

TC 34

Norme internationale



7251

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

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés — Technique du nombre le plus probable

Microbiology — General guidance for enumeration of presumptive Escherichia coli — Most probable number technique

Première édition — 1984-11-15

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7251:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ebe2c9bf-75a5-4613-8225-c5d263b30e5c/iso-7251-1984>

CDU 579.572 : 579.842.11

Réf. n° : ISO 7251-1984 (F)

Descripteurs : analyse microbiologique, produit alimentaire, produit d'alimentation animale, comptage des bactéries.

Prix basé sur 9 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 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 7251 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*.

[ISO 7251:1984](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ebe2c9bf-75a5-4613-8225-c5d263b30e5c/iso-7251-1984)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ebe2c9bf-75a5-4613-8225-c5d263b30e5c/iso-7251-1984>

Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés — Technique du nombre le plus probable

0 Introduction

La présente Norme internationale se propose de fournir des directives générales pour l'examen de produits non concernés par les Normes internationales existant actuellement, et pour être prises en considération par les organismes élaborant des méthodes d'essais microbiologiques destinées à être appliquées à des produits alimentaires ou à des aliments pour animaux. En raison de la grande diversité des produits entrant dans ce domaine d'application, il est possible que ces directives, dans tous leurs détails, ne conviennent pas exactement à certains produits et que, pour certains autres produits, il puisse être nécessaire d'employer des méthodes différentes. Néanmoins, il est à espérer que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois qu'il sera possible, les directives données, et qu'on n'aura recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera réexaminée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment-là, à savoir dans quelle mesure les directives auront été suivies et les raisons pour lesquelles il aura été nécessaire d'y déroger dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et, pour certains groupes de produits, des Normes internationales et/ou des normes nationales existent peut-être déjà, qui ne concordent pas avec ces directives. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale, si bien que finalement les seules divergences restantes seront celles nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

1 Objet et domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale, au moyen de la technique de culture en milieu liquide avec calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 35 °C ou 37 °C¹⁾ puis 45 °C.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application de la présente Norme internationale, du fait que cette méthode est sujette à de grandes variations. Il est recommandé d'appliquer cette méthode et d'interpréter les résultats à la lumière des renseignements donnés en 10.4.

2 Référence

ISO 6887, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

3 Définition

Dans le cadre de la présente Norme internationale, la définition suivante est applicable :

***Escherichia coli* présumés** : Bactéries qui, à 45 °C, fermentent le lactose avec production de gaz et qui, à 45 °C, produisent de l'indole à partir du tryptophane, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

4 Principe

4.1 Ensemencement de trois tubes de milieu liquide d'enrichissement double concentration [voir 5.3.1 a)]²⁾ avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

4.2 Ensemencement de trois tubes de milieu liquide d'enrichissement simple concentration [voir 5.3.1 b)]²⁾ avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de suspension mère dans le cas d'autres produits.

Puis dans les mêmes conditions, ensemencement du milieu simple concentration avec les dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.

2) Si nécessaire, un autre milieu liquide d'enrichissement peut être utilisé avant l'ensemencement du milieu sélectif.

4.3 Incubation des tubes de milieu double et simple concentration à 35 °C ou 37 °C¹⁾ durant 24 à 48 h. Examen des tubes pour la formation de gaz.

4.4 Ensemencement, à partir des tubes de milieu double et simple concentration ayant donné lieu à un dégagement gazeux, d'une nouvelle série de tubes contenant un milieu sélectif liquide.

4.5 Incubation à 45 °C durant 24 à 48 h et examen de cette nouvelle série de tubes pour la formation de gaz.

4.6 Ensemencement, à partir des tubes contenant le milieu sélectif ayant donné lieu à un dégagement gazeux, d'une nouvelle série de tubes contenant de l'eau tryptonée.

