

NORME  
INTERNATIONALE

**ISO**  
**7402**

Deuxième édition  
1993-09-15

---

---

**Microbiologie — Directives générales pour  
le dénombrement sans revivification des  
*Enterobacteriaceae* — Technique NPP et  
méthode par comptage des colonies  
(standards.iteh.ai)**

*Microbiology — General guidance for the enumeration of  
Enterobacteriaceae without resuscitation — MPN technique and  
colony-count technique*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/39e1fb2c-28bc-4ddf-b17f-67164551a38a/iso-7402-1993>



Numéro de référence  
ISO 7402:1993(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 7402 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 7402:1985), qui fait l'objet d'une révision technique.

Les annexes A et B font 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 à prendre 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, ces directives, 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. [ISO 7402:1993](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/39e1fb2c-28bc-4ddf-b17f-617012200092/iso-7402-1993)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/39e1fb2c-28bc-4ddf-b17f-617012200092/iso-7402-1993>

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, qui ne concordent pas avec ces directives, existent peut-être déjà. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à essayer, elles devront être appliquées, mais il serait souhaitable que, lorsqu'elles viendront en révision, elles soient alignées sur la présente Norme internationale, si bien que, finalement, les seules divergences restantes seront celles qui sont nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

Pour chaque produit particulier, la méthode à utiliser sera précisée dans la Norme internationale concernant ce produit.

Page blanche

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

ISO 7402:1993

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/39e1fb2c-28bc-4ddf-b17f-67164551a38a/iso-7402-1993>

# Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement sans revivification des *Enterobacteriaceae* — Technique NPP et méthode par comptage des colonies

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des directives générales pour le dénombrement des *Enterobacteriaceae* dans les produits destinés à la consommation humaine ou à l'alimentation animale

- par calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 35 °C ou 37 °C en milieu liquide;
- par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation à 35 °C ou 37 °C.

La température utilisée doit faire l'objet d'un accord entre les parties concernées et doit être mentionnée dans le rapport d'essai.

NOTE 1 Dans le cas des produits réfrigérés et congelés, une température d'incubation de 30 °C est recommandée, notamment lorsque le dénombrement est effectué dans un but technologique.

Pour les petits nombres, la technique NPP est préférable, sinon on préférera la méthode par comptage des colonies.

La présente Norme internationale n'inclut pas de technique de revivification, et les résultats ne doivent pas être reliés aux critères ou spécifications basés sur la supposition qu'une revivification a été effectuée.

Des limites sont imposées aux possibilités d'application de la présente Norme internationale, du fait que ces méthodes sont sujettes à de grandes variations. Il est recommandé d'employer ces méthodes et d'interpréter les résultats à la lumière des renseignements donnés en 10.3.

## 2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, consti-

tuent 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'appliquer 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 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

**3.1 *Enterobacteriaceae*:** Micro-organismes fermentant le glucose et donnant une réaction oxydase négative lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée.

**3.2 dénombrement des *Enterobacteriaceae*:** Nombre d'*Enterobacteriaceae* trouvé par millilitre ou par gramme d'échantillon lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée.

## 4 Principe

### 4.1 Préparation des dilutions

À partir de l'échantillon pour essai, préparation des dilutions décimales.

## 4.2 Dénombrement des *Enterobacteriaceae*

### 4.2.1 Technique du nombre le plus probable (NPP)

NOTE 2 Il est recommandé d'utiliser cette technique lorsque le nombre cherché est supposé se trouver dans l'intervalle de 1 à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

Ensemencement de trois tubes de milieu double concentration 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.

Ensemencement de trois tubes de milieu simple concentration 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 de trois tubes de milieu simple concentration avec la première dilution décimale obtenue à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation des tubes à 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 24 h.

À partir du nombre de tubes confirmés positifs, calcul du nombre le plus probable d'*Enterobacteriaceae* par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai, au moyen de la table NPP (voir annexe A).

### 4.2.2 Comptage des colonies

NOTE 3 Il est recommandé d'utiliser cette technique lorsque le nombre cherché est supposé supérieur à 100 par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

Ensemencement en profondeur du milieu gélosé à la bile, au cristal violet et au glucose, coulé dans deux boîtes de Petri, avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai si le produit à examiner est liquide, ou avec une quantité déterminée de la suspension mère dans le cas d'autres produits. Recouvrement avec une couche du même milieu.

Dans les mêmes conditions, ensemencement d'autres paires de boîtes avec les dilutions décimales obtenues à partir de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

Incubation des boîtes à 35 °C ou 37 °C (selon accord) pendant 24 h ± 2 h.

À partir du nombre de colonies caractéristiques confirmées par boîte de Petri, calcul du nombre d'*Enterobacteriaceae* par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai.

## 5 Diluant, milieux de culture et réactif

### 5.1 Généralités

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

### 5.2 Diluant

Voir l'ISO 6887 et la norme spécifique traitant du produit à analyser.

