

---

---

**Lait et produits laitiers — Dénombrement  
d'*Escherichia coli* présumés —**

**Partie 1:**

**Technique du nombre le plus probable**

*Milk and milk products — Enumeration of presumptive Escherichia coli —  
Part 1: Most probable number technique*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 11866-1:1997

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997>



## 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 11866-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, en collaboration avec la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'AOAC INTERNATIONAL et sera également publiée par ces organisations.

L'ISO 11866 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Lait et produits laitiers – Dénombrement d'Escherichia coli présumés*:

- *Partie 1: Technique du nombre le plus probable*
- *Partie 2: Technique du nombre le plus probable avec utilisation de 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide (MUG)*
- *Partie 3: Technique par comptage des colonies obtenues sur membranes à 44 °C*

La méthode prescrite dans l'ISO 11866-1 est particulièrement applicable aux échantillons supposés contenir un nombre relativement faible d'*Escherichia coli* présumés.

L'annexe A fait partie intégrante de la présente partie de l'ISO 11866. L'annexe B est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1997

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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  
Internet central@iso.ch  
X.400 c=ch; a=400net; p=iso; o=isocs; s=central

Imprimé en Suisse

# Lait et produits laitiers — Dénombrement d'*Escherichia coli* présumés

## Partie 1:

### Technique du nombre le plus probable

#### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11866 prescrit une méthode pour le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés, au moyen de la technique de culture en milieu liquide et calcul du nombre d'*Escherichia coli* par gramme ou par millilitre, par la technique du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 37 °C puis à 44 °C.

Cette méthode est applicable aux

- lait et produits laitiers liquides;
- lait sec, lactosérum sucré sec, babeurre sec et lactose;
- caséine acide, caséine lactique et caséine présure;
- caséinates et lactosérum acide sec; [ISO 11866-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997)
- fromage et fromages fondus; <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997>
- beurre;
- produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation);
- crème anglaise, desserts et crème.

La méthode prescrite dans la présente partie de l'ISO 11866 est la méthode recommandée pour les échantillons supposés contenir un nombre relativement faible d'*Escherichia coli* présumés (moins de 100 par gramme ou 10 par millilitre).

**ATTENTION** — Certaines espèces pathogènes d'*Escherichia coli* ne se développent pas à 44 °C. Les possibilités d'application de la présente partie de l'ISO 11866 sont limitées 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 à l'article 12.

#### 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 partie de l'ISO 11866. 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 partie de l'ISO 11866 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 7218:1996, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*.

ISO 8261:1989, *Lait et produits laitiers — Préparation des échantillons pour essai et des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

### 3 Définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 11866, la définition suivante s'applique.

#### 3.1 *Escherichia coli* présumés:

Bactéries qui, à 44 °C, fermentent le lactose avec production de gaz et qui, à 44 °C, produisent de l'indole à partir du tryptophane, dans les conditions prescrites dans la présente partie de l'ISO 11866.

### 4 Principe

4.1 Ensemencement de trois tubes de milieu sélectif liquide d'enrichissement double concentration [voir 5.3.1.1a)] 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 sélectif liquide d'enrichissement simple concentration [voir 5.3.1.1b)] 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 [5.3.1b)] avec des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

4.3 Incubation des tubes de milieu double ou simple concentration à 37 °C pendant 24 h à 48 h. Examen des tubes pour la formation de gaz.

4.4 Ensemencement, à partir des tubes de milieu double ou simple concentration ayant donné lieu à un dégagement gazeux, d'une nouvelle série de tubes contenant le second milieu sélectif (5.3.2).

4.5 Incubation à 44 °C pendant 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 liquide (4.5) ayant donné lieu à un dégagement gazeux, d'une nouvelle série de tubes contenant de l'eau tryptonée (5.4).

4.7 Incubation à 44 °C pendant 24 h à 48 h et examen de cette nouvelle série de tubes (4.6) pour la formation d'indole.

4.8 Identification comme étant positifs pour *Escherichia coli* présumés, des tubes préalablement ensemencés en 4.1 et/ou 4.2, présentant une formation de gaz en 4.5, à partir du second milieu sélectif à 44 °C, et une formation d'indole en 4.7, à partir de l'eau tryptonée à 44 °C.

4.9 Détermination du coefficient NPP d'après le nombre de tubes positifs (4.8) de dilutions choisies, au moyen d'une table NPP (voir l'annexe A) et calcul du nombre le plus probable (NPP) d'*Escherichia coli* présumés par gramme ou par millilitre d'échantillon original.

### 5 Diluant, milieu de culture et réactif

#### 5.1 Généralités

Pour les pratiques courantes de laboratoires, voir l'ISO 7218 et l'ISO 8261.

