

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
6611

FIL  
94

Deuxième édition  
2004-10-15

---

---

**Lait et produits laitiers — Dénombrement  
des unités formant colonie de levures  
et/ou moisissures — Comptage des  
colonies à 25 °C**

*Milk and milk products — Enumeration of colony-forming units of yeasts  
and/or moulds — Colony-count technique at 25 °C*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 6611:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/97da8e30-e7f1-4342-8982-bc5dcc5ce7a9/iso-6611-2004)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/97da8e30-e7f1-4342-8982-  
bc5dcc5ce7a9/iso-6611-2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/97da8e30-e7f1-4342-8982-bc5dcc5ce7a9/iso-6611-2004)



Numéros de référence  
ISO 6611:2004(F)  
FIL 94:2004(F)

© ISO et FIL 2004

**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 6611:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/97da8e30-e7f1-4342-8982-bc5dcc5ce7a9/iso-6611-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/97da8e30-e7f1-4342-8982-bc5dcc5ce7a9/iso-6611-2004>

© ISO et FIL 2004

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://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](mailto:info@fil-idf.org)  
Web [www.fil-idf.org](http://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 6611|FIL 94 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.

Cette édition de l'ISO 6611|FIL 94 annule et remplace l'ISO 6611:1992, dont elle constitue une révision mineure.

## 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.

L'ISO 6611|FIL 94 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 du Comité permanent chargé de *l'énumération des levures et des moisissures dans les produits laitiers* (E34), sous la conduite de son chef de projet, Monsieur J.J. Devoyod (FR).

Cette édition de l'ISO 6611|FIL 94 annule et remplace l'IDF 94B:1990, dont elle constitue une révision mineure.

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/97da8e30-e7f1-4342-8982-bc5dcc5ce7a9/iso-6611-2004>

# Lait et produits laitiers — Dénombrement des unités formant colonie de levures et/ou moisissures — Comptage des colonies à 25 °C

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dénombrement des unités formant colonie (UFC) de levures et/ou moisissures dans le lait et les produits laitiers par la technique de comptage des colonies à 25 °C.

La méthode est applicable aux produits suivants:

- lait, produits laitiers liquides,
- lait sec, poudre de lactosérum non acide, babeurre en poudre, lactose,
- fromages,
- caséine acide, caséine lactique, caséine-présure,
- caséinates, poudre de lactosérum acide,
- beurre,
- produits laitiers congelés (y compris les glaces de consommation),
- flans, desserts, laits fermentés et crème.

NOTE La méthode n'est pas applicable à la détermination d'un très grand nombre de levures thermolabiles (dans le fromage frais). Dans ce cas, il est préférable d'utiliser la technique d'ensemencement en surface.

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

ISO 8261|FIL 122:2001, *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*

### 3 Termes et définitions

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

**3.1 levures et moisissures**  
micro-organismes qui, à 25 °C, forment des colonies dans un milieu sélectif selon la méthode spécifiée dans la présente Norme internationale.

### 4 Principe

**4.1** Ensemencement en profondeur d'un milieu de culture sélectif défini, coulé dans des boîtes de Petri avec une quantité spécifiée de l'échantillon pour essai, si le produit à examiner est liquide, ou une quantité déterminée de la suspension mère, dans le cas d'autres produits.

Préparation d'autres boîtes dans les mêmes conditions, en utilisant des dilutions décimales de l'échantillon pour essai ou de la suspension mère.

**4.2** Incubation des boîtes en aérobiose à 25 °C pendant 5 jours.

**4.3** Calcul du nombre d'unités formant colonie (UFC) et/ou de moisissures par gramme ou par millilitre d'échantillon, en se basant sur le nombre de colonies obtenues sur des boîtes choisies à des niveaux de dilution permettant d'obtenir un résultat significatif.

ITeH STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 5 Diluants et milieu de culture

Pour les pratiques courantes de laboratoire, voir l'ISO 7218.  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/97da8e30-e7f1-4342-8982-bc5dcc5ce7a9/iso-6611-2004>

#### 5.1 Composants de base

Voir l'ISO 8261 | FIL 122.

##### 5.1.1 Diluants

Pour les diluants d'emploi général et pour les diluants pour les besoins particuliers, voir l'ISO 8261 | FIL 122.

##### 5.1.2 Répartition, stérilisation et conservation des diluants

Voir l'ISO 8261 | FIL 122.

#### 5.2 Milieu à l'extrait de levure, dextrose, oxytétracycline et agar-agar

##### 5.2.1 Milieu de base

###### 5.2.1.1 Composants

Extrait de levure en poudre	5,0 g
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20,0 g
Agar-agar	10 g à 15 g <sup>a</sup>
Eau	900 ml
<sup>a</sup> Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.	

### 5.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants du milieu de base ou du milieu déshydraté en chauffant, si nécessaire.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6 à 25 °C.

Stériliser à l'autoclave (6.1) à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

### 5.2.2 Solution au chlorhydrate d'oxytétracycline

#### 5.2.2.1 Composants

Chlorhydrate d'oxytétracycline (C <sub>22</sub> H <sub>30</sub> O <sub>11</sub> ,HCl)	50 mg
Eau	50 ml

#### 5.2.2.2 Préparation

Dissoudre le chlorhydrate d'oxytétracycline dans l'eau. La solution doit être préparée juste avant l'emploi. Stériliser la solution par filtration.