### 5.3 Milieux de culture

#### 5.3.1 Milieu tamponné, à la bile, au vert brillant et au glucose (milieu E.E.)

##### 5.3.1.1 Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
Peptone	20,0 g	10,0 g
Glucose	10,0 g	5,0 g
Hydrogénophosphate disodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	12,90 g	6,45 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	4,0 g	2,0 g
Bile de bœuf déshydratée	40,0 g	20,0 g
Vert brillant	0,030 g	0,015 g
Eau	1 000 ml	1 000 ml

##### 5.3.1.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant le tout à ébullition. Ne pas chauffer le milieu plus de 30 min. Refroidir le milieu rapidement.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après ébullition, il soit de 7,2 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture par quantités de 10 ml dans des tubes stériles (6.8).

Ne pas stériliser le milieu à l'autoclave.

Le milieu peut être conservé 1 semaine au maximum entre 0 °C et 5 °C.

### 5.3.2 Gélose à la bile, au cristal violet et au glucose (VRBG)

#### 5.3.2.1 Composition

Peptone	7,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Sels biliaires	1,5 g
Glucose	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Rouge neutre	0,03 g
Cristal violet	0,002 g
Agar-agar, en poudre ou en flocons	8 à 18 g <sup>1)</sup>
Eau	1 000 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

#### 5.3.2.2 Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu complet déshydraté dans l'eau, en portant le tout à ébullition. Ne pas chauffer le milieu plus de 30 min.

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après ébullition, il soit de 7,4 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture dans des tubes stériles ou dans des flacons stériles (6.5) de 500 ml de capacité maximale.

Ne pas stériliser le milieu à l'autoclave.

Préparer ce milieu extemporanément (voir 9.2.2 et 9.3.1).

#### 5.3.2.3 Préparation des boîtes de gélose

(seulement nécessaire pour la technique NPP — voir 9.2.2)

Transférer immédiatement environ 15 ml du milieu de culture, refroidi à environ 45 °C, dans des boîtes de Petri (6.3) et laisser se solidifier.

Juste avant l'emploi, sécher les boîtes de gélose, de préférence avec le couvercle enlevé et la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3) jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

Si elles ont été préparées à l'avance, les boîtes de gélose non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température ambiante ou plus d'un jour entre 0 °C et 5 °C.

### 5.3.3 Gélose glucosée

#### 5.3.3.1 Composition

Tryptone	10,0 g
Extrait de levure	1,5 g
Glucose	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Pourpre de bromocrésol	0,015 g
Agar-agar	8 g à 18 g <sup>1)</sup>
Eau	1 000 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

#### 5.3.3.2 Préparation

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.

Répartir le milieu de culture par quantités de 15 ml dans des tubes (6.8).

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

Maintenir les tubes en position verticale.

Le milieu peut être conservé 1 semaine au maximum entre 0 °C et 5 °C.

Juste avant l'emploi, chauffer dans de l'eau bouillante ou sous courant de vapeur pendant 15 min, puis refroidir rapidement à la température d'incubation.

### 5.3.4 Gélose nutritive

#### 5.3.4.1 Composition

Extrait de viande de bœuf	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar-agar, en poudre ou flocons	8 à 18 g <sup>1)</sup>
Eau	1 000 ml

1) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

#### 5.3.4.2 Préparation

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

Ajuster le pH, si nécessaire, de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,0 à 25 °C.



Répartir le milieu de culture dans des tubes ou des flacons (6.8) de 500 ml de capacité maximale.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglée à 121 °C durant 15 min.

**5.3.4.3 Préparation des boîtes de gélose** (voir 9.4.1)

Transférer immédiatement environ 15 ml du milieu de culture, puis refroidir à environ 45 °C, dans des boîtes de Petri (6.6) et laisser se solidifier.

Juste avant l'emploi, sécher les boîtes de gélose, de préférence avec le couvercle enlevé et la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3) jusqu'à séchage de la surface de la gélose.

Si elles ont été préparées à l'avance, les boîtes de gélose non séchées ne doivent pas être conservées plus de 4 h à la température ambiante ou plus d'un jour entre 0 °C et 5 °C.

**5.4 Réactif pour l'essai à l'oxydase**

**5.4.1 Composition**

Dichlorhydrate de <i>N,N,N',N'</i> - tétraméthyl- <i>p</i> -phénylène diamine	1,0 g
Eau	100 ml.

**5.4.2 Préparation**

Dissoudre le réactif dans l'eau froide.

Préparer le réactif immédiatement avant usage.

**6 Appareillage et verrerie**

NOTE 4 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 notamment:

**6.1 Appareil 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.

**6.3 Enceinte de séchage ou étuve**, réglable entre 35 °C ± 1 °C et 55 °C ± 1 °C.

**6.4 pH-mètre**, précis à ± 0,1 unité pH à 25 °C.

**6.5 Bain d'eau**, ou dispositif similaire, réglable à 45 °C ± 1 °C.

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

**6.7 Anse bouclée**, d'un diamètre d'environ 3 mm, et **fil droit** en platine iridié ou en nickel-chrome, ou **baguette de verre** ou anse bouclée à usage unique.

