

NORME
INTERNATIONALE

ISO
11866-1

FIL
170-1

Deuxième édition
2005-12-01

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

Partie 1:

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/37651-5bea-4278-ba83-239eb69357e4/iso-11866-1-2005>



Numéros de référence
ISO 11866-1:2005(F)
FIL 170-1:2005(F)

© ISO et FIL 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 et la FIL déclinent 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 et les comités nationaux de la FIL. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central de l'ISO à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 11866-1:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-239eb69357e4/iso-11866-1-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-239eb69357e4/iso-11866-1-2005>

© ISO et FIL 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 soit de l'ISO soit de la FIL à l'adresse respective ci-après.

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

Fédération Internationale de Laiterie
Diamant Building • Boulevard Auguste Reyers 80 • B-1030 Bruxelles
Tel. + 32 2 733 98 88
Fax + 32 2 733 04 13
E-mail info@fil-idf.org
Web www.fil-idf.org

Publié en Suisse

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 11866-1|FIL 170-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette édition de l'ISO 11866-1|FIL 170-1 annule et remplace l'ISO 11866-2:1997, dont elle constitue une révision mineure. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-239eb69357e4/iso-11866-1-2005>

L'ISO 11866-1:1997 a été annulée et remplacée par l'ISO 7251:2005, *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'Escherichia coli présumés — Technique du nombre le plus probable*.

L'ISO 11866|FIL 170 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 avec utilisation de 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide (MUG)*
- *Partie 2: Technique par comptage des colonies obtenues sur membranes à 44 °C*

Avant-propos

La **FIL (Fédération internationale de laiterie)** est une fédération mondiale du secteur laitier avec un Comité National dans chacun de ses pays membres. Chaque Comité National a le droit de faire partie des Comités permanents de la FIL auxquels sont confiés les travaux techniques. La FIL collabore avec l'ISO pour l'élaboration de méthodes normalisées d'analyse et d'échantillonnage pour le lait et les produits laitiers.

Les projets de Normes internationales adoptés par les Équipes d'Action et les Comités permanents sont soumis aux Comités Nationaux pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 50 % au moins des Comités Nationaux votants de la FIL.

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. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 11866-1|FIL 170-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération internationale de laiterie (FIL). Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL.

L'ensemble des travaux a été confié au groupe d'experts mixte ISO/FIL/AOAC chargé des *Contaminants pathogènes* (E102), sous la conduite de sa présidente, Mme R. Lodi (IT).

Cette édition de l'ISO 11866-1|FIL 170-1 annule et remplace l'ancienne partie 2 de la FIL 170A:1999, dont l'ancienne partie 1 a été remplacée par l'ISO 7251:2005.

[ISO 11866-1:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-239eb69357e4/iso-11866-1-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-239eb69357e4/iso-11866-1-2005>

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

Partie 1:

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|FIL 170 spécifie 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 7251, étant donné que le temps d'incubation est réduit (omission de plusieurs étapes d'enrichissement).

Cette méthode est applicable aux (standards.iteh.ai)

- lait et produits laitiers liquides; [ISO 11866-1:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-1-2005)
- lait sec, lactosérum sucré sec, babeurre sec et lactose; <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-1-2005>
- 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 spécifiée dans la présente partie de l'ISO 11866|FIL 170 est la méthode recommandée pour les échantillons supposés contenir un nombre relativement faible d'*Escherichia coli* présumés et/ou autres coliformes 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|FIL 170 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 4831 s'appliquent pour le dénombrement des coliformes.

2 Références normatives

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 7218, *Microbiologie des aliments — Recommandations et règles générales pour les examens microbiologiques*

ISO 8261|FIL 122, *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*

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 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 spécifiées dans la présente partie de l'ISO 11866|FIL 170

3.2
coliformes
bactéries qui, à 30 °C fermentent le lactose avec production de gaz, lorsque l'essai est effectué selon la méthode spécifiée dans la présente partie de l'ISO 11866|FIL 170

4 Principe

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-339eb69357e4/iso-11866-1-2005>

4.1 Ensemencement de trois tubes de milieu sélectif liquide d'enrichissement 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.

4.2 Ensemencement de trois tubes de milieu sélectif liquide d'enrichissement 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 du milieu simple concentration 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 présumés, 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|FIL 122.

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|FIL 122.

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 × 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 × 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, $c(\text{NaOH}) \approx 0,5 \text{ mol/l}$

5.5.1 Composition

Hydroxyde de sodium	2 g
Eau	100 ml

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

ISO 11866-1:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/efc27651-5bea-4278-ba83-239eb69357e4/iso-11866-1-2005>

5.5.2 Préparation

Dissoudre l'hydroxyde de sodium dans l'eau.

6 Appareillage et verrerie

Voir l'ISO 7218 et l'ISO 8261|FIL 122 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.

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

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

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

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

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

6.6 Lampe à ultraviolets (UV) à ondes longues, de longueurs d'ondes comprises entre 360 nm et 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.

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

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

6.9 Homogénéisateur Vortex.

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 partie de l'ISO 11866|FIL 170. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707|FIL 50.

8 Préparation de l'échantillon pour essai

Préparer l'échantillon pour essai conformément à l'ISO 8261|FIL 122.

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|FIL 122.

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 [5.3.1.1 a)]. À l'aide d'une pipette stérile (6.8), 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 [5.3.1.1 b)]. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile (6.8), 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 (6.9). 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 h \pm 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 \pm 2 h.