

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
7251

Deuxième édition  
1993-12-15

---

---

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

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/449c4695-1168-463d-ab8d-ee962af4e865/iso-7251-1993>



Numéro de référence  
ISO 7251:1993(F)

## 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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert 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*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/449c4695-1168-463d-ab8d-9624e8655a17/iso-7251-1993>

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 7251:1984), qui a été révisée techniquement.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente Norme internationale.

© ISO 1993

Droits de reproduction réservés. 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

## 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 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 enseignements 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.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/449c4695-1168-463d-ab8d->

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.

Page blanche

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

ISO 7251:1993

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/449c4695-1168-463d-ab8d-ee962af4e865/iso-7251-1993>

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

## 1 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 °C (cette température faisant l'objet d'un accord entre les parties concernées), puis à 45 °C.

**IMPORTANT — Il existe des espèces d'*Escherichia coli* pathogènes qui ne se cultivent pas à 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 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appli-

quer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

ISO 7218:1985, *Microbiologie — Directives générales pour les examens microbiologiques.*

## 3 Définition

Pour les besoins de la présente Norme internationale, la définition suivante s'applique.

**3.1 *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)]<sup>1)</sup> 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.

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

**4.2** Ensemencement de trois tubes de milieu liquide d'enrichissement simple concentration [voir 5.3.1 b)]<sup>1)</sup> 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 [5.3.1 b)] avec les dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

**4.3** Incubation des tubes de milieu double et simple concentration à 35 °C ou 37 °C (selon accord) durant 24 h 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 h à 48 h et examen de cette nouvelle série de tubes (4.4) 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 h à 48 h et examen de cette nouvelle série de tubes (4.6) pour la production d'indole.

**4.8** Détermination du nombre le plus probable d'*Escherichia coli* présumés au moyen de la table NPP (voir annexe A), 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 Généralités**

Pour les pratiques courantes de laboratoires, voir l'ISO 7218.

**5.2 Diluant**

Voir ISO 6887:1983, chapitre 5, et la Norme internationale spécifique du produit à examiner.

**5.3 Bouillon à la tryptose et au lauryl sulfate** (milieu d'enrichissement sélectif).

**5.3.1 Composition**

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
Tryptose	40,0 g	20,0 g
Lactose	10,0 g	5,0 g
Hydrogénophosphate dipotassique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	5,5 g	2,75 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	5,5 g	2,75 g
Chlorure de sodium	10,0 g	5,0 g
Lauryl sulfate de sodium [CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>11</sub> OSO <sub>3</sub> Na]	0,2 g	0,1 g
Eau	1 000 ml	1 000 ml

**5.3.2 Préparation**

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté, dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,8 à 7,5 °C.

Répartir les milieux, par quantités de 10 ml dans des tubes de 16 mm x 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.6) dans le cas du milieu simple concentration, et dans des tubes de 20 mm x 200 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.6) dans le cas du milieu double concentration.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

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

## 5.4 Bouillon EC (deuxième milieu sélectif)

### 5.4.1 Composition

Tryptose ou trypticase	20,0 g
Lactose	5,0 g
Sels biliaires n° 3 <sup>1)</sup>	1,5 g
Hydrogénophosphate dipotassique (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Eau	1 000 ml

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

### 5.4.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

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 (6.6).

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

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

## 5.5 Eau tryptonée

### 5.5.1 Composition

Tryptone	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Eau	1 000 ml

### 5.5.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire.

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 ml à 10 ml, dans des tubes de 16 mm × 160 mm (6.4).

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 15 min.

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

### 5.6.1 Composition

Diméthylamino-4 benzaldéhyde	5,0 g
Méthyl-2 butanol-1 ou pentanol-1	75,0 ml
Acide chlorhydrique (ρ <sub>20</sub> 1,18 à 1,19 g/ml)	25,0 ml

### 5.6.2 Préparation

Dissoudre le diméthylamino-4-benzaldéhyde dans l'alcool en chauffant doucement au moyen d'un bain d'eau réglable à environ 50 °C 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 1 Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

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

Voir l'ISO 7218.

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

**6.3 Bain d'eau**, réglable à 45 °C ± 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.

**6.5 Anses bouclées**, en platine iridié ou en nickel-chrome, d'environ 3 mm de diamètre, ou **sacs jetables stériles**.

