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

Partie 2:

Technique du nombre le plus probable avec
utilisation de 4-méthylumbelliféryl- β -
D-glucuronide (MUG)

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Milk and milk products — Enumeration of presumptive Escherichia coli —

*Part 2: Most probable number technique using 4-methylumbelliferyl- β -
D-glucuronide (MUG)*

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8481955f-818d-43a6-a25d-
000978c0538b/iso-11866-2-1997](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8481955f-818d-43a6-a25d-000978c0538b/iso-11866-2-1997)



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 11866-2 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 11866-2 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=isos; s=central

Imprimé en Suisse

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

Partie 2:

Technique du nombre le plus probable avec utilisation de 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide (MUG)

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11866 prescrit une méthode pour le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés et des coliformes présumés, au moyen de la technique de culture en milieu liquide contenant du MUG et calcul du nombre d'*Escherichia coli* présumés et/ou des coliformes par gramme ou par millilitre, par la technique du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 30 °C.

Cette méthode est plus rapide que celle décrite dans l'ISO 11866-1 étant donné que le temps d'incubation est réduit (il n'y a pas d'incubation 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;
- fromage et fromages fondus;
- 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 et/ou autres coliformes (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.

NOTE — Pour référence, les méthodes décrites dans l'ISO 5541-1 s'appliquent pour le dénombrement des coliformes.

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, les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 *Escherichia coli* présumés:

Bactéries qui, à 30 °C, séparent le 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide (MUG) en émettant une fluorescence et qui produisent de l'indole à partir du tryptophane, dans les conditions prescrites dans la présente partie de l'ISO 11866.

3.2 coliformes:

Bactéries qui, à 30 °C fermentent le lactose avec production de gaz, lorsque l'essai est effectué selon la méthode prescrite dans la présente partie de l'ISO 11866.

4 Principe

ISO 11866-2:1997
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8481955f-818d-43a6-a25d-000978c0538b/iso-11866-2-1997>

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 30 °C pendant 24 h à 48 h.

4.4 Identification comme étant positifs pour *Escherichia coli* présumés, des tubes présentant une fluorescence et une formation d'indole.

4.5 Identification comme étant positifs pour les coliformes, des tubes présentant une formation de gaz.

4.6 Détermination du coefficient NPP d'après le nombre de tubes positifs (4.4) 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.

4.7 Détermination du coefficient NPP d'après le nombre de tubes positifs (4.5) de dilutions choisies, au moyen d'une table NPP (voir l'annexe A) et calcul du nombre le plus probable (NPP) de coliformes par gramme ou par millilitre d'échantillon original.

5 Diluant, milieu de culture et réactifs

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 ₂ HPO ₄)	5,5 g	2,75 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	5,5 g	2,75 g
Chlorure de sodium	10,0 g	5,0 g
Lauryl sulfate de sodium [CH ₃ (CH ₂) ₁₁ OSO ₃ Na]	0,2 g	0,1 g
4-Méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide (MUG)	0,2 g	0,1 g
Tryptophane	2,0 g	1,0 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 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 cloche 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.

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

5.4.1 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

5.4.2 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.

5.5 Hydroxyde de sodium, solution, $\alpha(\text{NaOH}) = 0,5 \text{ mol/l}$.

5.5.1 Composition

Hydroxyde de sodium	2 g
Eau	100 ml

iTeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.5.2 Préparation

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8481955f-818d-43a6-a25d-000978c0538b/iso-11866-2-1997>

Dissoudre l'hydroxyde de sodium dans l'eau.

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 $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

Pour plus de détails, voir l'ISO 7218.

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

Il convient de vérifier, avant utilisation, que les tubes ne présentent aucune fluorescence propre.

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

6.3 Étuve, permettant de maintenir une température de $30 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ en tous points.

