

---

Norme internationale



5541/2

---

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

---

**Lait et produits laitiers — Dénombrement des coliformes —  
Partie 2: Technique du nombre le plus probable après  
incubation à 30 °C**

*Milk and milk products — Enumeration of coliforms — Part 2: Most probable number technique at 30 °C*

Première édition — 1986-12-01

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

ISO 5541-2:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/275d8a3f-95ef-4529-b5a8-8a570004d891/iso-5541-2-1986>

## 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 5541/2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

NOTE — La méthode spécifiée dans la présente Norme internationale a été élaborée conjointement avec la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'Association des chimistes analytiques (AOAC) et sera également publiée par ces organisations.

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

# Lait et produits laitiers — Dénombrement des coliformes — Partie 2: Technique du nombre le plus probable après incubation à 30 °C

## 1 Objet et domaine d'application

La présente partie de l'ISO 5541 spécifie une méthode pour le dénombrement des coliformes par la technique du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 30 °C en milieu liquide.

La méthode est applicable

- au lait et aux produits laitiers liquides;
- au lait sec, à la poudre de lactosérum sucré, au babeurre en poudre et au lactose;
- à la caséine acide, à la caséine lactique et à la caséine présure;
- au caséinate et à la poudre de lactosérum acide;
- au fromage et au fromage fondu;
- au beurre;
- aux produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation);
- aux flans, aux desserts et à la crème.

Cette méthode doit être préférée pour des échantillons suspects contenir de petits nombres de coliformes (moins de 100 par gramme ou 10 par millilitre).

NOTE — Pour les échantillons de grands nombres de coliformes (plus de 100 par gramme ou 10 par millilitre), voir l'ISO 5541/1.

## 2 Référence

ISO 707, *Lait et produits laitiers — Méthode d'échantillonnage*,

## 3 Définition

Dans le cadre de la présente partie de l'ISO 5541, la définition suivante est applicable.

**coliformes:** Bactéries qui, à 30 °C, provoquent la fermentation du lactose avec production de gaz et qui forment des colonies caractéristiques dans les conditions opératoires décrites.

## 4 Principe

**4.1** Ensemencement en triple d'une prise d'essai et/ou des séries de dilutions décimales de l'échantillon dans des tubes de milieu sélectif liquide, contenant des cloches de Durham.

**4.2** Incubation des tubes à 30 °C pendant 48 h.

**4.3** À partir des tubes présumés positifs (c'est-à-dire pour lesquels on observe une production de gaz dans la cloche de Durham dans le bouillon lactosé bilié au vert brillant), repiquage sur gélose à l'éosine et au bleu de méthylène.

**4.4** Incubation à 30 °C pendant 24 h.

**4.5** À partir du nombre de tubes confirmés positifs (c'est-à-dire pour lesquels on observe une production de gaz dans la cloche de Durham dans le bouillon lactosé bilié au vert brillant et des colonies caractéristiques sur gélose à l'éosine et au bleu de méthylène), calcul du nombre le plus probable de coliformes par millilitre ou par gramme d'échantillon au moyen d'une table.

## 5 Diluants et milieux de culture

### 5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser pour la préparation des diluants et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. Les instructions du fabricant doivent être suivies rigoureusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée avec un appareil en verre, ou de l'eau déminéralisée. Elle doit être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai. Cela doit être contrôlé périodiquement, en particulier dans le cas de l'eau déminéralisée.

Des solutions d'hydroxyde de sodium et d'acide chlorhydrique (environ 0,1 mol/litre) doivent être utilisées pour ajuster le pH des diluants et des milieux.

## 5.2 Diluants d'emploi général

### 5.2.1 Solution peptone-sel

NOTE — La solution peptone-sel a été retenue par l'ISO comme diluant d'emploi général.

#### Composition

Peptone	1,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	8,5 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,1$  à 25 °C.