Si les milieux de culture et les réactifs préparés ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf indications contraires, être conservés à l'obscurité à une température située entre 0 °C et + 5 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

## 5.2 Diluant

Voir l'ISO 8261.

## 5.3 Milieux de culture

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

#### 5.3.1.1 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

[ISO 11866-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997)

#### 5.3.1.2 Préparation <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997>

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 les milieux, par quantités de 10 ml, dans des tubes de 16 mm x 160 mm (6.2) contenant des cloches de Durham (6.3) dans le cas du milieu simple concentration, et dans des tubes de 20 mm x 200 mm (6.2) contenant des cloches de Durham (6.3) 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.

### 5.3.2 Bouillon EC (second milieu sélectif)

#### 5.3.2.1 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 la référence [3].	

#### 5.3.2.2 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 x 160 mm (6.2) contenant des cloches de Durham (6.3).

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

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.

[ISO 11866-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997)

### 5.4 Eau tryptonée

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997>

#### 5.4.1 Composition

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

#### 5.4.2 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 x 160 mm (6.2).

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

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

### 5.5.1 Composition

Diméthylamino-4 benzaldéhyde	5,0 g
Méthyl-2 butanol-1 ou pentanol-1	75,0 ml
Acide chlorhydrique ( $\rho_{20} = 1,18 \text{ g/ml}$ à $1,19 \text{ g/ml}$ )	25,0 ml

### 5.5.2 Préparation

Dissoudre le diméthylamino-4 benzaldéhyde dans l'alcool en chauffant doucement entre 50 °C et 55 °C au moyen du bain d'eau (6.5).

Refroidir et ajouter l'acide chlorhydrique.

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

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

## 6 Appareillage et verrerie

Voir l'ISO 7218 et l'ISO 8261 pour les spécifications générales. La verrerie doit résister à des stérilisations répétées.

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

**6.1 Autoclave**, réglable à 121 °C ± 1 °C.

[ISO 11866-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997)

Pour plus de détails, voir l'ISO 7218.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997>

**6.2 Tubes à essais**, d'environ 16 mm × 160 mm et 20 mm × 200 mm, ou  **fioles**  ou  **flacons**  de capacités appropriées.

**6.3 Cloches de Durham**, de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans les tubes à essais (6.2).

**6.4 Bain d'eau**, réglable à 44 °C ± 0,5 °C.

**6.5 Bain d'eau**, réglable entre 50 °C et 55 °C.

**6.6 Étuve**, permettant de maintenir une température de 37 °C ± 1 °C en tous points.

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

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

**6.9 Pipettes à écoulement total**, de 1 ml et 10 ml de capacités nominales.

## 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 prescrite dans la présente partie de l'ISO 11866. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707.

## 8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 8261.

## 9 Mode opératoire

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

Préparer la prise d'essai, la suspension mère (dilution primaire) et les dilutions décimales suivantes selon la méthode donnée dans l'ISO 8261.

Effectuer un nombre de dilutions suffisant afin de s'assurer que les tubes de la dernière dilution sont négatifs.

### 9.2 Milieu sélectif d'enrichissement

#### 9.2.1 Ensemencement

**9.2.1.1** Prendre trois tubes du milieu sélectif d'enrichissement double concentration [5.3.1.1a)]. À l'aide d'une pipette stérile (6.9), transférer, dans chacun de ces tubes, 10 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 10 ml de la suspension mère (dilution primaire) dans le cas d'autres produits.

**9.2.1.2** Prendre ensuite trois tubes du milieu sélectif d'enrichissement simple concentration [5.3.1.1b)]. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (6.9), transférer, dans chacun de ces tubes, 1 ml de l'échantillon pour essai s'il est liquide, ou 1 ml de la suspension mère (dilution primaire) dans le cas d'autres produits.

**9.2.1.3** Pour chacune des dilutions décimales suivantes, opérer comme en 9.2.1.2. Utiliser une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution.

**9.2.1.4** Mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu au moyen d'un homogénéisateur. Éviter toute introduction d'air dans les cloches de Durham (6.3). [ISO 11866-1:1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997)

#### 9.2.2 Incubation

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997>

Incuber tous les tubes inoculés (depuis les opérations décrites en 9.2.1.1 jusqu'à 9.2.1.3) dans l'étuve (6.6) réglée à 37 °C pendant 24 h ± 2 h. Si, à ce stade, ni formation de gaz, ni trouble empêchant l'observation du dégagement gazeux n'est observé(e), prolonger l'incubation jusqu'à 48 h ± 2 h.

### 9.3 Recherche dans le second milieu sélectif

#### 9.3.1 Ensemencement

À partir de chaque tube incubé selon 9.2.2 et présentant un dégagement gazeux, ainsi que dans chacun des tubes du milieu sélectif double concentration, ensemercer, à l'aide d'une anse bouclée (6.7), le milieu sélectif (5.3.2) préalablement chauffé à 44 °C dans le bain d'eau (6.4).

Mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu. Éviter toute introduction d'air dans les cloches de Durham (6.3).

#### 9.3.2 Incubation

Incuber les tubes ensemençés selon 9.3.1 dans le bain d'eau (6.4) réglé à 44 °C pendant 24 h ± 2 h. Si, à ce stade, aucun dégagement gazeux n'est observé, prolonger l'incubation jusqu'à 48 h ± 2 h.

### 9.4 Recherche dans l'eau tryptonée

#### 9.4.1 Ensemencement

À partir de chaque tube incubé selon 9.3.2 et présentant un dégagement gazeux, ensemercer, à l'aide d'une anse bouclée (6.7), l'eau tryptonée (5.4) préalablement chauffée à 44 °C.

Mélanger soigneusement l'inoculum avec le milieu. Éviter toute introduction d'air dans les cloches de Durham (6.3).

### 9.4.2 Incubation

Incuber les tubesensemencés selon 9.4.1 dans le bain d'eau (6.4) réglé à 44 °C pendant 48 h ± 2 h.

### 9.4.3 Essai pour la formation d'indole

Ajouter 0,5 ml de réactif pour la recherche de l'indole (5.5) dans les tubes contenant la culture en eau tryptonée. Bien mélanger et les examiner après 1 min.

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

### 9.5 Interprétation

Identifier comme étant positifs pour *Escherichia coli* présumés, les tubes préalablementensemencés selon 9.2.1.1 à 9.2.1.3 qui produisent un dégagement gazeux en 9.3.2 et une formation d'indole en 9.4.3.

Pour chaque dilution, compter le nombre de tubes positifs.

## 10 Choix des dilutions

NOTE — La suspension mère (dilution primaire) et l'échantillon pour essai sont considérés comme étant des dilutions.

**10.1** Pour chaque échantillon examiné, retenir trois dilutions successives en se conformant à 10.2, 10.3 ou 10.4 pour obtenir le coefficient NPP.

**10.2** Si seulement trois dilutions ont été préparées, les utiliser pour obtenir le coefficient NPP.

**10.3** Si plus de trois dilutions ont été préparées, la sélection de trois d'entre elles donne des combinaisons ayant différents niveaux de probabilité. Cela peut être exprimé sous forme de catégories, présentées dans le tableau A.1 (annexe A). Les explications de ces catégories sont données dans le tableau A.2 (annexe A).

**10.4** Choisir la combinaison de trois dilutions successives de la catégorie 1 pour obtenir le coefficient NPP; si plusieurs combinaisons avec la catégorie 1 sont obtenues, utiliser celle qui comprend le plus grand nombre de tubes positifs.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d6e6a181-7297-4cc2-a1a2-56a4ba94a7da/iso-11866-1-1997>

Si l'on ne dispose d'aucune combinaison avec la catégorie 1, utiliser celle de la catégorie 2; si plusieurs combinaisons avec la catégorie 2 sont obtenues, utiliser celle qui comprend le plus grand nombre de tubes positifs (voir les exemples du tableau 1).

Si l'on ne dispose d'aucune combinaison avec la catégorie 2, utiliser celle de la catégorie 3; si plusieurs combinaisons avec la catégorie 3 sont obtenues, utiliser celle qui comprend le plus grand nombre de tubes positifs (voir les exemples du tableau 1).

**Tableau 1 — Exemples de choix de résultats positifs pour calculer les valeurs de NPP**

Exemple	Nombre de tubes positifs obtenus à partir de trois tubes incubés pour les quantités suivantes d'échantillon inoculées par tube <sup>1)</sup>						NPP <sup>2)</sup>	
	Produit liquide	10 ml	1 ml	10 <sup>-1</sup> ml	10 <sup>-2</sup> ml	10 <sup>-3</sup> ml	Produits liquides ml <sup>-1</sup>	Autres produits g <sup>-1</sup>
	Autres produits	1 g	10 <sup>-1</sup> g	10 <sup>-2</sup> g	10 <sup>-3</sup> g	10 <sup>-4</sup> g		
1	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	1	0		1,1 x 10 <sup>1</sup>	1,1 x 10 <sup>2</sup>
2	3	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>			2,4 x 10 <sup>1</sup>	2,4 x 10 <sup>2</sup>
3	2	2	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>0</b>		7,4	7,4 x 10 <sup>1</sup>
4	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>0</b>	0	0		2,4	2,4 x 10 <sup>1</sup>
5	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	1	0		2,1 x 10 <sup>-1</sup>	2,1

1) Les caractères imprimés en **gras** correspondent à la combinaison choisie.

2) Calculé à partir du coefficient NPP pour trois tubes (voir le tableau A.1).