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

6.5 Lampe à ultraviolets (UV) à ondes longues, de longueurs d'ondes comprises entre 360 nm à 366 nm, de préférence dans une enceinte UV ou une chambre noire, ou couverte d'un dispositif (boîte ou carton) afin de faire le noir.

NOTE — Les lampes à ondes courtes (germicides) ne sont pas appropriées.

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

6.7 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 iTeh STANDARD PREVIEW

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions (standards.iteh.ai)

Préparer la prise d'essai, la suspension mère (dilution primaire) et les dilutions décimales suivantes selon la méthode donnée dans l'ISO 8261. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8481955f-818d-43a6-a25d-000978c0538b/iso-11866-2-1997>

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

9.2 Ensemencement du milieu sélectif d'enrichissement

9.2.1 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.

9.2.2 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.

9.2.3 Pour chacune des dilutions décimales suivantes, opérer comme en 9.2.2. Utiliser une nouvelle pipette stérile pour chaque dilution.

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

9.3 Incubation

Incuber tous les tubes inoculés (depuis les opérations décrites en 9.2.1 jusqu'à 9.2.3) dans l'étuve (6.4) réglée à 30 °C pendant $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$. 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 $48 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$.

9.4 Essai de confirmation pour *Escherichia coli* présumés

Réaliser l'essai de confirmation pour *Escherichia coli* dans tous les tubes incubés selon 9.3.

Ajouter 0,5 ml de solution d'hydroxyde de potassium (5.5) dans chaque tube. Les examiner sous la lampe UV (6.6) afin de voir s'il y a fluorescence. Ajouter 0,5 ml de réactif pour la recherche de l'indole (5.4) dans les tubes présentant une fluorescence. 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

9.5.1 Essai pour *Escherichia coli* présumés

Identifier comme étant positifs pour *Escherichia coli* présumés, les tubes ensemencés selon 9.2.1 à 9.2.3 qui produisent une fluorescence et la formation d'indole en 9.4.

Pour chaque dilution, compter le nombre de tubes positifs.

9.5.2 Essai pour les coliformes

Identifier comme étant positifs pour les coliformes, les tubes ensemencés selon 9.2.1 à 9.2.3 qui produisent un dégagement gazeux en 9.3.

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.

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 le calcul des valeurs de NPP

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

11 Détermination, calcul et expression des résultats

11.1 Détermination du coefficient NPP

11.1.1 Déterminer le coefficient NPP d'*Escherichia coli* présumés à partir du nombre de tubes positifs (9.5.1) pour chaque dilution retenue (article 10) à l'aide du tableau A.1 (voir l'annexe A).

11.1.2 Déterminer le coefficient NPP de coliformes à partir du nombre de tubes positifs (9.5.2) pour chaque dilution retenue (article 10) à l'aide du tableau A.1 (voir l'annexe A).

11.2 Calcul du nombre le plus probable (NPP)

Obtenir le nombre le plus probable (NPP) d'*Escherichia coli* présumés par millilitre ou par gramme de produit en multipliant le coefficient NPP (voir 11.1) 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.

NOTE — La division par 10 du coefficient NPP n'est nécessaire qu'avec les produits liquides pour lesquels 10 ml de l'échantillon pour essai sont transférés dans le tube avec le milieu double concentration.

Dans le cas des autres produits 10 ml de la suspension mère (dilution primaire), contenant 1 g d'échantillon pour essai, sont transférés dans le tube avec le milieu double concentration.

11.3 Expression des résultats

Exprimer le résultat comme le nombre le plus probable (NPP) d'*Escherichia coli* présumés ou de coliformes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits) par un chiffre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Si le NPP est inférieur à 0,3 *Escherichia coli* présumés ou coliformes par millilitre ou par gramme et si le mode opératoire utilisé est celui qui est approprié pour un faible nombre d'*Escherichia coli* présumés ou de coliformes, exprimer le résultat de la façon suivante: «absence d'*Escherichia coli* présumés ou de coliformes dans 1 ml ou 1 g de produit».