### 5.2.2 Solution de Ringer diluée au quart

#### Composition

Chlorure de sodium (NaCl)	2,25 g
Chlorure de potassium (KCl)	0,105 g
Chlorure de calcium, anhydre (CaCl <sub>2</sub> )	0,06 g
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	0,05 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre les sels dans l'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $6,9 \pm 0,1$  à 25 °C.

### 5.2.3 Solution de peptone

#### Composition

Peptone	1,0 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre la peptone dans l'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,1$  à 25 °C.

### 5.2.4 Solution tampon de phosphate

#### Composition

Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	42,5 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre le sel dans 500 ml d'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,2 \pm 0,1$  à 25 °C. Diluer à 1 000 ml. Conserver cette solution mère entre 0 et +5 °C.

Ajouter 1,0 ml de cette solution à 1 000 ml d'eau.

## 5.3 Diluants d'emploi particulier

### 5.3.1 Solution de citrate de sodium (pour le fromage, le fromage fondu et la poudre de lait hatmaker).

#### Composition

Citrate trisodique dihydraté (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	20,0 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant à 45—50 °C. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,5 \pm 0,1$  à 25 °C.

### 5.3.2 Solution de monohydrogénophosphate de potassium (pour le fromage, le fromage fondu, la caséine, la caséine acide, la poudre de caséine lactique, la caséine présure, les caséinates, la poudre de sérum acide et la poudre de lait hatmaker).

#### Composition

Monohydrogénophosphate de potassium (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	20 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant à 45—50 °C. Ajuster le pH. Pour la dilution primaire de la caséine acide et de la caséine lactique, le pH, après stérilisation, doit être de  $8,4 \pm 0,1$  à 25 °C. Pour les caséinates, le fromage, le fromage fondu, la poudre acide de sérum et la poudre de lait hatmaker, il doit être de  $7,5 \pm 0,1$  à 25 °C.

## 5.4 Répartition, stérilisation et conservation du diluant

Répartir le diluant (5.2 ou 5.3) pour la dilution primaire dans des fioles (6.4). Répartir le diluant pour les dilutions décimales suivantes (5.2) dans des tubes à essais ou dans des fioles (6.6). Les quantités ainsi réparties doivent être telles qu'après stérilisation, chaque fiole ou tube à essais (6.4) contienne 90 ml de diluant ou un multiple de 90 ml (ou tout autre quantité requise) et que chaque fiole ou tube à essais (6.6) contienne 9,0 ml de diluant ou un multiple de 9,0 ml (ou tout autre quantité requise). Boucher les tubes à essais et les fioles.

Stériliser à l'autoclave à  $121 \pm 1$  °C durant 15 min (un temps plus long peut être nécessaire pour les volumes plus grands).

Si le diluant n'est pas utilisé extemporanément, le conserver à l'obscurité entre 0 et 5 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de son volume ou de sa composition.

## 5.5 Milieux de culture

### 5.5.1 Bouillon lactosé bilié au vert brillant, milieu liquide sélectif.

#### Composition

Peptone	10 g
Lactose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O)	10 g
Bile de bœuf déshydratée	20 g
Vert brillant	0,013 3 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de  $7,2 \pm 0,1$  à 25 °C.

Répartir le milieu, par quantités de 10 ml dans des tubes à essais (6.7) contenant des cloches de Durham (6.8).

Stériliser l'autoclave à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 min.

Les cloches de Durham ne doivent pas contenir des bulles d'air après stérilisation.

### 5.5.2 Bouillon double concentration

Opérer selon 5.5.1, mais en n'utilisant que la moitié de la quantité d'eau et répartir dans des tubes à essais de 20 × 200 mm sans cloches de Durham.