NOTE 5 Le nickel-chrome ne convient pas pour l'essai à l'oxydase (voir 9.4.2.1).

**6.8 Tubes à essai**, de dimensions 16 mm × 160 mm et 20 mm × 200 mm environ, et **flacons ou fioles**, de capacité comprise entre 150 ml et 500 ml.

**6.9 Pipettes graduées à écoulement total**, de capacités nominales de 1 ml et 10 ml, graduées respectivement en 0,1 ml et 0,5 ml.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

**7 Échantillonnage**

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon réellement représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique à 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 l'ISO 6887 et la norme spécifique traitant du produit concerné.

Préparer une seule série de dilutions décimales à partir de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits.



## 9.2 Technique NPP

### 9.2.1 Ensemencement et incubation

Prendre trois tubes de milieu double concentration [5.3.1.1, a)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, avec une pipette (6.9), 10 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 10 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre trois tubes du milieu simple concentration [5.3.1.1, b)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, avec une nouvelle pipette (6.9), 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre trois autres tubes de milieu simple concentration [5.3.1.1, b)]. Transférer, dans chacun de ces tubes, avec une nouvelle pipette (6.9), 1 ml de la première dilution décimale ( $10^{-1}$ ) de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère ( $10^{-2}$ ) dans le cas d'autres produits.

Faire incuber ces neuf tubes durant 24 h à 35 °C ou 37 °C.

### 9.2.2 Isolement

Ensemencer en stries une anse (6.7) de chacune des neuf cultures incubées (voir 9.2.1), sur des boîtes de gélose à la bile, au cristal violet et au glucose (voir 5.3.2.3), et faire incuber les boîtes à 35 °C ou 37 °C (selon accord) durant 24 h.

### 9.2.3 Sélection des colonies pour confirmation

À partir des boîtes incubées en 9.2.2, présentant un développement de colonies caractéristiques roses à rouges (avec ou sans halo de précipité), ou incolores, muqueuses, prélever au hasard cinq de ces colonies en vue de la confirmation biochimique (voir 9.4.2) à effectuer après une sub-culture (voir 9.4.1).

## 9.3 Technique par comptage des colonies

### 9.3.1 Ensemencement et incubation

**9.3.1.1** Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.6). À l'aide d'une pipette stérile (6.9), transférer, dans chacune de ces boîtes, 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (6.9), transférer 1 ml de la première dilution décimale ( $10^{-1}$ ) de l'échantillon pour essai si le produit est liquide, ou 1 ml de la première dilution décimale de la suspension mère ( $10^{-2}$ ) dans le cas d'autres produits.

Recommencer ces opérations avec des dilutions successives, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, pour chaque dilution décimale.

**9.3.1.2** Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 15 ml du milieu gélosé à la bile, au cristal violet et au glucose (5.3.2), préparé puis refroidi à environ 45 °C au bain d'eau (6.5). Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution au  $10^{-1}$  dans le cas d'un produit liquide) et le moment où les dilutions entrent en contact avec le milieu (5.3.2) ne doit pas dépasser 15 min.

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu par des déplacements horizontaux des boîtes et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

**9.3.1.3** Après solidification du mélange, ajouter une couche superficielle composée d'environ 10 à 15 ml du milieu gélosé à la bile, au cristal violet et au glucose (5.3.2), préparé puis refroidi comme décrit en 9.3.1.2, afin d'empêcher l'étalement des colonies et d'obtenir des conditions de semi-anaérobiose. Laisser se solidifier comme décrit ci-dessus.

**9.3.1.4** Inverser les boîtes préparées et les incuber à l'étuve réglée à 35 °C ou 37 °C (selon accord) durant 24 h.

### 9.3.2 Comptage et sélection des colonies

Choisir les boîtes (9.3.1.4) contenant moins de 150 colonies caractéristiques (voir 9.2.3) ayant un diamètre de 0,5 mm ou plus. Compter ces colonies suspectes. Prélever au hasard cinq de ces colonies sur chacune des boîtes de Petri de la confirmation biochimique (voir 9.4.2) à effectuer après une sub-culture (voir 9.4.1).

Considérer la détermination sans valeur si la moitié ou plus de la surface d'une boîte est envahie. Si moins de la moitié de la surface d'une boîte est envahie, effectuer le décompte des colonies sur la partie claire et extrapoler pour que le nombre corresponde à la surface totale de la boîte.

## 9.4 Confirmation

### 9.4.1 Sub-culture

Ensemencer en stries sur des boîtes de gélose nutritive (5.3.4) chacune des colonies sélectionnées en vue de la confirmation (voir 9.2.3 et 9.3.2).

Faire incuber ces boîtes durant 24 h  $\pm$  2 h à 35 °C ou 37 °C (selon accord). Sélectionner une colonie bien isolée à partir de chacune des boîtes incubées en vue de confirmation biochimique (voir 9.4.2).

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.i-teh.ai)

ISO 7402:1993  
https://standards.catalanstandards/sis/5311f2c-11f2c-11e2-8000-67164551a38a/iso-7402-1993