
**Microbiologie des aliments — Méthode
horizontale pour la recherche et le
dénombrement d'*Escherichia coli*
présumés — Technique du nombre
le plus probable**

*Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for
the detection and enumeration of presumptive Escherichia coli — Most
probable number technique.*

iTeh STANDARDS PREVIEW
(standards.itih.ai)

[ISO 7251:2005](#)

<https://standards.itih.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-68aaa9ed708e/iso-7251-2005>



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 7251:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-68aaa9ed708e/iso-7251-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-68aaa9ed708e/iso-7251-2005>

© ISO 2005

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
4.1 Méthode de détection	2
4.2 Méthode de dénombrement	2
5 Diluant, milieux de culture et réactif	3
6 Appareillage et verrerie	5
7 Échantillonnage	5
8 Préparation de l'échantillon pour essai	6
9 Procédure	6
9.1 Méthode de détection	6
9.2 Méthode de dénombrement	7
10 Expression des résultats	8
10.1 Méthode de détection	8
10.2 Méthode de dénombrement	8
11 Rapport d'essai	8
Annexe A (normative) Table NPP	10
Bibliographie	13

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 7251 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 9, *Microbiologie*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 7251:1993), ainsi que l'ISO 11866-1:1997 et la FIL 170-1:1999.

Les Articles 4, 9 et 10 de l'ISO 7251:1993 ont fait l'objet d'une révision technique. Les modifications principales portent sur les points suivants:

- la température de la seconde incubation est de $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ (voir 4.2.5);
- la détection (9.1) et le dénombrement (9.2) d'*E. coli* présumés sont couverts;
- pour certains produits spécifiques, cinq tubes par dilution peuvent être utilisés (voir 9.2.2.1);
- certains produits (produits laitiers) peuvent gêner l'observation de la production de gaz (voir 9.1.2 et 9.2.2.5);
- se référer à l'ISO 7218 pour les calculs NPP (voir l'Article 10).

Introduction

En raison de la grande diversité des aliments entrant dans ce domaine d'application, la présente méthode horizontale peut ne pas être appropriée dans tous ses détails pour certains produits, et pour d'autres produits des méthodes différentes peuvent être utilisées. Néanmoins on peut s'attendre à ce que, dans tous les cas, tous les efforts seront faits pour appliquer, chaque fois que cela sera possible, cette méthode horizontale et qu'il sera fait recours à des dérogations que si cela est absolument nécessaire pour des raisons techniques.

Lorsque la présente Norme internationale sera révisée, il sera tenu compte de tous les renseignements disponibles à ce moment là, à savoir dans quelle mesure cette méthode horizontale aura été suivie et les raisons justifiant toute dérogation dans le cas de produits particuliers.

L'harmonisation des méthodes d'essai ne peut pas être immédiate et il existe peut-être déjà des Normes internationales et/ou des Normes nationales pour certains groupes de produits, lesquelles ne sont pas conformes à cette méthode horizontale. Dans le cas où des Normes internationales existent déjà pour le produit à contrôler, il convient qu'elles soient appliquées, mais il est souhaitable que lorsqu'elles seront révisées ces normes soient modifiées de façon à se conformer à la présente Norme internationale et que les seules divergences éventuelles restantes soient celles nécessaires pour des raisons techniques bien établies.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 7251:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-68aaa9ed708e/iso-7251-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-68aaa9ed708e/iso-7251-2005>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 7251:2005](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-68aaa9ed708e/iso-7251-2005>

Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et 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 la détection et le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés, au moyen de la technique de culture en milieu liquide avec calcul du nombre le plus probable (NPP) après incubation à 37 °C, puis à 44 °C. La présente Norme internationale est applicable

- aux produits pour l'alimentation humaine et animale, et
- aux échantillons d'environnement dans les domaines de la production et de la distribution des aliments.

AVERTISSEMENT — Certaines souches d'*Escherichia coli* pathogènes ne cultivent pas à 44 °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 (voir l'Article 10).

2 Références normatives

[ISO 7251:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-68aa9ed798e/iso-7251-2005)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c8ad2b32-b637-47bc-9241-68aa9ed798e/iso-7251-2005)

Les documents de référence suivants sont indispensables pour l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

ISO 6887-2, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 2: Règles spécifiques pour la préparation des viandes et produits à base de viande*

ISO 6887-3, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 3: Règles spécifiques pour la préparation des produits de la pêche*

ISO 6887-4, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 4: Règles spécifiques pour la préparation de produits autres que les produits laitiers, les produits carnés et les produits de la pêche*

ISO 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO 8261, *Lait et produits laitiers — Lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique*

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Guide général pour l'assurance de la qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

ISO/TS 11133-2, *Microbiologie des aliments — Guide pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 2: Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

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, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

3.2
dénombrement d'*Escherichia coli* présumés
nombre le plus probable d'*E. coli* par millilitre ou par gramme d'échantillon pour essai lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale

4 Principe

4.1 Méthode de détection

4.1.1 Inoculer un milieu d'enrichissement sélectif liquide avec une quantité déterminée de la suspension initiale de l'échantillon pour essai.

4.1.2 Incuber le tube à 37 °C pendant 48 h. Examiner la formation de gaz dans le tube après 24 h et 48 h.

4.1.3 Si le tube montre une opacité, un aspect trouble ou un dégagement gazeux, faire une subculture dans un tube contenant un milieu sélectif liquide (bouillon EC).

4.1.4 Le tube obtenu en 4.1.3 est incubé à 44 °C pendant 48 h. Examiner la formation de gaz après 24 h et 48 h.

4.1.5 Si un dégagement gazeux est noté dans le tube en 4.1.4, réaliser une subculture dans un tube contenant de l'eau peptonée exempte d'indole.

