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

Partie 3:

Technique par comptage des colonies
obtenues sur membranes à 44 °C

iTeh STANDARD PREVIEW

Milk and milk products — Enumeration of presumptive Escherichia coli —

Part 3: Colony-count technique at 44 °C using membranes

[ISO 11866-3:1997](https://standards.iso.org/iso/11866-3:1997)

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/6343c09c-5403-403f-898e-81486bd2b752/iso-11866-3-1997>



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 11866-3 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 11866-3 est particulièrement applicable aux échantillons supposés contenir un nombre relativement faible d'*Escherichia coli* présumés.

L'annexe A de la présente partie de l'ISO 11866 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 3:

Technique par comptage des colonies obtenues sur membranes à 44 °C

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 comptage des colonies 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 précurseur;
- 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 important d'*Escherichia coli* présumés (plus de 100 par gramme ou 10 par millilitre).

ATTENTION — Certaines espèces pathogènes d'*Escherichia coli* ne se développent pas à 44 °C.

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 6610:1992, *Lait et produits laitiers – Dénombrement des unités formant colonie de micro-organismes – Comptage des colonies à 30 °C.*

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 Définition

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, forment des colonies indole-positives (roses) caractéristiques sur membranes en acétate de cellulose appliquées sur gélose tryptonée biliée, dans les conditions prescrites dans la présente partie de l'ISO 11866.

4 Principe

Le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés nécessite quatre étapes successives.

4.1 Revivification

Ensemencement des membranes en acétate de cellulose appliquées sur gélose au glutamate modifiée avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère puis incubation à 37 °C pendant 4 h.

NOTE — Ce mode opératoire permet la revivification d'*Escherichia coli* présumés ayant été endommagés au cours d'un stockage dans des conditions de gel, de sécheresse ou de froid, ou endommagés par l'action de la chaleur ou par un traitement chimique. Il permet également la diffusion de concentrations élevées d'hydrates de carbone fermentescibles présents dans l'échantillon pour essai, ce qui évite leur interférence avec la formation d'indole au moment de l'isolement.

4.2 Isolement

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/6343c09c-5403-403f-898e-81486bd2b752/iso-11866-3-1997>

Après la revivification, transfert des membranes de la gélose au glutamate modifiée sur la gélose tryptonée biliée. Incubation à 44 °C pendant 18 h à 24 h.

4.3 Recherche

Mise en évidence de la présence sur la membrane d'*Escherichia coli* présumés par la formation d'indole à partir de chaque colonie.

4.4 Calcul

Calcul du nombre d'unités formant colonies (UFC) d'*Escherichia coli* présumés par gramme ou par millilitre d'échantillon à partir du nombre de colonies indole-positives obtenues sur les membranes à des niveaux de dilutions choisis afin de donner un résultat significatif.

5 Diluant, milieux 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 et réactif

5.3.1 Milieu de revivification: gélose au glutamate modifiée

5.3.1.1 Composition

Glutamate de sodium	6,35 g
Lactose	10,0 g
Formiate de sodium	0,25 g
L(-)Cystine	0,02 g
L(-)Acide aspartique	0,02 g
L(+)-Arginine	0,024 g
Thiamine	0,001 g
Acide nicotinique	0,001 g
Acide pantothénique	0,001 g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ .7H ₂ O)	0,100 g
Citrate ammoniacal de fer(III) ¹⁾	0,010 g
Chlorure de calcium dihydraté (CaCl ₂ .2H ₂ O)	0,010 g
Hydrogénophosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)	0,90 g
Chlorure d'ammonium	2,5 g
Agar-agar	12 g à 18 g ²⁾
Eau	1 000 ml

1) Teneur en fer au moins égale à 15 % (m/m).
2) Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

5.3.1.2 Préparation

Dissoudre le chlorure d'ammonium dans l'eau. Ajouter les autres composants et porter à ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,7 à 25 °C.

Répartir le milieu, par quantités de 100 ml, dans des récipients appropriés.

Stériliser à l'autoclave (6.1) réglé à 115 °C pendant 10 min.

5.3.1.3 Préparation des boîtes de gélose

Couler 12 ml à 15 ml de milieu refroidi à environ 45 °C dans les boîtes de Petri stériles (6.12) et laisser se solidifier. Les boîtes peuvent être conservées entre 0 °C et + 5 °C pendant 4 jours.

Juste avant l'emploi, sécher soigneusement les boîtes, de préférence avec le couvercle enlevé et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3) réglée à 50 °C pendant 30 min ou jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu.

NOTE — Il convient que la gélose soit suffisamment sèche pour éviter un excès d'humidité au cours des 15 min qui suivent l'étalement de l'inoculum (1 ml).