4.7 Incubation à 45 °C durant 24 à 48 h et examen de cette nouvelle série de tubes pour la production d'indole.

4.8 Détermination du nombre le plus probable d'*Escherichia coli* présumés au moyen de la table NPP, d'après le nombre de tubes incubés pour lesquels il y a eu formation de gaz dans le milieu sélectif, et production d'indole dans l'eau tryptonée.

5 Diluant, milieux de culture et réactif

5.1 Composants de base

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

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

La mesure du pH doit être effectuée au pH-mètre réglé à la température de 25 °C.

Si le diluant, les milieux de culture et le réactif ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécifications contraires, être conservés à l'obscurité à environ 4 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

5.2 Diluant

Voir ISO 6887, chapitre 5.

5.3 Milieux de culture

5.3.1 Bouillon à la tryptose et au lauryl sulfate (milieu d'enrichissement sélectif)

Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
tryptose	40 g	20 g
lactose	10 g	5 g
hydrogéo- orthophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	5,5 g	2,75 g
dihydrogéo- orthophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	5,5 g	2,75 g
chlorure de sodium	10 g	5 g
lauryl sulfate de sodium	0,2 g	0,1 g
eau	1 000 ml	1 000 ml

Préparation

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,8 à 25 °C.

Répartir les milieux, par quantités de 10 ml dans des tubes de 16 mm × 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.5) dans le cas du milieu simple concentration, et dans des tubes de 20 mm × 200 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.5) dans le cas du milieu double concentration.

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C durant 15 ± 1 min.

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

5.3.2 Bouillon EC (deuxième milieu sélectif)

Composition

tryptose ou trypticase	20 g
lactose	5 g
sels biliaires n° 3 ²⁾	1,5 g
hydrogéo-orthophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	4 g
dihydrogéo-orthophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
chlorure de sodium	5 g
eau	1 000 ml

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.

2) Voir *ICMSF Microorganisms in Foods 1*, 2nd edition, 32. p. 280 — University of Toronto Press, Canada.

Préparation

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,8 à 25 °C.

Répartir le milieu, par quantités de 10 ml dans des tubes de 16 mm × 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.5).

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C durant 15 ± 1 min.

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

5.3.3 Eau tryptonée

Composition

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

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en portant à ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,3 à 25 °C.

Répartir le milieu, par quantités de 5 à 10 ml, dans des tubes de 16 mm × 160 mm (6.4).

Stériliser le milieu à 121 ± 1 °C durant 15 ± 1 min.

5.4 Réactif pour la recherche de l'indole

(réactif de Kovacs)

Composition

diméthylamino-4 benzaldéhyde	5,0 g
méthyl-2 butanol ou pentanol	75,0 ml
acide chlorhydrique (ρ_{20} 1,18 à 1,19 g/ml)	25,0 ml

Préparation

Dissoudre le diméthylamino-4 benzaldéhyde dans l'alcool en chauffant doucement au moyen d'un bain d'eau réglable à environ 50 à 55 °C.

Refroidir et ajouter l'acide.

Mettre à l'abri de la lumière et conserver à 4 °C.

Le réactif doit être de couleur jaune clair à brun clair.

6 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont appropriées.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment:

6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, les milieux de culture, l'échantillon et les dilutions, sauf s'il est livré stérile (particulièrement le matériel en plastique), doit être stérilisé par l'une des méthodes suivantes:

- au four, en le maintenant à une température de 170 à 175 °C durant au moins 1 h;
- à l'autoclave, en le maintenant à une température de 121 ± 1 °C durant au moins 20 min.

6.2 Étuve, réglable à 35 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C selon la température retenue.¹⁾

6.3 Bain d'eau, réglable à $45 \pm 0,5$ °C (permettant de maintenir les tubes ensemencés à cette température).

6.4 Tubes à essais, de 16 mm × 160 mm et 20 mm × 200 mm environ, ou **fioles** de capacité appropriée.

6.5 Cloches de Durham, de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans les tubes (6.4).

6.6 Pipettes à écoulement total, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale.

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

7 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage conformément à la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Voir la norme spécifique du produit concerné. S'il n'y a pas de norme spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.