4.1.6 Le tube obtenu en 4.1.5 est incubé 48 h à 44 °C. Le tube est examiné pour la production d'indole résultant de la dégradation du tryptophane dans les constituants peptonés.

4.1.7 Les tubes, présentant une opacité, un aspect trouble ou un dégagement gazeux dans le milieu d'enrichissement sélectif liquide (4.1.1) et dont les sous-cultures ont produit du gaz dans le bouillon EC et de l'indole dans l'eau peptonée à 44 °C, sont considérés comme contenant *Escherichia coli* présumé. On donne les résultats «présence» ou «absence» d'*Escherichia coli* présumé dans x g ou x ml de produit.

4.2 Méthode de dénombrement

4.2.1 Trois tubes de milieu d'enrichissement sélectif double concentration sont inoculés avec une quantité déterminée de la suspension initiale.

4.2.2 Trois tubes de milieu d'enrichissement simple concentration sont inoculés avec une quantité déterminée de la suspension initiale.

Par ailleurs, dans les mêmes conditions, trois autres tubes de milieu simple concentration sont inoculés avec une quantité déterminée des dilutions décimales de la suspension initiale.

4.2.3 Les tubes de milieu simple et double concentration sont incubés à 37 °C pendant 48 h. Les tubes sont examinés pour la production de gaz après 24 h et 48 h.

4.2.4 Pour chaque tube double concentration présentant une opacité, un aspect trouble ou un dégagement gazeux et pour chaque tube simple concentration présentant une opacité, un aspect trouble ou un dégagement gazeux, réaliser une subculture dans un milieu sélectif liquide (bouillon EC).

4.2.5 Les tubes obtenus en 4.2.4 sont incubés à 44 °C pendant 48 h. Les tubes sont examinés pour la production de gaz après 24 h et 48 h.

4.2.6 À partir de chaque tube de milieu obtenu en 4.2.5 présentant un dégagement gazeux, faire une subculture dans un tube contenant de l'eau peptonée exempte d'indole.

4.2.7 Les tubes obtenus en 4.2.6 sont incubés 48 h à 44 °C. Les tubes sont examinés pour la production d'indole résultant de la dégradation du tryptophane dans les constituants peptonés.

4.2.8 Le nombre le plus probable d'*Escherichia coli* présumé est déterminé au moyen de la table NPP (voir l'Annexe A), d'après le nombre de tubes de milieu simple et double concentration dont les subcultures ont donné une production de gaz dans le bouillon EC et une production d'indole dans l'eau peptonée à 44 °C.

5 Diluant, milieux de culture et réactif

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

5.1 Diluant

En règle générale voir l'ISO 6887-1, mais pour les produits laitiers voir l'ISO 8261.

5.2 Bouillon au lauryl sulfate (milieu d'enrichissement sélectif)

5.2.1 Composition

	a) Milieu double concentration	b) Milieu simple concentration
Digestat enzymatique de tissus végétaux et animaux	40,0 g	20,0 g
Lactose	10,0 g	5,0 g
Monohydrogénophosphate de dipotassium (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
Eau	1 000 ml	1 000 ml

5.2.2 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 ± 0,2 à 25 °C.

Répartir les milieux par quantités de 9 ml dans des tubes de 16 mm × 160 mm (6.4) contenant des cloches de Durham (6.6) dans le cas du milieu simple concentration, et par quantités de 10 ml dans des tubes de

ISO 7251:2005(F)

18 mm × 180 mm ou 20 mm × 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.

5.3 Bouillon EC (milieu sélectif)

5.3.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	20,0 g
Lactose	5,0 g
Sels biliaires n° 3 ^a	1,5 g
Monohydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	4,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Eau	1 000 ml

^a Voir la Référence [1].

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 $6,8 \pm 0,2$ 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.

5.3.3 Contrôle de performance et assurance de la qualité du milieu

Se reporter à l'ISO/TS 11133-1 et à l'ISO/TS 11133-2 afin de tester la performance du milieu.

5.4 Eau peptonée sans indole

5.4.1 Composition

Digestat enzymatique de caséine	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Eau	1 000 ml

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 $7,3 \pm 0,2$ 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.

5.5 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 (ρ_{20} 1,18 à 1,19 g/ml)	25,0 ml

5.5.2 Préparation

Dissoudre le diméthylamino-4 benzaldéhyde dans l'alcool en chauffant doucement dans un bain d'eau maintenu entre 50 °C et 55 °C.

Refroidir et ajouter l'acide.

Mettre à l'abri de la lumière et conserver à 4 °C (voir l'ISO 7218).

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

NOTE Une préparation commerciale, prête à l'emploi, peut également être utilisée.

(standards.iteh.ai)

6 Appareillage et verrerie

NOTE 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, pouvant fonctionner entre 37 °C ± 1 °C et 44 °C ± 1 °C.

6.3 Bain d'eau, pouvant être maintenu à 44 °C ± 1 °C.

6.4 Tubes à essais, de 16 mm × 160 mm et 18 mm × 180 mm ou 20 mm × 200 mm environ.

6.5 Anses bouclées, en platine iridié ou en nickel/chrome, d'environ 3 mm de diamètre, ou **anses bouclées stériles à usage unique** de 10 µl approximativement.

6.6 Cloches de Durham, de dimensions appropriées pour leur utilisation dans les tubes à essais (6.4).

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

6.8 pH-mètre, ayant une résolution de 0,01 unité de pH et une exactitude de mesurage de ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

7 Échantillonnage

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