### 5.5.3 Gélose à l'éosine et au bleu de méthylène, milieu de confirmation

#### Composition

Peptone	10 g
Lactose (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ·H <sub>2</sub> O)	10 g
Monohydrogénophosphate de potassium (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2 g
Eosine Y	0,4 g
Bleu de méthylène	0,065 g
Agar-agar	12 à 18 g <sup>1)</sup>
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Mettre en suspension les composants dans l'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation il soit de  $6,8 \pm 0,2$  à 25 °C. Porter à ébullition pour une dissolution complète. Répartir le milieu par quantités de 100 à 150 ml dans des fioles (6.5). Stériliser à l'autoclave à  $121 \pm 1$  °C pendant 15 min. Refroidir à 60 °C et agiter le milieu pour oxyder le bleu de méthylène (c'est-à-dire lui redonner sa couleur bleue) et former le précipité qui constitue une partie importante du milieu.

Préparer des boîtes contenant 10 à 15 ml du milieu pour leur utilisation en 8.6.

## 6 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont convenables. La verrerie réutilisable doit être capable de résister à des stérilisations répétées et être chimiquement inerte.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment :

### 6.1 Appareils 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 en contact avec le diluant, l'échantillon pour essai, les dilutions, sauf s'il est livré stérile (sacs en plastique, pipettes en plastique, etc.) doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes :

- soit au four, en le maintenant à une température de 170 à 175 °C pendant au moins 1 h;
- soit à l'autoclave, en le maintenant à une température de  $121 \pm 1$  °C pendant au moins 20 min.

### 6.2 Appareillage pour l'homogénéisation

Un des appareils suivants doit être utilisé :

- un homogénéisateur rotatif, dont la fréquence de rotation est comprise entre 8 000 et 45 000 min<sup>-1</sup>, avec des bols en verre ou en métal, munis de préférence de couvercles, résistant aux conditions de stérilisation;
- un homogénéisateur de type péristaltique (stomacher), avec des sacs stériles en plastique;
- un mortier avec pilon.

NOTE — Les bols, les sacs en plastique ou le mortier doivent avoir une capacité suffisante pour permettre de mélanger correctement l'échantillon avec la quantité appropriée de diluant. En général, le volume du récipient doit être environ le double du volume de l'échantillon pour essai additionné du diluant.

1) Selon les prescriptions du fabricant.

**6.3 Agitateur**, capable de mélanger 1 ou 2 ml de l'échantillon pour essai (cas des produits liquides) ou des dilutions décimales, dans un tube de dimensions suffisantes, avec 9 ou 18 ml de diluant, afin d'obtenir une suspension homogène, et dont le principe de fonctionnement est basé sur un mouvement de rotation excentré du contenu des tubes à essais (agitateur Vortex).

**6.4 Fioles**, de capacité suffisante pour contenir les 90 ml de diluant utilisés pour la suspension-mère, ou des multiples de 90 ml, en laissant un espace suffisant pour l'agitation.

**6.5 Fioles**, de 150 à 250 ml de capacité, pour contenir la gélose à l'éosine et au bleu de méthylène (5.5.3).

**6.6 Tubes à essais ou fioles**, de capacité suffisante pour contenir 10 ml (ou un multiple de 10 ml, si nécessaire), de l'échantillon pour essai (s'il est liquide) ou de la dilution primaire (autres cas) ou des dilutions décimales suivantes et laisser un espace libre adéquat pour permettre une agitation convenable.

**6.7 Tubes à essais**, de 20 ml de capacité, pour contenir le bouillon lactosé bilié au vert brillant (5.5.1).

**6.8 Cloches de Durham**, de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans les tubes à essais (6.7).

**6.9 Pipettes** (bouchées avec du coton) de 1 ml de capacité nominale et ayant un orifice d'écoulement de 2 à 3 mm de diamètre.

NOTE — N'utiliser que des pipettes non ébréchées et, quand cela est nécessaire, avec des graduations bien marquées pour les distinguer nettement du contenu.

**6.10 Pipettes graduées** (bouchées avec du coton), de grande capacité, par exemple 10 ou 20 ml.

NOTE — N'utiliser que des pipettes non ébréchées et, quand cela est nécessaire, avec des graduations bien marquées pour les distinguer nettement du contenu.

