

NORME  
INTERNATIONALE

**ISO**  
**8261**

Première édition  
1989-07-01

---

---

**Lait et produits laitiers — Préparation des  
échantillons pour essai et des dilutions en vue  
de l'examen microbiologique**

**iTeh STANDARD PREVIEW**

*Milk and milk products — Preparation of test samples and dilutions for  
microbiological examination*  
(standards.iteh.ai)

ISO 8261:1989

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a2de45f-0d3c-42ed-a7e1-73e32a8fec99/iso-8261-1989>



Numéro de référence  
ISO 8261 : 1989 (F)

## 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 approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 8261 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 34, *Produits agricoles alimentaires*, conjointement avec la Fédération internationale de laiterie (FIL) et l'Association des chimistes analytiques officiels (AOAC) et sera également publiée par ces organisations.

© ISO 1989

Droits de reproduction réservés. 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

Imprimé en Suisse

## Introduction

La présente Norme internationale est basée sur l'ISO 6887 : 1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*. Les adaptations nécessaires aux pratiques des laboratoires de microbiologie de l'industrie laitière et les instructions spécifiques aux produits laitiers, particulièrement pour la préparation de l'échantillon, ont été introduites.

La question du ou des diluants à prescrire, a été un sujet important de discussion. Dans la présente Norme internationale, la solution peptone-sel, adoptée dans l'ISO 6887 a été mentionnée, de même que trois autres diluants couramment employés, du fait de leur emploi fréquent dans les laboratoires de microbiologie laitière.

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

[ISO 8261:1989](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a2de45f-0d3c-42ed-a7e1-73e32a8fec99/iso-8261-1989)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a2de45f-0d3c-42ed-a7e1-73e32a8fec99/iso-8261-1989>

Page blanche

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

ISO 8261:1989

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/2a2de45f-0d3c-42ed-a7e1-73e32a8fec99/iso-8261-1989>

# Lait et produits laitiers — Préparation des échantillons pour essai et des dilutions en vue de l'examen microbiologique

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit les directives générales pour la préparation

- des échantillons pour essai,
- des dilutions primaires, et
- des dilutions suivantes

en vue de l'examen microbiologique du lait et des produits laitiers.

## 2 Référence normative

La norme suivante contient des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, l'édition indiquée était en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 707 : 1985, *Lait et produits laitiers — Méthodes d'échantillonnage*.

## 3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

**3.1 dilution primaire (suspension mère) :** Suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser (ou de l'échantillon pour essai préparé à partir de ce produit) ait été mélangée, si nécessaire en utilisant un homogénéisateur et en observant des précautions appropriées (voir les notes de l'article 8), avec neuf fois la même quantité de diluant (voir article 5), en laissant les grosses particules se déposer, si elles existent.

NOTE — Il peut être nécessaire dans certains cas, notamment pour les produits donnant une suspension mère 1 + 9 très visqueuse ou trop épaisse, d'ajouter davantage de diluant. Dans d'autres cas, pour les

résultats d'essai en rapport avec certains critères de spécification, une dilution primaire plus concentrée que 1 + 9 peut être demandée. Il devra être tenu compte de ces facteurs dans la suite des opérations et/ou dans l'expression des résultats.

**3.2 dilutions décimales suivantes :** Suspensions, émulsions ou solutions obtenues en mélangeant un volume déterminé de la dilution primaire (3.1) avec neuf fois le même volume de diluant approprié (voir note en 3.1), et en répétant cette opération sur chaque dilution ainsi préparée jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'ensemencement des milieux de culture.

## 4 Principe

Préparation de la dilution primaire (suspension mère) (3.1) et, si nécessaire, des dilutions décimales suivantes (3.2) en vue de réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume, pour faciliter l'examen microbiologique.

## 5 Diluants

### 5.1 Composants de base

Pour améliorer la fidélité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation du diluant, des composants de base déshydratés ou une préparation complète déshydratée. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée avec un appareillage en verre, ou de l'eau déminéralisée. Elle doit être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai. Ceci doit être contrôlé périodiquement, en particulier dans le cas de l'eau déminéralisée.

NOTE — Des essais pour déterminer si l'eau convient pour les applications microbiologiques ont été publiés dans MARTIN, E.H. (éditeur), *Standard methods for the examination of dairy products*, 15<sup>ème</sup> édition, 1984, Washington D.C., USA : American Public Health Association.