### 5.2.3 Milieu complet

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

#### 5.2.3.1 Composants

Solution de chlorhydrate d'oxytétracycline	10 ml
Milieu de base	90 ml

#### 5.2.3.2 Préparation

Refroidir le milieu de base stérilisé (5.2.1) à 45 °C. Juste avant l'emploi, amener la solution de chlorhydrate d'oxytétracycline (5.2.2) à 45 °C et ajouter 10 ml de cette solution aseptiquement à 90 ml du milieu de base.

### 5.3 Milieu à l'extrait de levure, glucose, chloramphénicol et agar-agar

#### 5.3.1 Composants

Extrait de levure	5,0 g
Glucose (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	20,0 g
Chloramphénicol (C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,1 g <sup>a</sup>
Agar-agar	12 g à 15 g <sup>b</sup>
Eau	1 000 ml

<sup>a</sup> En vue d'obtenir une concentration finale de 100 µg/ml du milieu.

<sup>b</sup> Selon le pouvoir gélifiant de l'agar-agar.

### 5.3.2 Préparation

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

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de 6,6 à 25 °C.

Répartir le milieu gélosé dans des récipients de capacité appropriée (6.8).

Stériliser à l'autoclave (6.1) à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

## 6 Appareillage et verrerie

**ATTENTION — Le matériel destiné à entrer en contact avec l'échantillon pour essai, les diluants, les dilutions ou le milieu de culture doit être stérilisé conformément à l'ISO 8261 | FIL 122:2001, 6.1.**

Le matériel à usage unique est acceptable au même titre que la verrerie réutilisable, si ses spécifications sont adéquates.

Le matériel courant de laboratoire de microbiologie, le matériel nécessaire à la préparation des échantillons pour essais et aux dilutions, comme spécifié dans l'ISO 8261 | FIL 122, et notamment ce qui suit.

### 6.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

Voir l'ISO 7218.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

### 6.2 Étuve, réglable à 25 °C ± 1 °C.

### 6.3 Boîtes de Petri, de 90 mm à 100 mm de diamètre.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/97da8e30-e7f1-4342-8982-bc5dccc5ee7e9/iso-6611-2004>

### 6.4 Pipettes graduées, bouchées avec du coton, étalonnées pour délivrer 1 ml ± 0,02 ml ou 10 ml ± 0,2 ml ou 11 ml ± 0,2 ml.

### 6.5 Bain d'eau, réglable à 45 °C ± 1 °C.

### 6.6 Appareil de comptage de colonies, comportant un système d'éclairage avec fond noir, équipé d'une loupe d'un grossissement de ×1,5 et d'un compteur numérique mécanique ou électronique.

### 6.7 pH-mètre à température compensée, précis à ± 0,1 unité de pH à 25 °C.

### 6.8 Fioles ou flacons

Des fioles ou des flacons de culture munis de couvercle à vis en métal non toxique peuvent être utilisés.

## 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 Norme internationale. Une méthode d'échantillonnage recommandée est donnée dans l'ISO 707.

Dans les fromages affinés possédant une croûte de levure ou de moisissures, il peut s'avérer souhaitable d'exclure la croûte de l'échantillon pour l'analyse. Dans ce cas précis, la croûte peut être enlevée à l'aide d'un scalpel ou d'un couteau stérile, avant de procéder à l'échantillonnage.



## 8 Mode opératoire

### 8.1 Généralités

Afin d'améliorer la fidélité de la méthode, il est recommandé que la préparation des dilutions soit soigneusement normalisée. Les facteurs influant sur la fidélité sont les suivants:

- le type d'appareillage pour l'homogénéisation;
- le temps d'homogénéisation;
- le diluant;
- le temps de décantation des grosses particules;
- le temps d'agitation lors de la préparation des dilutions décimales.

**ATTENTION — Prendre les précautions courantes d'asepsie. Ne pas effectuer les opérations décrites en 8.2 et en 8.3 à la lumière directe du soleil.**

### 8.2 Préparation de l'échantillon pour essai et de la suspension mère

Voir l'ISO 8261|FIL 122.

### 8.3 Dilutions décimales suivantes

Voir l'ISO 8261|FIL 122.

### 8.4 Durée des opérations

Voir l'ISO 6887-1.

### 8.5 Ensemencement et incubation

**8.5.1** Prendre deux boîtes de Petri stériles (6.3). À l'aide d'une pipette stérile (6.4), transférer dans chaque boîte 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide ou 1 ml de la suspension mère dans le cas d'autres produits.

**8.5.2** Prendre deux autres boîtes de Petri stériles. À l'aide d'une nouvelle pipette stérile, transférer dans chacune des boîtes 1 ml de la dilution  $10^{-1}$  (produit liquide) ou 1 ml de la dilution  $10^{-2}$  (autres produits).

**8.5.3** Si nécessaire, recommencer cette opération avec les dilutions décimales suivantes.

**8.5.4** Couler dans chaque boîte de Petri environ 15 ml de gélose au chlorhydrate d'oxytétracycline (5.2) ou de gélose au chloramphénicol (5.3) à 45 °C, préalablement fondue et maintenue dans le bain d'eau (6.5).

**8.5.5** Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et le laisser se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.

**8.5.6** Il ne doit pas s'écouler plus de 15 min entre la préparation de la première dilution et le mélange de l'inoculum avec le milieu de culture.

**8.5.7** Préparer un nombre suffisant de boîtes témoins pour vérifier la stérilité.

**8.5.8** Après retournement des boîtes ainsi préparées (8.5.5), les placer à l'étuve (6.2) (tout en les gardant en position verticale) réglée à 25 °C pendant 5 jours.