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

**6.12 Billes de verre**, d'environ 6 mm de diamètre.

**6.13 pH-mètre**, précis à  $\pm 0,1$  unité de pH à 25 °C.

**6.14 Balance**, de portée suffisante et précise à 1 % de la masse nette pesée.

**6.15 Bain d'eau**, réglable à une température de  $45 \pm 1$  °C.

**6.16 Bain d'eau**, réglable à une température de  $37 \pm 1$  °C.

**6.17 Étuve**, capable de maintenir en tous points une température de  $30 \pm 1$  °C.

**6.18 Anses bouclées**, en platine iridié ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre.

## 7 Échantillonnage

Voir ISO 707.

## 8 Mode opératoire

### NOTES

1 Les opérations décrites en 8.1 à 8.5 ne doivent pas être effectuées à la lumière directe du soleil.

2 Des précautions normales d'aseptie doivent être prises toutes les fois que c'est nécessaire.

### 8.1 Préparation de l'échantillon pour essai et de la dilution primaire

Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant pendant les opérations décrites ci-après doit être du même ordre que celle de l'échantillon pour essai, sauf prescriptions contraires.

#### 8.1.1 Lait et produits laitiers liquides

Agiter vigoureusement l'échantillon pour essai, afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes, en inversant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser. L'intervalle entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 min.

Prélever 1 ml de l'échantillon pour essai à la pipette et l'ajouter à 9 ml de diluant (5.2) (ou 10 ml d'échantillon pour essai à 90 ml de diluant ou 11 ml à 99 ml). Agiter cette dilution primaire (par exemple 25 fois avec un mouvement d'environ 300 mm pendant environ 10 s). Une dilution  $10^{-1}$  est ainsi obtenue.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

#### 8.1.2 Lait sec, poudre de lactosérum sucré, babeurre en poudre et lactose

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en le secouant de façon répétée par inversion. Si l'échantillon pour essai enfermé dans son emballage d'origine est trop plein pour permettre un mélange vigoureux, le mettre dans un récipient plus grand. Mélanger. Ouvrir le récipient, prélever la prise d'essai demandée à l'aide d'une spatule en procédant comme indiqué ci-dessous. Refermer immédiatement le récipient.

Chauffer au bain d'eau (6.15) une fiole contenant 90 ml de diluant approprié à  $45 \pm 1$  °C.

Peser 10 g de l'échantillon pour essai dans un récipient de verre approprié (par exemple un bécher) et verser lentement la poudre dans la fiole de dilution contenant le diluant adéquat (5.2 ou, si nécessaire, pour la poudre de lait hatmaker, 5.3.1 ou 5.3.2 à un pH de  $7,5 \pm 0,1$ ). Sinon, peser 10 g de l'échantillon pour essai directement dans la fiole avec le diluant.

Afin de dissoudre, tourner lentement pour hydrater la poudre, puis agiter 25 fois la fiole pendant environ 10 s avec un mouvement d'environ 300 mm. On peut utiliser un homogénéisateur de type péristaltique [6.2.b)] comme autre moyen d'agitation.

Replacer la fiole dans le bain d'eau pendant 5 min, agiter occasionnellement. Une dilution  $10^{-1}$  est ainsi obtenue.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

NOTE — Dans le but d'avoir une meilleure reconstitution, en particulier pour la poudre de lait hatmaker, il peut être utile de se servir de billes de verre (6.12). Dans ce cas, il conviendra de les mettre dans les fioles (6.4) avant stérilisation.

### 8.1.3 Fromage et fromage fondu

Peser 10 g de fromage ou de fromage fondu dans une capsule. Les placer dans le récipient de l'homogénéisateur rotatif [6.2.a)] ou de l'homogénéisateur de type péristaltique [6.2.b)] ou dans le mortier [6.2.c)].

