

NORME
INTERNATIONALE

ISO
8261

FIL
122

Deuxième édition
2001-06-15

**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**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Milk and milk products — General guidance for the preparation of test
samples, initial suspensions and decimal dilutions for microbiological
examination*
(standards.iteh.ai)

[ISO 8261:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fd2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fd2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001>



Numéros de référence
ISO 8261:2001(F)
FIL 122:2001(F)

© ISO et FIL 2001

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 8261:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fld2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fld2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001>

© ISO et FIL 2001

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.ch
Web www.iso.ch

Fédération Internationale de Laiterie
41 Square Vergote
B-1030 Bruxelles

Imprimé en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	vi
1 Domaine d'application.....	1
2 Références normatives.....	1
3 Termes et définitions.....	1
4 Principe.....	2
5 Diluants.....	2
5.1 Composants de base.....	2
5.2 Diluants d'emploi général.....	2
5.3 Diluants pour des besoins particuliers.....	4
5.4 Répartition, stérilisation et conservation du diluant.....	6
6 Appareillage.....	6
7 Échantillonnage.....	7
8 Mode opératoire.....	7
8.1 Généralités.....	7
8.2 Préparation de l'échantillon pour essai et de la dilution primaire.....	7
8.3 Dilutions décimales suivantes.....	11
8.4 Durée des opérations.....	11
Bibliographie.....	12

iTeh STANDARD PREVIEW
 (standards.iteh.ai)

[ISO 8261:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fd2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fd2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001>

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 3.

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 de la présente Norme internationale 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.

La Norme internationale ISO 8261 | FIL 122 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), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément par l'AOAC International.

La présente édition annule et remplace la première édition (ISO 8261:1989), dont elle constitue une révision technique.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fd2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001>

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 avec l'AOAC International 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.

La Norme internationale ISO 8261 | FIL 122 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), en collaboration avec l'AOAC International. Elle est publiée conjointement par l'ISO et la FIL, et séparément par l'AOAC International.

L'ensemble des travaux a été confié à l'Équipe d'Action mixte ISO/FIL/AOAC *Préparations d'échantillons et de dilutions pour examens microbiologiques* du Comité permanent chargé de *Méthodes microbiologiques d'analyse*, sous la conduite de son chef de projet, monsieur L.J.M. Maturin (US).

La présente édition annule et remplace la troisième édition (FIL 122C:1996).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 8261:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8f1d2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8f1d2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001>

Introduction

La présente Norme internationale est principalement basée sur l'ISO 6887-1. Les adaptations nécessaires à son utilisation par les laboratoires de microbiologie travaillant sur les produits laitiers et diverses instructions spécifiques en matière de produits laitiers ont été introduites.

La question du ou des diluants à utiliser a fait l'objet d'un long débat. Dans la présente Norme internationale, la solution peptone-sel ainsi que la solution d'eau peptonnée tamponnée, telles qu'utilisées dans l'ISO 6887-1, sont spécifiées. Pour une utilisation courante, trois autres diluants sont également indiqués du fait de leur emploi fréquent dans les laboratoires de microbiologie laitière. En outre, six diluants sont spécifiés pour une utilisation particulière dans les laboratoires de microbiologie laitière.

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

[ISO 8261:2001](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fd2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fd2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001>

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

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale donne des lignes directrices générales pour la préparation des échantillons pour essai, des dilutions primaires et des dilutions décimales, en vue de l'examen microbiologique du lait et des produits laitiers, y compris les aliments lactés pour nourrissons.

2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8fd2-cc1b-4bda-a17a-738e280e836201>

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons pour essai, 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 7218, *Microbiologie des aliments — Règles générales pour les examens microbiologiques.*

3 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les termes et définitions suivants s'appliquent.