5.3.2 Milieu sélectif: gélose tryptonée biliée

5.3.2.1 Composition

Tryptone	20,0 g
Sels biliaires (purifiés)	1,5 g
Agar-agar	12 g à 18 g ¹⁾
Eau	1 000 ml

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

5.3.2.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau et porter à l'ébullition.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 7,2 à 25 °C.

Répartir le milieu, par quantités pouvant aller jusqu'à 500 ml, dans les récipients appropriés.

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

5.3.2.3 Préparation des boîtes de gélose

Couler 12 ml à 15 ml de milieu refroidi à environ 45 °C dans les boîtes de Petri stériles (6.12) et laisser se solidifier. Les boîtes peuvent être conservées entre 0 °C et + 5 °C pendant 4 jours.

Juste avant l'emploi, sécher soigneusement les boîtes de préférence avec le couvercle enlevé et avec la surface de la gélose tournée vers le bas, dans une étuve (6.3) réglée à 50 °C pendant 30 min ou jusqu'à disparition des gouttelettes à la surface du milieu.

5.3.3 Réactif pour la recherche de l'indole (réactif de Vracko et Sherris)

5.3.3.1 Composition

Diméthylamino-4 benzaldéhyde	5,0 g
Acide chlorhydrique, c(HCl) = 1 mol/l	100 ml

5.3.3.2 Préparation

Dissoudre le diméthylamino-4 benzaldéhyde dans l'acide chlorhydrique en chauffant si nécessaire. Le réactif peut être conservé à l'obscurité entre 0 °C et + 5 °C pendant 3 mois au maximum.

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 115 °C ± 1 °C et à 121 °C ± 1 °C.

Pour plus de détails, voir l'ISO 7218.

6.2 Incubateurs, réglables à 37 °C ± 1 °C et à 44 °C ± 0,5 °C.

- 6.3 **Étuve**, ventilée par convection, réglable à $50\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.
- 6.4 **Réfrigérateur** (pour la conservation des milieux et du réactif préparés), réglable entre 0 °C et 5 °C .
- 6.5 **Membranes en acétate de cellulose**, de $0,45\text{ }\mu\text{m}$ à $1,2\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre de pores et de 85 mm de diamètre.
- 6.6 **Lampe à ultraviolets (UV)** à ondes longues, de longueurs d'ondes comprises entre 360 nm à 366 nm , équipée d'un filtre approprié permettant de supprimer les radiations UV inférieures à 310 nm .
- 6.7 **Pincés stériles**, à extrémités arrondies, d'environ 12 cm de longueur.
- 6.8 **pH-mètre**, précis à $\pm 0,1$ unité de pH à 25 °C .
- 6.9 **Pipettes**, étalonnées spécialement pour l'usage bactériologique, de 1 ml de capacité nominale, graduées en $0,1\text{ ml}$ et dont l'orifice d'écoulement a un diamètre de 2 mm à 3 mm .
- 6.10 **Éprouvettes graduées**, pour la préparation des milieux et du réactif.
- 6.11 **Flacons ou fioles**, pour la stérilisation et la conservation des milieux de culture.
- 6.12 **Boîtes de Petri**, en verre ou en matière plastique, d'environ 90 mm ou d'environ 100 mm de diamètre.
- 6.13 **Étaleurs**, en plastique ou en verre, par exemple en forme de crosses de hockey fabriquées à partir d'une baguette en verre d'environ $3,5\text{ mm}$ de diamètre et de 20 cm de longueur, coudées à angle droit à environ 3 cm de l'une des extrémités et dont les extrémités coupées ont été polies par chauffage.

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 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

NOTE — S'il est nécessaire de vérifier que l'exigence de répétabilité est satisfaite (voir article 11), effectuer deux déterminations séparées selon 9.1 à 9.5.

9.1 Prise d'essai, suspension mère et dilutions

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

9.2 Revivification

9.2.1 À l'aide des pincés stériles (6.7), déposer aseptiquement une membrane en acétate de cellulose (6.5) sur la surface séchée de chacune des deux boîtes de gélose au glutamate modifiée (5.3.1.3); éviter d'emprisonner les bulles d'air sous les membranes. Aplatir les membranes avec précaution en utilisant un étaleur stérile (6.13).

À l'aide d'une pipette stérile (6.9), déposer au centre de chaque membrane, 1 ml d'échantillon pour essai ou de suspension mère. À l'aide d'un étaleur stérile (6.13), répartir l'inoculum de façon uniforme sur la surface de la membrane, en évitant de faire déborder l'inoculum de la membrane.

9.2.2 À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (6.9), ensemercer des volumes identiques des autres échantillons pour essai dilués ou des autres dilutions de la suspension mère sur les autres membranes, comme décrit en 9.2.1.