Lorsqu'on utilise un homogénéisateur rotatif ou un homogénéisateur de type péristaltique, ajouter 90 ml de diluant (5.2, 5.3.1, ou 5.3.2 à pH  $7,5 \pm 0,1$ ). Mélanger jusqu'à ce que le fromage soit complètement dispersé (1 à 3 min). L'idéal serait de s'assurer que la température de dispersion ne dépasse pas  $40^\circ\text{C}$  et en aucun cas elle ne doit être supérieure à  $45^\circ\text{C}$ . Laisser la mousse se disperser.

Si un mortier est utilisé, ajouter un minimum de diluant et mélanger avec le pilon pour obtenir une pâte homogène sans grumeaux. Ajouter le restant de diluant de façon à obtenir un total de 90 ml de diluant. Une dilution  $10^{-1}$  est ainsi obtenue.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.4 Caséine acide, caséine lactique et caséine précurseur

Peser 10 g de produit dans une capsule. Les placer dans une fiole de dilution contenant des billes de verre (6.12) et 90 ml de diluant de monohydrogénophosphate de potassium (5.3.2) à pH 8,4 pour les caséines acides et lactiques.

Laisser pendant 15 min à température ambiante, puis élever la température à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  au bain d'eau (6.16). Maintenir les fioles à  $37^\circ\text{C}$  pendant encore 15 min et secouer vigoureusement par intervalles. Une dilution  $10^{-1}$  est ainsi obtenue.

NOTE — Éviter l'emploi d'un homogénéisateur rotatif [6.2.a)] ou d'un homogénéisateur de type péristaltique [6.2.b)] à cause de la formation de mousse.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.5 Caséinate et poudre de sérum acide

Peser 10 g de produit dans une capsule. Les répartir très lentement à la surface de 90 ml de diluant de monohydrogénophosphate de potassium (5.3.2) à pH  $7,5 \pm 0,1$  dans une fiole de dilution en agitant le mélange après chaque ajout.

On peut également ajouter le produit sec à un volume minimum de diluant et le mélanger avec une baguette de verre pour obtenir une pâte uniformément hydratée sans grumeaux. Ajouter le restant de diluant de façon à obtenir un total de 90 ml de diluant.

Laisser pendant 15 min, puis élever la température à  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  au bain d'eau (6.16). Maintenir la fiole de dilution à  $37^\circ\text{C}$  pendant encore 15 min. Mélanger soigneusement avec l'homogénéisateur rotatif [6.2.a)] ou l'homogénéisateur de type péristaltique [6.2.b)]. Laisser la mousse se disperser avant de poursuivre. Une dilution  $10^{-1}$  est ainsi obtenue.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.6 Beurre

Mettre le récipient contenant l'échantillon pour essai dans le bain d'eau à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  (6.15). Agiter pour faciliter sa fonte et l'y maintenir jusqu'à ce que tout l'échantillon pour essai soit juste fondu. Agiter et, avec une pipette réchauffée à environ  $45^\circ\text{C}$ , introduire 10 ml dans une fiole contenant 90 ml de diluant (5.2). Agiter chaque fois avant de réaliser les prélèvements suivants. On peut également utiliser un homogénéisateur de type péristaltique [6.2.b)] pour mélanger. Une dilution  $10^{-1}$  est ainsi obtenue.

On peut également travailler uniquement sur la phase aqueuse pour la dilution, de la façon suivante.

Prendre une prise d'essai de 50 g (contenant environ 8 ml d'eau) et ajouter 42 ml de diluant (5.2.3) réchauffé à  $45^\circ\text{C}$ . Placer le récipient dans un bain d'eau à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  (6.15) jusqu'à ce que le beurre soit fondu. Bien mélanger et laisser séparer pendant 15 min, au maximum. Pipetter la couche inférieure; 1 ml est équivalent à 1 g de beurre.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.7 Produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation)

Procéder comme indiqué pour le beurre (8.1.6) (première alternative), mais en utilisant un bain d'eau à  $37^\circ\text{C}$  (6.16) au maximum. La température de l'échantillon pour essai ne doit pas dépasser  $37^\circ\text{C}$ . Une dilution  $10^{-1}$  est ainsi obtenue.

