

# GÉLOSE SULFITE-FER (ISA) ISO 15213-1

DENOMBREMENT DES *CLOSTRIDIUM SPP.*

## 1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose sulfite-fer (ISA) ISO 15213-1 est recommandée pour le dénombrement des bactéries *Clostridium spp.* sulfito-réductrices.

Les bactéries *Clostridium spp.* sulfito-réductrices sont des bactéries anaérobies strictes, Gram-positives, en forme de bâtonnet, produisant des spores dont les espèces les plus connues sont *Clostridium perfringens*, *Clostridium bifermentans* et *Clostridium sporogenes*. 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 recherchées en tant qu'indicateurs microbiens de contamination lors de la fabrication d'aliments (par exemple, la production de viande). Elles peuvent produire des spores thermorésistantes.

La formule-type répond à la composition définie dans la norme NF EN ISO 15213-1.

## 2 PRINCIPES

Les microorganismes *Clostridium spp.* sulfito-réducteurs réduisent le sulfite de sodium en sulfure, provoquant avec le citrate ferrique un précipité noir de sulfure de fer autour des colonies.

## 3 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone .....	15,0 g
- Peptone papaïnique de soja .....	5,0 g
- Extrait autolytique de levure .....	5,0 g
- Métabisulfite de sodium .....	0,5 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....	1,0 g
- Agar agar bactériologique.....	15,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,6 ± 0,2.

## 4 PREPARATION

### Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 42,0 g de milieu déshydraté (BK239) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

✓ **Reconstitution :**  
42,0 g/L

✓ **Stérilisation :**  
15 min à 121 °C

## Utilisation du milieu prêt-à-liquéfier en flacons ou en tubes :

- Faire fondre le milieu (s'il est préparé à l'avance) ou bien le milieu prêt-à-liquéfier (BM235), pendant le minimum de temps nécessaire à la reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

## 5 MODE D'EMPLOI

---

Préparer la suspension mère de l'échantillon et les dilutions décimales selon les règles définies dans les normes ISO 6887 correspondantes.

### Dénombrement des bactéries *Clostridium spp.* sulfite-réductrices (ISO 15213-1)

Chauffer si besoin la série de dilutions décimales à 80 °C au bain-marie pendant 10 min ± 1 min afin de détruire les formes végétatives et d'activer les spores.

- Transférer 1 mL de l'inoculum et de ses dilutions décimales dans les boîtes.
- Couler environ 15 ml de milieu.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface plane.
- Ajouter une seconde couche de gélose et laisser solidifier.
- Incuber les boîtes en anaérobiose pendant (48±2) heures à 37±1 °C

## 6 LECTURE

---

Dénombrer les colonies noires ou grises à jaune-brun.

Effectuer les lectures dès l'ouverture de la jarre, dans les 30 minutes qui suivent, sinon les colonies risquent de pâlir par suite de l'oxydation du sulfure de fer.

Procéder à l'étape de confirmation pour le dénombrement de *Clostridium spp.* Si aucune confirmation n'est effectuée, les résultats peuvent être consignés sous la mention «bactéries anaérobies sulfite-réductrices».

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

## 7 CONTROLE QUALITE

---

**Milieu de base déshydraté** : poudre beige, fluide et homogène.

**Milieu préparé** : gélose ambrée.

Réponse culturale (Sulfite-fer (ISA) de l' ISO 15213-1) après 48±2 heures d'incubation à 37±1 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité)	Caractéristiques colonies
<i>Clostridium perfringens</i>	WDCM 00007	$P_R \geq 50 \%$	Noires
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	-	Colonies blanches, non caractéristiques

## 8 CONSERVATION

---

**Milieu déshydraté** : 2-30 °C.

**Milieus prêts-à-liquéfier** : 2-25 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

**Milieu préparé en flacons (\*)** : 180 jours à 2-25 °C.

(\*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

## 9 PRESENTATION

---

### Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g..... BK239HA

### Milieus prêts-à-liquéfier :

Coffret de 10 flacons de 200 mL ..... BM23508

## 10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

NF EN ISO 11133. Juillet 2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau. Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture.

NF EN ISO 15213-1. Février 2023. 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.

NF EN ISO 6887-1. Juin 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 1 : règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales.

NF EN ISO 6887-2. Juin 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 2 : règles spécifiques pour la préparation des viandes et produits carnés.

NF EN ISO 6887-3. Juin 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 3 : Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche.

NF EN ISO 6887-4. Juin 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 4 : Règles spécifiques pour la préparation de produits variés.

NF EN ISO 6887-5. Mai 2020. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 5 : règles spécifiques pour la préparation du lait et des produits laitiers.

NF EN ISO 6887-6. Mai 2013. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique - Partie 6 : règles spécifiques pour la préparation des échantillons prélevés au stade de production primaire

## 11 AUTRES INFORMATIONS

---

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : FT\_SULFITE-FER GELOSE(ISA) (ISO 15213-1)\_BK239\_BM235\_FR\_V1

Date création : 06-2023

Date de révision : -

Motif de révision : Création de la référence

**Gélose SULFITE-FER (ISA) (ISO 15213-1)**

Détection et dénombrement des *Clostridium spp.* sulfito-réducteurs

**Lecture :**

Croissance obtenue après  $48 \pm 2$  heures d'incubation à  $37 \pm 1$  °C, en anaérobiose.



***Clostridium spp.***

Colonie caractéristique : noire  
ou grise à jaune-brun