9.2.3 Laisser les boîtes ensemencées en position horizontale à température ambiante pendant environ 15 min jusqu'à ce que l'inoculum ne soit imprégné dans la gélose. Incuber les boîtes de Petri retournées à l'étuve (6.2) réglée à 37 °C pendant 4 h, avec la membrane/surface de la gélose au-dessus.

9.3 Transfert sur milieu sélectif et incubation

9.3.1 À l'aide des pinces stériles (6.7), transférer les membranes de la gélose au glutamate modifiée (5.3.1.3) sur des boîtes de gélose biliée tryptonée (5.3.2.3).

AVERTISSEMENT – La membrane humide adhère à la surface de la gélose. Éviter d'emprisonner des bulles d'air. Ne pas utiliser un étaleur.

9.3.2 Incuber les boîtes à l'étuve (6.2) réglée à 44 °C pendant 18 h à 24 h, avec la membrane/surface de la gélose au-dessus. Ne pas empiler les boîtes par plus de trois unités.

9.4 Recherche de la formation d'indole par les colonies développées sur les membranes

9.4.1 Étiqueter le couvercle de chaque boîte (9.3.2) pour les identifier.

9.4.2 À l'aide d'une pipette, déposer 2 ml de réactif pour la recherche de l'indole (5.3.3) dans un couvercle retourné placé horizontalement.

9.4.3 À l'aide de pinces stériles (6.7), soulever la membrane de la surface de la gélose correspondante et la déposer sur le réactif pour la recherche de l'indole. Si nécessaire, incliner le couvercle de façon que la totalité de la surface de la membrane soit imprégnée de réactif pour la recherche de l'indole. Après 5 min, retirer l'excès de réactif avec une pipette.

9.4.4 Les colonies indole-positives développent en quelques minutes une couleur rose. Si un enregistrement permanent est nécessaire, placer la membrane sous la lampe UV (6.6) pendant 30 min.

9.5 Dénombrement

Compter les colonies indole-positives (roses) sur les membranes contenant de préférence entre 10 et 150 colonies roses.

Pour les détails relatifs à la technique de comptage des colonies, voir l'ISO 6610.

10 Calcul et expression des résultats

10.1 Calcul

Calculer le nombre N d'UFC d'*Escherichia coli* présumés par gramme ou par millilitre de produit, à l'aide de l'équation suivante:

$$N = \frac{\sum a}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

où

- Σa est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives;
- n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution;
- n_2 est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution;
- d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

NOTE 1 Un taux de dilution de 10^{-2} signifie que 10^{-2} g ou 10^{-2} ml de l'échantillon pour essai non dilué (mais à l'état dilué) a été mis sur la boîte.

NOTE 2 La plus faible dilution est la dilution contenant la teneur la plus élevée en échantillon pour essai.

10.2 Expression des résultats

10.2.1 Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédant n'est pas modifié; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédant est augmenté d'une unité. Procéder de proche en proche jusqu'à ce que l'on ait deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat le nombre d'UFC d'*Escherichia coli* présumés par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits), exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9, multiplié par la puissance appropriée de 10.

(standards.iteh.ai)

10.2.2 Si les deux boîtes correspondant à l'échantillon pour essai (produits liquides) ou à la suspension mère (autres produits) contiennent moins de 10 colonies, reporter le résultat comme suit:

- moins de 10 UFC d'*Escherichia coli* présumés par millilitre (produits liquides);
- moins de $10 \times 1/d$ CFU d'*Escherichia coli* présumés par gramme (autres produits), où d est le taux de dilution de la solution mère.

10.2.3 S'il n'y a que des boîtes qui contiennent plus de 300 colonies, calculer un nombre estimé de boîtes ayant un dénombrement proche de 150 colonies et multiplier ce nombre par l'inverse de la valeur correspondant à la dilution la plus élevée.

Exprimer le résultat en tant que «nombre estimé d'unités formant colonie d'*Escherichia coli* présumés par gramme ou par millilitre».

10.3 Exemple de calcul

Un dénombrement d'*Escherichia coli* présumés à 44 °C a donné les résultats suivants:

- à la première dilution retenue (10^{-2}): 138 et 125 colonies;
- à la seconde dilution retenue (10^{-3}): 20 et 18 colonies.

$$N = \frac{\Sigma a}{(n_1 + 0,1n_2)d} = \frac{138 + 125 + 20 + 18}{[2 + (0,1 \times 2)]10^{-2}} = \frac{301}{0,022} = 13\ 680$$

En arrondissant le résultat comme spécifié ci-dessus (10.2.1), on obtient 14 000 ou $1,4 \times 10^4$ UFC d'*Escherichia coli* présumés par gramme ou par millilitre de produit.