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

**6.7 Pipettes à écoulement total**, de 1 ml et 10 ml de capacité nominale

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

## 7 Échantillonnage

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à la Norme internationale spécifique du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

## 9 Mode opératoire

### 9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

Voir ISO 6887 et la Norme internationale spécifique du produit concerné.

Effectuer un nombre de dilutions suffisant afin 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 sélectif double concentration [5.3.1 a)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, à l'aide d'une pipette stérile (6.7), 10 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 10 ml de la suspension mère, dans le cas d'autres produits.

**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 stérile (6.7), 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère, dans le cas d'autres produits.

**9.2.1.3** Pour chacune des dilutions suivantes (à partir de  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$ , selon l'échantillon pour essai), opérer comme en 9.2.1.2. Utiliser une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution. Bien mélanger l'inoculum et le milieu.

#### 9.2.2 Incubation

Incuber les tubes de milieu sélectif double concentration (9.2.1.1) et les tubes de milieu sélectif simple concentration (9.2.1.2 et 9.2.1.3) à l'étuve (6.2) réglée à 35 °C ou 37 °C (selon accord) durant  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ . Si, à ce stade, on n'observe pas de formation de gaz ni de trouble empêchant l'observation du dégagement gazeux, prolonger l'incubation jusqu'à un total de  $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ .

#### 9.2.3 Ensemencement du deuxième milieu sélectif

À partir de chaque tube incubé selon 9.2.2 et présentant un dégagement gazeux, ensemencer avec une anse bouclée (6.5) 10 ml du milieu sélectif (5.4), préalablement chauffé à 45 °C.

#### 9.2.4 Deuxième incubation

Incuber les tubes ensemencés en 9.2.3, dans le bain d'eau (6.3) réglé à 45 °C durant  $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ . 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, ensemencer avec une anse bouclée (6.5), un tube d'eau tryptonée (5.5) préalablement chauffé à 45 °C.

#### 9.2.6 Incubation

Incuber les tubes ensemencés en 9.2.5 dans le bain d'eau (6.3) réglé à 45 °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 (5.6) dans les tubes contenant la culture en eau tryptonée (9.2.5), bien mélanger et examiner après 1 min.

#### 9.2.8 Interprétation

Pour chaque dilution, compter le nombre de tubes ayant une couleur rouge de la phase alcoolique indiquant la présence d'indole (tubes positifs).

## 10 Expression des résultats

### 10.1 Choix des dilutions<sup>2)</sup>

Pour chaque échantillon examiné, retenir trois dilutions consécutives en se conformant à 10.1.1, 10.1.2 ou 10.1.3, selon le cas.

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



### 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 exemple 1, tableau 1).

Voir également en 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 exemple 2, tableau 1).

### 10.1.2 Cas 2 — Pas de dilution révélant trois tubes positifs

Le cas 1 ne peut être appliqué. Choisir les trois dilutions les plus élevées de la série (c'est-à-dire celles ayant la plus faible concentration en échantillon) qui contiennent au moins une réponse positive (voir exemple 3, tableau 1).

Voir également 10.1.3.

### 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 100 fois celle de la première dilution choisie) (voir exemples 4 et 5, tableau 1), 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** Vérifier, selon le nombre d'échantillons examinés par lot dans le tableau A.1, 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 de la fois du nombre d'échantillons examinés et de la décision d'accepter ou de refuser les résultats des catégories 2 et 3 (voir tableau A.2).

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 acceptable en aucune manière.

**10.2.2** Pour chaque séquence jugée acceptable selon 10.2.1, le coefficient NPP est obtenu au moyen du tableau A.1.

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

Le nombre d'*Escherichia coli* présumés par millilitre ou par gramme de produit est obtenu 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  $10^x$ ,  $x$  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), exprimer le résultat de la façon suivante: «absence d'*Escherichia coli*, présumés dans 1 ml ou 1 g de produit».

## 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 l'annexe A.

### EXEMPLE

Pour un échantillon solide, les limites de confiance avec une probabilité de 95 % sont comprises entre 13 et 200 *Escherichia coli* par gramme pour un NPP de  $7,4 \times 10^1$  *Escherichia coli* par gramme, et entre 4 et 99 *Escherichia coli* par gramme, pour un NPP de  $2,4 \times 10^1$  *Escherichia coli* par gramme.

## 11 Rapport d'essai

Le rapport 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