3.1

suspension mère

dilution primaire

suspension, solution ou émulsion, obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée de produit à analyser (ou de l'échantillon préparé à partir de ce produit) a été mélangée, si nécessaire en utilisant un homogénéisateur et en observant les précautions appropriées, avec une quantité neuf fois plus grande de diluant, en laissant se déposer les particules grossières éventuellement présentes

NOTE 1 Il peut être nécessaire dans certains cas, notamment pour les produits donnant une dilution primaire 1 + 9 trop visqueuse ou trop épaisse, d'ajouter davantage de diluant. D'autre part, lorsque les résultats des essais doivent être reliés à certains critères de spécification, une dilution primaire d'une concentration supérieure à 1 + 9 peut être nécessaire. Il convient de tenir compte de ces facteurs pour les opérations ultérieures et/ou dans l'expression des résultats.

NOTE 2 La dilution primaire permet de satisfaire au mieux à l'exigence de moins de 10 micro-organismes par gramme. S'il s'avère souhaitable, dans le cas de dénombrements dans certains produits, de se situer au-dessous de ce seuil, on pourra utiliser de plus faibles quantités de diluant pour les suspensions. Cependant, il faut tenir compte du fait que l'inoculation de cette suspension risque d'entraîner un déséquilibre dans le rapport inoculum/milieu.

NOTE 3 Pour les précautions appropriées, voir 8.1.

NOTE 4 Pour des informations détaillées concernant les diluants, voir l'article 5.

3.2
dilutions décimales suivantes

suspensions, solutions ou émulsions obtenues en mélangeant un volume déterminé de la dilution primaire (3.1) avec un volume neuf fois plus grand de diluant, et en répétant cette opération sur chaque dilution ainsi préparée, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture

NOTE Voir 8.1.

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, afin de 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 instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Utiliser uniquement des réactifs de qualité analytique reconnue, sauf spécifications contraires, et de l'eau distillée ou déminéralisée ou de l'eau de pureté équivalente (voir l'ISO 7218).

Utiliser des solutions d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl) de molarité appropriée pour ajuster le pH des milieux afin de réduire le plus possible les variations de volume des milieux ainsi que leur composition; cela revient à dire que plus le volume du milieu sera faible, plus la molarité sera élevée.

5.2 Diluants d'emploi général

5.2.1 Solution peptone-sel

5.2.1.1 Composition

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

5.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant légèrement sur une plaque chauffante (6.13) si nécessaire. Ajuster le pH avec la solution appropriée (5.1), de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

5.2.2 Solution de Ringer diluée au quart

5.2.2.1 Composition

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

5.2.2.2 Préparation

Dissoudre les sels dans l'eau. Ajuster le pH avec la solution appropriée (5.1), de sorte qu'après stérilisation il soit de $6,9 \pm 0,2$ à 25 °C.

5.2.3 Solution de peptone

5.2.3.1 Composition

Peptone	1,0 g
Eau	1 000 ml

5.2.3.2 Préparation

Dissoudre la peptone dans l'eau. Ajuster le pH avec la solution appropriée (5.1), de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14a8f1d2-cc1b-4bda-a17a-64338ec380ee/iso-8261-2001>

5.2.4 Solution tampon phosphate

5.2.4.1 Composition

Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	42,5 g
Eau	1 000 ml

5.2.4.2 Préparation

Dissoudre le sel dans 500 ml d'eau. Ajuster le pH à l'aide de la solution appropriée (5.1), de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C. Diluer à 1 000 ml. Conserver la solution concentrée au réfrigérateur.

Ajouter 1 ml de la solution concentrée (à 20 °C) à 1 000 ml d'eau pour utilisation en tant que diluant.

5.3 Diluants pour des besoins particuliers

Ces diluants ne doivent être utilisés que pour la préparation des suspensions primaires.

5.3.1 Milieu de préenrichissement: eau peptonnée tamponnée

5.3.1.1 Composition

Peptone de digestat enzymatique de tissus d'animaux	10,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Hydrogénophosphate dodécahydrate disodique (Na ₂ HPO ₄ ,12H ₂ O)	9,0 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
Eau	1 000 ml

5.3.1.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en chauffant légèrement sur une plaque chauffante (6.13) si nécessaire. Ajuster le pH avec la solution appropriée (5.1), de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25 °C.

Ce diluant est recommandé si des tests pour la recherche de *Salmonella* ou de *Listeria monocytogenes* sont aussi à effectuer (voir l'ISO 6579).