9 Mode opératoire

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir ISO 6887 et la norme spécifique du produit concerné.

Préparer un nombre de dilutions suffisant afin d'être sûr que tous les tubes de la dernière dilution soient négatifs.

9.2 Technique du NPP

9.2.1 Ensemencement du milieu d'enrichissement sélectif

9.2.1.1 Prendre trois tubes du milieu d'enrichissement double concentration [5.3.1 a)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, à l'aide d'une pipette (6.6), 10 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 10 ml de la suspension mère.

9.2.1.2 Prendre ensuite trois tubes du milieu d'enrichissement simple concentration [5.3.1 b)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, à l'aide d'une pipette (6.6), 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère.

9.2.1.3 Pour chacune des dilutions suivantes (à partir de 1/10 ou 1/100, selon l'échantillon pour essai), opérer comme spécifié en 9.2.1.2. Utiliser une nouvelle pipette pour chaque dilution. Bien mélanger l'inoculum et le milieu.

9.2.2 Incubation

Incuber les tubes de milieu double concentration (9.2.1.1) et les tubes de milieu simple concentration (9.2.1.2 et 9.2.1.3) à l'étuve (6.2) à 35 °C ou 37 °C¹⁾, durant 24 ± 2 h. Si, à ce stade, on n'observe pas de formation de gaz ni de l'opacité empêchant l'observation du dégagement gazeux, prolonger l'incubation jusqu'à un total de 48 ± 2 h.

9.2.3 Ensemencement du deuxième milieu sélectif

À partir de chaque tube incubé selon 9.2.2 et présentant un dégagement gazeux, ensemercer avec une anse bouclée 10 ml du milieu sélectif (5.3.2), préalablement chauffé à 45 °C.

9.2.4 Incubation

Incuber les tubes ensemençés en 9.2.3, dans le bain d'eau (6.3) réglé à 45 ± 0,5 °C durant 24 ± 2 h. Si, à ce stade, il n'y a pas de dégagement gazeux, incuber durant 48 h.

9.2.5 Ensemencement de l'eau tryptonée

À partir de chaque tube incubé en 9.2.4 présentant un dégagement gazeux, ensemercer avec une anse bouclée un tube d'eau tryptonée (5.3.3) préalablement chauffé à 45 °C.

9.2.6 Incubation

Incuber les tubes ensemençés en 9.2.5 dans le bain d'eau (6.3) réglé à 45 ± 0,5 °C durant 48 h.

9.2.7 Essai pour la production d'indole

Ajouter 0,5 ml de réactif pour la recherche de l'indole (5.4) dans les tubes contenant la culture en eau tryptonée, bien mélanger et examiner après 1 min.

Une couleur rouge de la phase alcoolique indique la présence d'indole (tubes positifs).

9.2.8 Interprétation

Pour chaque dilution, compter le nombre de tubes positifs (9.2.7).

10 Expression des résultats

10.1 Choix des dilutions²⁾

Pour chaque échantillon examiné, retenir trois dilutions consécutives en se conformant à l'une des règles suivantes selon le cas.

10.1.1 Cas 1 — Au moins une dilution révèle 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 10.3, exemple 1).

Voir également 10.1.3.

S'il 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) (voir 10.3, exemple 2).

10.1.2 Cas 2 — Pas de dilution révélant trois tubes positifs

S'il n'existe pas de dilution révélant trois tubes positifs (et, par conséquent le mode opératoire décrit en 10.1.1 ne peut être employé), choisir les trois dilutions les plus élevées de la série (c'est-à-dire celles ayant la plus faible concentration en échantillon) (voir 10.3, exemple 3).

Voir également 10.1.3.