Des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (à 0,1 mol/l environ) doivent être utilisées pour ajuster le pH des diluants, sauf spécifications contraires.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 8261:1989

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/73e32a8fbc99/iso-8261-1989>

## 5.2 Diluants pour emploi général

### 5.2.1 Solution peptone-sel

#### Composition

Peptone	1,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	8,5 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant, si nécessaire.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,1$  à 25 °C.

### 5.2.2 Solution de Ringer diluée au quart

#### Composition

Chlorure de sodium (NaCl)	2,25 g
Chlorure de potassium (KCl)	0,105 g
Chlorure de calcium, anhydre (CaCl <sub>2</sub> )	0,06 g
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	0,05 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre les sels dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $6,9 \pm 0,1$  à 25 °C.

### 5.2.3 Solution de peptone

#### Composition

Peptone	1,0 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre la peptone dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,0 \pm 0,1$  à 25 °C.

### 5.2.4 Solution tampon de phosphate

#### Composition de la solution mère

Dihydrogéné-orthophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	42,5 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre le sel dans 500 ml d'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,2 \pm 0,1$  à 25 °C, à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique à 1 mol/l.

Diluer à 1 000 ml avec de l'eau. Conserver cette solution mère au réfrigérateur.

Avant emploi, ajouter 1 ml de cette solution mère (à 20 °C) à 1 000 ml d'eau pour l'utiliser en tant que diluant.

## 5.3 Diluants pour emplois particuliers

### 5.3.1 Solution de citrate de sodium (pour fromage, fromage fondu et lait sec Hatmaker)

#### Composition

Citrate trisodique dihydraté (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	20,0 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant entre 45 °C et 50 °C.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de  $7,5 \pm 0,1$  à 25 °C.

### 5.3.2 Solution de monohydrogéné-phosphate de potassium (pour le fromage, le fromage fondu, la caséine acide, les poudres de caséine lactique, les caséinates, les poudres de lactosérums acides et la crème aigre)

#### Composition

Monohydrogéné-phosphate de potassium (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	20,0 g
Eau	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant entre 45 °C et 50 °C.

Ajuster le pH. Pour la dilution primaire de la caséine acide, de la caséine lactique et de la poudre de lactosérum acide, le pH après stérilisation, doit être de  $8,4 \pm 0,1$  à 25 °C. Pour les caséinates, les fromages, les fromages fondus et la crème aigre, il doit être de  $7,5 \pm 0,1$ .

NOTE — Il reste encore à établir le diluant qui convient le mieux pour la caséine présure.

## 5.4 Répartition, stérilisation et conservation du diluant

Répartir le diluant (5.2 ou 5.3) dans des fioles (6.4) pour la dilution primaire et dans des tubes à essais (6.5) pour les dilutions décimales (5.2) en quantités telles qu'après stérilisation, chaque fiole (6.4) contienne 90 ml (ou d'autres quantités demandées) et chaque tube à essais (6.5) contienne 9,0 ml de diluant ou un multiple de 9,0 ml (ou d'autres quantités demandées).

Boucher les tubes et les fioles.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min (un temps plus long peut être nécessaire pour des volumes plus importants).

Si le diluant n'est pas utilisé extemporanément, le conserver à l'obscurité entre 0 °C et 5 °C, pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de son volume ou de sa composition.

NOTE — Si l'on doit dénombrer plusieurs groupes de micro-organismes en utilisant des milieux de cultures différents, il peut être nécessaire de répartir tous les diluants (ou quelques-uns) en quantités supérieures à 9,0 ml. La dimension des tubes à essais et des fioles (6.5 et 6.4) doit être prévue en conséquence.

## 6 Appareillage et verrerie

NOTE — Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont similaires. La verrerie doit pouvoir résister à des stérilisations répétées et être chimiquement inerte.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

**6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)** (autoclave isolé ou intégré dans un système de préparation et de répartition de milieux).

Le matériel destiné à entrer en contact avec le diluant, l'échantillon pour essai, les dilutions, sauf s'il est livré stérile (appareillage en plastique) doit être stérilisé

a) soit au four, en le maintenant à une température de 170 °C à 175 °C pendant au moins 1 h;

b) soit à l'autoclave, en le maintenant à une température de 121 °C ± 1 °C pendant au moins 20 min.