### 8.1.8 Flans, desserts, lait fermenté et crème

Peser 10 g de produit dans une fiole (6.4) contenant des billes de verre (6.12).

Pour le flan, les desserts et la crème douce ajouter 90 ml de diluant (5.2) et agiter pour disperser. Pour le lait fermenté et la crème acide utiliser les diluants 5.2 ou 5.3.2 à pH  $7,5 \pm 0,1$ . On peut utiliser un homogénéisateur de type péristaltique [6.2.b)]. Une dilution  $10^{-1}$  est ainsi obtenue.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

## 8.2 Dilutions décimales suivantes

À l'aide d'une nouvelle pipette et en évitant tout contact entre la pipette et le diluant, introduire 1 ml de la dilution primaire dans un autre tube contenant 9 ml de diluant stérile. une nouvelle pipette doit être utilisée pour chaque dilution.

En alternative, introduire 10 ml de la dilution primaire dans une fiole contenant 90 ml de diluant stérile ou 11 ml de la dilution primaire à 99 ml de diluant stérile. Dans la pratique courante, quand on exige une dilution  $10^{-3}$ , ajouter 1 ml de la dilution primaire à 99 ml de diluant stérile.

Mélanger soigneusement, soit par aspiration-refoulement, 10 fois, avec une nouvelle pipette, soit en utilisant un agitateur mécanique (6.3) pendant 5 à 10 s pour obtenir la dilution  $10^{-2}$ . La vitesse de rotation de ce dernier doit être choisie de sorte que le liquide tournoyant affleure à 20 ou 30 mm du bord du récipient.

Si nécessaire, répéter ces opérations sur la dilution  $10^{-2}$  et les dilutions décimales suivantes afin d'obtenir des dilutions  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , etc.

Lorsque 10 ml plus 90 ml, 11 ml plus 99 ml ou 1 ml plus 99 ml ont été prélevés, agiter manuellement (par exemple 25 fois avec un mouvement d'environ 300 mm pendant environ 10 s).

Réaliser un nombre suffisant de dilutions afin de s'assurer que pour les tubes de la dernière dilution, le résultat est négatif.

### 8.3 Durée des opérations

Le temps qui s'écoule entre le prélèvement de la prise d'essai ou la fin de la préparation de la dilution primaire et le mélange des dilutions et des milieux ne doit pas être supérieur à 15 min, sauf prescriptions contraires.

### 8.4 Ensemencement

**8.4.1** Prendre trois tubes de bouillon double concentration (5.5.2) et transférer dans chacun de ces tubes, avec une pipette, 10 ml de l'échantillon pour essai liquide ou 10 ml de la dilution primaire.

**8.4.2** Prendre trois tubes de bouillon simple concentration (5.5.1) et transférer dans chacun de ces tubes, avec une pipette, 1 ml de l'échantillon pour essai liquide, ou 1 ml de la solution primaire.

**8.4.3** Pour chacune des dilutions suivantes (à partir de  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$ , selon le cas), prendre trois tubes de bouillon simple concentration (5.5.1). Transférer 1 ml de la dilution respective dans chacun de ces tubes.

Changer de pipette pour chaque dilution. Mélanger avec soin l'inoculum et le milieu.

### 8.5 Incubation

**8.5.1** Incuber les tubes de bouillon double concentration (8.4.1) à  $30 \pm 1$  °C pendant  $24 \pm 2$  h.

**8.5.2** Incuber les tubes de bouillon simple concentration (8.4.2 et 8.4.3) à  $30 \pm 1$  °C pendant  $48 \pm 2$  h.

### 8.6 Repiquage

À partir de chaque tube incubé, de bouillon double concentration (8.4.1), ensemercer, à l'aide d'une anse bouclée (6.18), un tube de bouillon simple concentration (5.5.1). Incuber à  $30 \pm 1$  °C pendant  $48 \pm 2$  h.