1) La température devra être fixée par les parties concernées et précisée dans le procès-verbal d'essai.

2) La suspension mère et, éventuellement, l'échantillon pour essai sont considérés comme étant des «dilutions».

10.1.3 Cas particuliers

Dans tous les cas où plus d'une des trois dilutions choisies selon 10.1.1 et 10.1.2 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 dilution choisie) (voir 10.3, exemples 4 et 5), 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.

10.2 Détermination du coefficient NPP

10.2.1 Selon le nombre d'échantillons examinés par lot, vérifier, en utilisant l'annexe A ou B, si les séquences de nombres de tubes positifs, correspondant aux dilutions sélectionnées selon 10.1, sont acceptables du point de vue statistique. Cette acceptabilité dépend à la fois du nombre d'échantillons examinés et de la décision d'accepter ou de refuser les résultats des catégories 2 et 3 (voir annexe C).

Ainsi, par exemple, lorsque seulement les résultats de la catégorie 1 sont acceptés, la séquence 221 ne peut être retenue que si 10 échantillons (du lot considéré) ont été examinés. Par contre, lorsque les résultats moins probables de la catégorie 2 sont acceptés également, la séquence 221 sera retenue aussi dans le cas où seulement 2, 3 ou 5 échantillons ont été examinés. Si la séquence 221 est le résultat d'un essai unique, elle ne sera retenue que si les résultats les moins probables de la catégorie 3 sont acceptés.

10.2.2 Pour chaque séquence jugée acceptable selon 10.2.1, déterminer le coefficient NPP au moyen de l'annexe A ou B.

10.3 Calcul du nombre le plus probable (NPP)

Déterminer le nombre d'*Escherichia coli* présumés par millilitre ou par gramme de produit en multipliant le coefficient NPP (voir 10.2) 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.

Exprimer le résultat par un chiffre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^n , n étant la puissance appropriée de 10.

Si le NPP est inférieur à 0,3 micro-organisme par millilitre ou par gramme et si l'on a utilisé le mode opératoire approprié pour un faible nombre d'*Escherichia coli* présumés (voir 9.2.1), le résultat doit être exprimé de la façon suivante : « absence d'*Escherichia coli*, présumés dans 1 ml ou 1 g de produit ».

Exemple 1 : Échantillon solide

Suspension mère au 1/10 (10 ml) :	3 tubes positifs
Suspension mère au 1/10 (1 ml) :	3 tubes positifs
Dilution au 1/100 (1 ml) :	2 tubes positifs
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	1 tube positif
Dilution au 1/10 000 (1 ml) :	0 tube positif

Retenir 321.

En se référant à l'annexe A ou B, on obtient un coefficient NPP de 15, et le calcul donne un NPP de 15×10 , soit

$1,5 \times 10^2$ *Escherichia coli* présumés par gramme

Exemple 2 : Échantillon solide

Suspension mère au 1/10 (10 ml) :	3 tubes positifs
Suspension mère au 1/10 (1 ml) :	3 tubes positifs
Dilution au 1/100 (1 ml) :	3 tubes positifs
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	0 tube positif

Retenir 330.

En se référant à l'annexe A ou B, on obtient un coefficient NPP de 20, et le calcul donne un NPP de 20×10 , soit

2×10^2 *Escherichia coli* présumés par gramme

Exemple 3 : Échantillon liquide

Échantillon pour essai (dilution 1/1) (10 ml) :	2 tubes positifs
Échantillon pour essai (dilution 1/1) (1 ml) :	2 tubes positifs
Dilution au 1/10 (1 ml) :	1 tube positif
Dilution au 1/100 (1 ml) :	1 tube positif
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	0 tube positif

Retenir 110.