Cependant, les pipettes ne doivent pas être stérilisées à l'autoclave, car l'humidité se condense sur les parois internes lors du refroidissement et affecte la précision du volume délivré.

## 6.2 Appareillage pour l'homogénéisation

Un des appareils suivants doit être utilisé :

a) homogénéisateur rotatif, dont la fréquence de rotation est comprise entre 8 000 min<sup>-1</sup> et 45 000 min<sup>-1</sup>, avec bols en verre ou en métal, munis de préférence de couvercles, et résistant aux conditions de stérilisation;

b) homogénéisateur de type péristaltique (stomacher), avec des sacs stériles en matière plastique.

NOTES — Les bols ou les sacs en plastique doivent avoir une capacité suffisante pour permettre de mélanger correctement l'échantillon avec la quantité appropriée de diluant. En général, le volume du récipient doit être égal à environ deux fois le volume de l'échantillon pour essai avec le diluant.

**6.3 Agitateur**, capable de mélanger 1 ml ou 2 ml de l'échantillon pour essai (cas des produits liquides) ou des dilutions décimales dans un tube de dimensions suffisantes, avec 9 ml ou 18 ml de diluant, afin d'obtenir une suspension homogène et dont le principe est basé sur un mouvement de rotation excentré du contenu des tubes à essais (par exemple, agitateur Vortex).

**6.4 Fioles**, ayant une capacité suffisante pour contenir, en laissant un espace libre suffisant pour permettre l'agitation, 90 ml de diluant utilisés pour la suspension mère, ou des multiples de 90 ml.

**6.5 Tubes à essais**, ayant une capacité suffisante pour contenir, en laissant un espace libre suffisant pour permettre l'agitation, 10 ml (ou un multiple de 10 ml, si nécessaire) de l'échantillon pour essai (s'il est liquide) ou de la dilution primaire (autres cas), ou des dilutions décimales suivantes.

**6.6 Pipettes** (bouchées avec du coton), ayant une capacité nominale de 1 ml et une ouverture d'écoulement de 1,75 mm à 3 mm de diamètre.

NOTE — N'utiliser que des pipettes non ébréchées et, quand cela est nécessaire, avec des graduations bien marquées pour les distinguer nettement du contenu.

**6.7 Pipettes graduées** (bouchées avec du coton), de relativement grande capacité, par exemple de 10 ml ou 20 ml.

**6.8 Billes de verre**, d'environ 6 mm de diamètre.

**6.9 pH-mètre**, à compensation de température, précis à 0,1 unité de pH.

**6.10 Balance**, de portée suffisante et précise à 1 % de la masse nette pesée.

**6.11 Bain d'eau**, réglable à 45 °C ± 1 °C.

**6.12 Bain d'eau**, réglable à 37 °C ± 1 °C.

## 7 Échantillonnage

Voir ISO 707.

## 8 Mode opératoire

### NOTES

1 Pour certaines recherches spécifiques (par exemple, *Salmonella*), des techniques spéciales ou des précautions peuvent être nécessaires. Pour ces cas, des techniques particulières sont mentionnées dans la norme pour la méthode en question.

2 Les opérations décrites en 8.1 et 8.2 ne doivent pas être effectuées à la lumière directe du soleil.

3 Il convient de prendre les précautions normales d'asepsie.

### 8.1 Préparation de l'échantillon pour essai et de la dilution primaire

Pour éviter d'endommager les micro-organismes par de brusques changements de température, la température du diluant pendant les opérations décrites ci-dessous doit être du même ordre que celle de l'échantillon pour essai, sauf spécifications contraires.

### 8.1.1 Lait et produits laitiers liquides

Agiter vigoureusement l'échantillon pour essai afin d'assurer une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes, en inversant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. Il faut éviter la formation de mousse ou bien la laisser se disperser. L'intervalle entre le mélange et le prélèvement de la prise d'essai ne doit pas dépasser 3 min.

Prélever 1 ml de l'échantillon pour essai à l'aide d'une pipette stérile (6.6) et l'ajouter à 9 ml de diluant (5.2) (ou 10 ml d'échantillon pour essai à 90 ml de diluant ou 11 ml à 99 ml).

Agiter cette dilution primaire (par exemple, 25 fois avec un mouvement de 300 mm en 7 s). On obtient alors la dilution  $10^{-1}$ .