### 8.7 Essais de confirmation

**8.7.1** À partir de chaque tube incubé (8.5.2 et 8.6) pour lesquels une production de gaz dans les cloches de Durham est observée, ensemercer par stries une gélose à l'éosine et au bleu de méthylène (5.5.3). Incuber à  $30 \pm 1$  °C pendant  $24 \pm 2$  h.

**8.7.2** Considérer comme caractéristiques les colonies d'aspect métallique rouge/rose et muqueuses en apparence. Si l'on a besoin d'une preuve supplémentaire, ensemercer les colonies dans des tubes contenant du bouillon simple concentration (5.5.1) et surveiller la production de gaz après incubation (8.5.2).

**8.7.3** Noter les tubes confirmés positifs pour chaque dilution.

## 9 Expression des résultats

### 9.1 Choix des dilutions

Pour chaque échantillon examiné, 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 confirmés positifs*

Choisir la dilution la plus élevée (c'est-à-dire celle ayant la plus faible concentration en échantillon) révélant trois tubes confirmés positifs ainsi que les deux dilutions plus élevées suivant immédiatement (c'est-à-dire celles dont les concentrations en échantillons sont égales à  $10^{-1}$  et à  $10^{-2}$  de celle de la première dilution choisie).

Voir également la règle c).

S'il a été préparé un nombre insuffisant de dilutions au-delà de la dilution la plus élevée révélant trois tubes positifs confirmés, 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 confirmés positifs*

Si la règle a) ne peut 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 particulier*

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 confirmés positifs, retenir parmi ces dilutions, la dilution la moins élevée ne contenant pas de tubes confirmés 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 100 fois celle de la première dilution choisie), sauf lorsqu'on ne trouve des tubes confirmés 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 confirmé positif.

Voir les exemples de la table 1.

## 9.2 Détermination du coefficient NPP

Déterminer le coefficient NPP de coliformes, à partir du nombre de tubes confirmés positifs pour chaque dilution retenue, selon la table 2.

## 9.3 Calcul du nombre le plus probable (NPP)

Calculer le nombre de coliformes par millilitre ou par gramme en multipliant le coefficient NPP (voir 9.2) par l'inverse du taux de la dilution retenue la moins élevée (c'est-à-dire celle ayant la plus forte concentration en échantillon).

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.

Le résultat peut être exprimé par un chiffre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^x$ ,  $x$  étant la puissance appropriée par 10.

## 9.4 Fidélité

Il est bien connu que des variations importantes peuvent être observées avec la technique du NPP. De ce fait, les résultats obtenus selon cette méthode doivent être utilisés avec prudence.

Les limites de confiance sont données dans la table 2.

## 10 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée, le résultat obtenu et la manière dont il est exprimé. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente partie de l'ISO 5541 ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

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

Table 1 — Exemples de choix des dilutions

Exemple	Nombre de tubes confirmés positifs à chaque concentration de l'échantillon <sup>1)</sup>				NPP
	10 g ou 10 ml	1 g ou 1 ml	0,1 g ou 0,1 ml	0,01 g ou 0,01 ml	
A	3	1	1	0	7 par 10 g ou 10 ml
B	2	1	0	0	1,5 par 10 g ou 10 ml ou 15 par 100 g ou 100 ml
C		3	2	0	9 par 1 g ou 1 ml
D		3	2	2	21 par 1 g ou 1 ml
E		3	0	1	4 par 1 g ou 1 ml

1) Les dilutions retenues sont soulignées.

## Bibliographie

[1] ISO 4831, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Techniques du nombre le plus probable après incubation à 30 °C*. Organisation Internationale de Normalisation, 1978.

[2] ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Préparation des échantillons pour essai et des dilutions en vue de l'examen microbiologique*. Organisation Internationale de Normalisation (en cours de publication).