) dans les tubes contenant l'eau tryptonée ensemencée, bien mélanger et examiner après 1 min.

Une couleur rouge de la phase alcoolique indique la présence d'indole.

Compter comme positifs les tubes dans lesquels il y a eu production d'indole.

9 Expression des résultats

9.1 Bactéries présumées coliformes

9.1.1 Calculer, à partir du nombre de tubes présumés coliformes positifs (8.4.3) dans les différentes dilutions, le nombre le plus probable de ces micro-organismes par gramme de viande ou de produit à base de viande, en opérant comme indiqué de 9.1.2 à 9.1.4.

9.1.2 Pour le calcul du NPP, retenir trois dilutions consécutives en se conformant à l'une des règles suivantes, selon le cas :

a) *Il existe au moins une dilution révélant trois tubes positifs*

Choisir la dilution la plus élevée (c'est-à-dire celle ayant la plus faible concentration en échantillon) révélant trois tubes positifs, ainsi que les deux dilutions plus élevées suivant immédiatement (c'est-à-dire celles dont les concentrations en échantillon sont égales au 1/10 et au 1/100 de celle de la première dilution choisie).

Voir également la règle c).

Si l'a été préparé un nombre insuffisant de dilutions au-delà de la dilution la plus élevée révélant trois tubes positifs, choisir à la place les trois dilutions les plus élevées de la série (c'est-à-dire celles ayant la plus faible concentration en échantillon).

b) *Il n'existe pas de dilutions révélant trois tubes positifs*

La règle a) ne pouvant être appliquée, choisir les trois dilutions les plus élevées de la série (c'est-à-dire celles ayant la plus faible concentration en échantillon).

Voir également la règle c).

c) *Cas particuliers*

Dans tous les cas où plus d'une des trois dilutions retenues par la sélection des règles a) et b) ne révèle pas de tubes positifs, retenir, parmi ces dilutions, la dilution la moins élevée ne contenant pas de tubes positifs (c'est-à-dire celle ayant la plus forte concentration en échantillon) et les deux plus faibles dilutions précédentes (c'est-à-dire celles dont les concentrations en échantillon sont égales à 10 et à 100 fois celle de la première solution choisie), sauf lorsqu'on ne trouve des tubes positifs qu'au niveau de la première dilution préparée à partir de l'échantillon. Dans ce dernier cas, il est nécessaire de retenir les trois premières dilutions pour le calcul du NPP, même si cette série renferme deux dilutions ne révélant aucun tube positif.

9.1.3 Multiplier le coefficient NPP indiqué dans la table (voir l'annexe) par l'inverse du taux de la dilution retenue la moins élevée (c'est-à-dire celle ayant la plus forte concentration en

échantillon) pour obtenir le nombre le plus probable de bactéries présumées coliformes par gramme de viande ou de produit à base de viande.

Dans le cas où la dilution retenue la moins élevée correspond aux tubes préparés à partir du milieu double concentration (ensemencement de 10 ml), diviser préalablement le coefficient NPP par 10.

9.1.4 Calculer la moyenne des résultats obtenus pour chacune des deux séries de dilutions.

9.2 Bactéries présumées *Escherichia coli*

9.2.1 Calculer, à partir du nombre de tubes présumés coliformes positifs ayant donné une production de gaz (8.5.3.1) et une production d'indole (8.5.3.2) dans les différentes dilutions, le nombre le plus probable de ces micro-organismes par gramme de viande ou de produit à base de viande, en opérant comme indiqué de 9.2.2 à 9.2.4.

9.2.2 Voir 9.1.2.

9.2.3 Voir 9.1.3 (en remplaçant «bactéries présumées coliformes» par «bactéries présumées *Escherichia coli*»).

9.2.4 Voir 9.1.4.

9.3 Résultats

Exprimer le résultat par le nombre le plus probable de bactéries présumées coliformes (ou présumées *Escherichia coli*, selon le cas) par gramme de viande ou de produit à base de viande.

Dans le cas où l'on trouve un NPP supérieur à 100 micro-organismes par gramme, exprimer le résultat par un chiffre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance de 10 appropriée (par exemple une moyenne de 15 000 doit être exprimée sous la forme : $1,5 \times 10^4$ par gramme). Dans le cas où l'on trouve un NPP compris entre 0,3 et 100, exprimer le résultat tel quel.

Si le NPP est inférieur à 0,3 micro-organisme par gramme, lorsque le mode opératoire approprié à un faible nombre de coliformes a été utilisé (8.4.1), le résultat doit être exprimé de la façon suivante : «bactéries présumées coliformes (ou présumées *Escherichia coli*, selon le cas) non détectées dans 1 g de viande ou de produit à base de viande».

10 Procès-verbal d'essai

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

Annexe

Table pour la détermination du coefficient NPP lorsque l'essai est effectué sur un échantillon par lot

Nombre de tubes positifs au niveau des trois dilutions successives retenues			Coefficient NPP	Catégorie*	Limites de confiance			
1 ^{re}	2 ^e	3 ^e			95 %		99 %	
0	0	0	<0,3	0				
0	0	1		2	<0,1	1,7	<0,1	2,3
0	1	0	0,3	0				
0	2	0		1	0,1	2,1	<0,1	2,8
1	0	0	0,4	2	0,2	2,7	0,1	3,5
1	0	1	0,7	1	0,2	2,8	<0,1	3,6
1	1	0	0,7	0				
1	1	1		2	0,4	3,5	0,2	4,4
1	2	0	1,1	0				
1	2	1		1	0,2	3,8	<0,1	5,0
1	3	0	0,9	2	0,5	4,8	0,2	6,2
2	0	0	1,4	1	0,5	5,0	0,2	6,4
2	0	1	1,5	2	0,7	6,0	0,4	7,6
2	1	0	2,0	1	0,8	6,2	0,5	7,9
2	1	1	2,1	0				
2	2	0		1	<1	13	<1	18
2	2	1		1	1	18	<1	23
2	3	0	2	0				
3	0	0	4	1	1	21	<1	28
3	0	1		1	2	28	2	36
3	0	2	4	0				
3	1	0	7	1	3	38	1	51
3	1	1		1	5	50	3	66
3	1	2	9	2	8	64	5	82
3	2	0	15	0				
3	2	1	21	1	<10	140	<10	190
3	2	2		1	10	240	<10	320
3	2	3	20	2	30	480	20	640
3	3	0	50	1				
3	3	1	110	1				
3	3	2	>110					
3	3	3						

* **Catégorie 0** : Combinaisons de tubes inacceptables, ayant, dans des conditions normales, le moins de chance d'être obtenues. Les combinaisons non mentionnées dans la table ci-dessus appartiennent également à cette catégorie.

Le fait que l'on obtienne une combinaison hors catégorie est probablement attribuable soit à une erreur, soit à une imperfection dans la technique, ou bien encore à la présence d'une substance bactériostatique dans le produit.

Catégorie 1 : Combinaisons de tubes les plus probables. Chacune d'entre elles devrait être obtenue dans 95 % des cas.

Catégorie 2 : Combinaisons de tubes moins probables que celles de la catégorie 1. Chacune d'entre elles devrait être obtenue dans seulement 4 % des cas.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 3811:1979

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/345bcace-463d-447c-b19f-9a681b231b24/iso-3811-1979>