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.2 Lait sec, poudre de lactosérum, babeurre en poudre et lactose

Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en le secouant de façon répétée par inversion. Si l'échantillon pour essai enfermé dans son emballage d'origine est trop plein pour permettre un mélange vigoureux, le transférer dans un récipient plus grand. Mélanger. Ouvrir le récipient, prélever la prise d'essai demandée à l'aide d'une spatule en procédant comme indiqué ci-dessous. Refermer immédiatement le récipient.

Chauffer au bain d'eau (6.11) une fiole contenant 90 ml d'un diluant adéquat (5.2 ou, si nécessaire, pour la poudre de lait Hatmaker 5.3.1 à un pH  $7,5 \pm 0,1$ ) à  $45 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ .

Peser 10 g de l'échantillon pour essai dans un récipient de verre approprié (par exemple, un bécher) et verser lentement la poudre dans la fiole de dilution contenant le diluant choisi. Sinon, peser 10 g de l'échantillon pour essai directement dans la fiole avec le diluant.

Afin de dissoudre, tourner lentement pour hydrater la poudre, puis agiter 25 fois la fiole pendant environ 10 s avec un mouvement d'environ 300 mm. On peut utiliser un homogénéisateur de type péristaltique [6.2 b)] comme autre moyen d'agitation.

Replacer la fiole dans le bain d'eau pendant 5 min, agiter occasionnellement.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

NOTE — Dans le but d'avoir une meilleure reconstitution, en particulier pour la poudre de lait Hatmaker, il peut être utile de se servir de billes de verre (6.8). Dans ce cas, il conviendra de les mettre dans les fioles avant stérilisation.

### 8.1.3 Fromage et fromage fondu

Soit peser 10 g de l'échantillon pour essai dans une capsule et les placer dans le récipient de l'homogénéisateur rotatif [6.2 a)] ou de l'homogénéisateur de type péristaltique [6.2 b)], soit peser directement 10 g de l'échantillon pour essai dans le récipient.

Lors de l'utilisation de l'homogénéisateur rotatif ou de l'homogénéisateur de type péristaltique, ajouter 90 ml de diluant (5.2,

5.3.1 ou 5.3.2 à pH  $7,5 \pm 0,1$ ). Mélanger jusqu'à ce que le produit soit complètement dispersé (1 min à 3 min). Dans le cas de l'homogénéisateur rotatif, opérer pendant un temps suffisant pour obtenir un total de 15 000 révolutions à 20 000 révolutions. Même avec l'homogénéisateur rotatif le plus lent, ce temps ne doit pas excéder 2,5 min. L'idéal est que la température de dispersion ne dépasse pas  $40 \text{ °C}$ , et en aucun cas elle ne doit être supérieure à  $45 \text{ °C}$ . Laisser la mousse se disperser.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.4 Caséine acide, caséine lactique et poudre acide de lactosérum

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans une capsule. Les placer dans une fiole de dilution munie de billes de verre (6.8) contenant 90 ml de diluant d'hydrogène-phosphate dipotassique (5.3.2) à pH  $8,4 \pm 0,1$  pour les caséines acide et lactique.

Laisser pendant 15 min à température ambiante, puis élever la température à  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  au bain d'eau (6.12).

Garder les fioles à  $37 \text{ °C}$  pendant 15 min et secouer vigoureusement par intervalles.

NOTE — Éviter l'emploi d'un homogénéisateur rotatif [6.2 a)] ou d'un homogénéisateur de type péristaltique [6.2 b)] à cause de la formation de mousse.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.5 Caséinates

Soit peser 10 g d'échantillon pour essai dans une capsule et les placer dans le récipient de l'homogénéisateur rotatif [6.2 a)] ou de l'homogénéisateur de type péristaltique [6.2 b)], soit peser 10 g d'échantillon pour essai directement dans le récipient. Ajouter 90 ml de diluant d'hydrogène-phosphate dipotassique (5.3.2) à pH  $7,5 \pm 0,1$  à température ambiante. Mélanger pendant environ 2 min. Dans le cas de l'homogénéisateur rotatif, opérer pendant un temps suffisant pour obtenir un total de 15 000 révolutions à 20 000 révolutions. Même avec l'homogénéisateur rotatif le plus lent, ce temps ne doit pas excéder 2,5 min.

