

NORME
INTERNATIONALE

ISO
11866-2

FIL
170-2

Deuxième édition
2005-12-01

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

Partie 2:

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

iTeh STANDARD PREVIEW

Milk and milk products — Enumeration of presumptive Escherichia coli —

(standards.iteh.ai)

Part 2: Colony-count technique at 44 °C using membranes

[ISO 11866-2:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a31e81dd-2619-4281-8125-16b46117ca2b/iso-11866-2-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a31e81dd-2619-4281-8125-16b46117ca2b/iso-11866-2-2005>



Numéros de référence
ISO 11866-2:2005(F)
FIL 170-2:2005(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 11866-2:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a31e81dd-2619-4281-8125-16b46117ca2b/iso-11866-2-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a31e81dd-2619-4281-8125-16b46117ca2b/iso-11866-2-2005>

© 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 11866-2|FIL 170-2 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 11866-2|FIL 170-2 annule et remplace l'ISO 11866-3:1997, dont elle constitue une révision mineure. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a31e81dd-2619-4281-8125-16b46117ca2b/iso-11866-2-2005>

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 et 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 11866-2|FIL 170-2 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 11866-2|FIL 170-2 annule et remplace l'ancienne partie 3 de la FIL 170A:1999, dont l'ancienne partie 1 a été remplacée par l'ISO 7251:2005.

[ISO 11866-2:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a31e81dd-2619-4281-8125-16b46117ca2b/iso-11866-2-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a31e81dd-2619-4281-8125-16b46117ca2b/iso-11866-2-2005>

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

Partie 2: Technique par comptage des colonies obtenues sur membranes à 44 °C

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11866|FIL 170 spécifie 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 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 important d'*Escherichia coli* présumés (plus de 100 par gramme ou 10 par millilitre).

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

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 44 °C, forment des colonies indole-positives (roses) caractéristiques sur membranes en acétate de cellulose appliquées sur gélose tryptonée biliée, dans les conditions spécifiées dans la présente partie de l'ISO 11866|FIL 170

4 Principe

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

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) ^a	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 ^b
Eau	1 000 ml
^a Teneur en fer au moins égale à 15 % (fraction massique).	
^b 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.

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 tryptone biliée

5.3.2.1 Composition

Tryptone	20,0 g
Sels biliaires (purifiés)	1,5 g
Agar-agar	12 g à 18 g ^a
Eau	1 000 ml
^a 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, $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$	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 $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et à $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.
- 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.

7 Échantillonnage

ISO 11866-2:2005
standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a31e81dd-2619-4281-8125-16b46117ca2b/iso-11866-2-2005

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

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|FIL 122.