En se référant à l'annexe A ou B, on obtient un coefficient NPP de 0,7, et le calcul donne un NPP de $0,7 \times 10$, soit 7

7×10^0 *Escherichia coli* présumés par millilitre

Exemple 4 : Échantillon solide

Suspension mère au 1/10 (10 ml) :	3 tubes positifs
Suspension mère au 1/10 (1 ml) :	3 tubes positifs
Dilution au 1/100 (1 ml) :	0 tube positif
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	0 tube positif

Retenir 330.

En se référant à l'annexe A ou B, on obtient un coefficient NPP de 20, et le calcul donne un NPP de $\frac{20}{10} \times 10$, soit

$2,0 \times 10^1$ *Escherichia coli* présumés par gramme

Exemple 5 : Échantillon solide

Suspension mère au 1/10 (10 ml) :	2 tubes positifs
Suspension mère au 1/10 (1 ml) :	2 tubes positifs
Dilution au 1/100 (1 ml) :	1 tube positif
Dilution au 1/1 000 (1 ml) :	0 tube positif
Dilution au 1/10 000 (1 ml) :	0 tube positif

Retenir 210.

En se référant à l'annexe A ou B, on obtient un coefficient NPP de 1,5, et le calcul donne un NPP de $1,5 \times 10$ soit

$1,5 \times 10^1$ *Escherichia coli* présumés par gramme

10.4 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 les annexes A et B.

11 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée, la température d'incubation 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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7251:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ebe2c9bf-75a5-4613-8225-c5d263b30e5c/iso-7251-1984>

Annexe A

Détermination du coefficient NPP lorsque l'essai est effectué sur un échantillon par lot¹⁾

Nombre de tubes positifs au niveau des trois dilutions successives retenues			Coefficient NPP	Catégorie ²⁾	Limites de confiance ³⁾			
1 ^{re}	2 ^e	3 ^e			95 %		99 %	
0	0	0	< 0,30					
0	0	1	0,30	3	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1		0				
0	2	0	0,6	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0		0				
1	0	0	0,4	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,7	2	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2		0				
1	1	0	0,7	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	0,35	3,50	0,18	4,60
1	2	0	1,1	2	0,36	3,50	0,19	4,60
1	2	1	1,5	3	0,45	3,80	0,24	5,20
1	3	0	1,6	3	0,45	3,80	0,24	5,20
2	0	0	0,9	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	0,36	3,50	0,19	4,60
2	0	2		0				
2	1	0	1,5	1	0,37	3,80	0,20	5,20
2	1	1	2,0	2	0,45	3,80	0,24	5,20
2	1	2		0				
2	2	0	2,1	3	0,45	4,00	0,24	5,60
2	2	1	2,8	3	0,87	9,40	0,51	14,20
2	2	2		0				
2	3	0	2,9	3	0,87	9,40	0,51	14,20
2	3	1		0				
3	0	0	2,3	1	0,46	9,40	0,25	14,20
3	0	1	3,8	1	0,88	10,40	0,52	15,70
3	0	2	6	3	1,60	18,10	1,00	25,00
3	0	3		0				
3	1	0	4	1	0,91	18,10	0,53	25,00
3	1	1	7	1	1,70	19,90	1,10	27,00
3	1	2	12	3	3,50	36,00	2,10	44,00
3	1	3		0				
3	2	0	9	1	1,80	36,00	1,20	43,00
3	2	1	15	1	3,50	38,00	2,20	52,00
3	2	2	21	2	3,50	40,00	2,50	56,00
3	2	3	29	3	9,00	99,00	4,60	152,00
3	3	0	20	1	3,60	99,00	2,60	152,00
3	3	1	50	1	9,10	198,00	4,70	280,00
3	3	2	110	1	18,20	405,00	11,40	570,00
3	3	3	> 110					

1) D'après DE MAN, J.C. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 17 1983: 301-305.

2) Voir annexe C.

3) Les limites de confiance de 95 et 99 % ont été calculées seulement sur la base de considérations statistiques. En réalité l'erreur limite dans le nombre de bactéries sera plus grande que ne l'indiquent ces limites.