Élever la température à  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  au bain d'eau (6.12). Transférer dans une fiole à dilution stérile, dans le cas de l'homogénéisateur rotatif.

Garder à  $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  pendant 15 min. Laisser la mousse se disperser avant de poursuivre.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.6 Beurre

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans un récipient et le placer dans le bain d'eau (6.11) à  $45 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ . Garder le récipient dans l'eau jusqu'à ce que l'échantillon soit juste fondu. Ajouter 90 ml de diluant (5.2). Mélanger. Cette opération est plus facilement réalisée dans l'homogénéisateur de type péristaltique [6.2 b)].

On peut également travailler uniquement sur la phase aqueuse pour la dilution, comme suit :



Prendre une prise d'essai de 50 g contenant environ 8 ml d'eau et ajouter 42 ml de diluant (5.2.3) réchauffé à 45 °C. Placer le récipient dans un bain d'eau (6.11) à 45 °C ± 1 °C jusqu'à ce que le beurre soit fondu. Bien mélanger et laisser séparer pendant 15 min, au maximum.

Si nécessaire, pour séparer les phases, placer l'échantillon pour essai fondu dans un tube à centrifuger stérile (ou faire fondre l'échantillon pour essai directement dans le tube), et centrifuger à une fréquence de rotation de 1 000 min<sup>-1</sup> à 2 000 min<sup>-1</sup>.

Prélever stérilement la phase grasse (supérieure) avec un tube stérile relié à une pompe à vide. Prélever la couche inférieure.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.7 Produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation)

Procéder comme indiqué pour le beurre (8.1.6) (première alternative), mais en utilisant un bain d'eau (6.12) à 37 °C ± 1 °C au maximum. La température de l'échantillon pour essai ne doit pas dépasser la température de ce bain d'eau.

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

### 8.1.8 Flans, desserts, lait fermenté et crème

Peser 10 g d'échantillon pour essai dans une fiole (6.4) contenant des billes de verre (6.8).

Pour les flans, les desserts et la crème douce ajouter 90 ml de diluant (5.2) et agiter pour disperser. Pour le lait fermenté et la crème acide utiliser le diluant 5.3.2 à pH 7,5 ± 0,1. On peut utiliser un homogénéisateur de type péristaltique (6.2 b)].

Préparer les dilutions suivantes selon 8.2.

## 8.2 Dilutions décimales suivantes

NOTE 1 — Dans le cas de la recherche de la présence ou de l'absence d'un micro-organisme dans 0,1 ml ou 0,1 g de produit, il n'est pas nécessaire de préparer les dilutions décimales.

Introduire avec une nouvelle pipette 1 ml de la dilution primaire (par exemple, 8.1.1 ou 8.1.2) dans un nouveau tube contenant 9 ml de diluant stérile (5.2) en évitant le contact de la pipette avec le diluant (voir notes de 3.1 et 5.4). Utiliser une nouvelle pipette pour chaque dilution.

Si de plus grands volumes doivent être utilisés, introduire 10 ml de la dilution primaire dans une fiole contenant 90 ml de diluant stérile (5.2) ou 11 ml de la dilution primaire à 99 ml de diluant stérile (5.2).

NOTE 2 — Dans la pratique courante, quand on exige une dilution 10<sup>-3</sup>, 1 ml de la dilution primaire devrait être ajouté à 99 ml de diluant stérile (5.2).

Mélanger soigneusement, soit par aspiration-refoulement, 10 fois, avec une nouvelle pipette, soit en utilisant un agitateur mécanique (6.3) pendant 5 s à 10 s pour obtenir la dilution 10<sup>-2</sup>. La vitesse de rotation doit être choisie de sorte que le liquide tournoyant affleure à 2 cm ou 3 cm du bord du récipient.

Si nécessaire, répéter ces opérations avec le diluant stérile (5.2) en utilisant la dilution 10<sup>-2</sup> et les suivantes pour obtenir les dilutions 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, etc., jusqu'à l'obtention du nombre approprié de micro-organismes par millilitre (voir article 4).

Lorsque 10 ml plus 90 ml ou 11 ml plus 99 ml ont été prélevés, agiter manuellement comme indiqué en 8.1.1.

## 8.3 Durée des opérations

Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la dilution primaire et le mélange des dilutions et des milieux (décrit selon les normes spécifiques) ne doit pas être supérieur à 15 min.