5.3.2 Solution de citrate de sodium (pour fromage et poudre de lait Hatmaker)

5.3.2.1 Composition

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

5.3.2.2 Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant sur une plaque chauffante (6.13) à une température comprise entre 45 °C et 50 °C. Ajuster le pH avec la solution appropriée (5.1), de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,5 \pm 0,2$ à 25 °C.

5.3.3 Solution d'hydrogénophosphate dipotassique (pour fromage, poudre de lait Hatmaker, lait fermenté, caséinates, poudre de lactosérum acide et crème acide)

5.3.3.1 Composition

Hydrogénophosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)	20,0 g
Eau	1 000 ml

5.3.3.2 Préparation

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant sur une plaque chauffante (6.13) à une température comprise entre 45 °C et 50 °C. Pour la dilution primaire de la poudre de lactosérum acide, ajuster le pH avec la solution appropriée (5.1), de sorte qu'après stérilisation il soit de $8,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Pour le fromage, la poudre de lait Hatmaker, les laits fermentés, les caséinates et la crème acide, ajuster le pH avec la solution appropriée (5.1), de sorte qu'après stérilisation il soit de $7,5 \pm 0,2$ à 25 °C.

5.3.4 Solution d'hydrogénophosphate dipotassique, avec agent antimoussant (pour caséines acides, caséines lactiques et caséines-présure)

5.3.4.1 Composition

Hydrogéo-orthophosphate dipotassique (K ₂ HPO ₄)	20,0 g
Eau	1 000 ml

5.3.4.2 Composition de la solution concentrée d'agent antimoussant

Polyéthylèneglycol 2000 (BDH)	1 g
Eau	1 000 ml

5.3.4.3 Préparation

Dissoudre le sel dans de l'eau en chauffant à une température comprise entre 45 °C et 50 °C. Ajouter 1 ml de la solution concentrée d'agent antimoussant à 1 litre de la solution de K₂HPO₄. Ajuster le pH avec la solution appropriée (5.1), de sorte que, aussi bien pour la dilution primaire de caséine acide que pour celle de caséine lactique, le pH soit de 8,4 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation et que, pour la caséine-présure, le pH soit de 7,5 ± 0,2 à 25 °C après stérilisation.

5.3.5 Solution de tripolyphosphate (autre solution utilisée pour les caséines-présures posant des problèmes de solubilisation)

iTeh STANDARD PREVIEW
 (standards.iteh.ai)

5.3.5.1 Composition

Tripolyphosphate de sodium (Na ₃ O ₁₀ P ₃)	ISO 8261:2001 20,0 g
Eau	1 000 ml

5.3.5.2 Préparation

Dissoudre le sel dans 1 000 ml d'eau en chauffant légèrement sur une plaque chauffante (6.13), si nécessaire. Répartir la solution de tripolyphosphate dans les flacons à raison de 90 ml et les stériliser dans l'autoclave (6.1) réglé à 121 °C pendant 20 min. Le milieu peut être conservé à une température comprise entre 0 °C et + 5 °C pendant 1 mois au maximum.

5.3.6 Diluant à usage général avec α-amylase (pour les aliments pour nourrissons à hautes teneurs en amidon)

Ajouter 12,5 mg d'α-amylase (EC 3.2.1.1)¹⁾ ayant une activité spécifique d'environ 400 unités de surface²⁾ par milligramme à 225 ml de diluant à usage général (5.2). Ce diluant est utilisé pour 25 g de l'échantillon pour essai. Utiliser des quantités analogues de réactifs pour la préparation d'autres quantités d'échantillons pour essai (par exemple, pour 10 g d'échantillon, ajouter 5 mg d'α-amylase à 90 ml de diluant à usage général).

1) La référence EC se rapporte au numéro de la classification enzymatique fixé par le Comité «Nomenclature» de l'Union internationale de biochimie dans la Recommandation pour la nomenclature des enzymes (1978). Academic Press, New York, 1979.

2) Cette unité (souvent dénommée Unité internationale ou Unité standard) est définie en tant que la quantité d'enzyme capable de catalyser la transformation de 1 μmol de substrat par minute dans des conditions définies.