



Norme internationale

ISO 29981

FIL 220

Produits laitiers — Dénombrement des bifidobacteria présumés — Technique par comptage des colonies

*Milk products — Enumeration of bifidobacteria — Colony-count
technique*

**Deuxième édition
2024-11**

iTeh Standards

(<https://standards.iteh.ai>)

Document Preview

[ISO 29981:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/edc7027e-7312-439c-83de-08179f3cb127/iso-29981-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/edc7027e-7312-439c-83de-08179f3cb127/iso-29981-2024>

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

ISO 29981:2024

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/edc7027e-7312-439c-83de-08179f3cb127/iso-29981-2024>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2024

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11

E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

International Dairy Federation
Silver Building • Bd Auguste Reyers 70/B
B-1030 Brussels
Tél.: + 32 2 325 67 40
Fax: + 32 2 325 67 41
E-mail: info@fil-idf.org
Web: www.fil-idf.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	vi
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
4.1 Généralités	2
4.2 Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales	2
4.3 Isolement et sélection pour confirmation	2
4.4 Confirmation	3
4.5 Calcul	3
5 Milieux de culture et réactifs	3
6 Matériel et consommables	3
7 Échantillonnage	4
8 Préparation de l'échantillon d'essai	4
9 Mode opératoire	4
9.1 Généralités	4
9.2 Préparation de la prise d'essai et de la dilution primaire	4
9.2.1 Produits laitiers en poudre (par exemple, préparations pour nourrissons), y compris ferments et cultures probiotiques déshydratées	4
9.2.2 Produits à base de lait fermenté non séché (par exemple, yaourt) et non fermenté (par exemple, laits pasteurisés)	4
9.3 Examen microscopique de la suspension mère ou de la dilution primaire (facultatif)	5
9.4 Préparation des séries de dilution décimale	5
9.5 Inoculation et incubation	5
9.6 Comptage des colonies	5
9.7 Confirmation	6
10 Expression des résultats	6
11 Validation de la méthode	6
11.1 Validation conformément à l'ISO 17468	6
11.2 Caractéristiques de performance	6
12 Rapport d'essai	7
13 Assurance qualité	8
Annexe A (normative) Logigramme du mode opératoire	9
Annexe B (normative) Milieux de culture et réactifs	10
Annexe C (informative) Caractéristiques de performance de la méthode	14
Bibliographie	16

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'ISO attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. L'ISO ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de brevet revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, l'ISO n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de propriété.

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir www.iso.org/avant-propos.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et par la Fédération internationale du lait (FIL). Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 29981 | FIL 220:2010), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Les principales modifications sont les suivantes:

- des diluants utilisables ont été ajoutés;
- la préparation de la prise d'essai et la dilution primaire dans le cas de produits laitiers en poudre ont été ajoutées;
- un nouveau milieu de culture, la gélose TOS, a été introduit;
- le stockage des plaques incubées a été inclus;
- l'expression des résultats a été modifiée afin d'être conforme à l'ISO 7218;
- des essais de performance des milieux de culture ont été introduits;
- les caractéristiques de performance, avec les résultats d'une étude interlaboratoires basés sur la méthode de cette deuxième édition, ont été incluses en tant qu'[Annexe C](#).

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse <https://www.iso.org/fr/members.html>.

ISO 29981:2024(fr)
FIL 220:2024:2024(fr)

La FIL (Fédération internationale du lait) est une organisation privée à but non lucratif qui représente les intérêts des divers acteurs de la filière laitière au niveau international. Les membres de la FIL sont organisés en comités nationaux, qui sont des associations nationales composées de représentants de groupes d'intérêt nationaux dans le secteur des produits laitiers, incluant des producteurs laitiers, des acteurs de l'industrie de transformation des produits laitiers, des fournisseurs de produits laitiers, des universitaires et des représentants des gouvernements/autorités chargées du contrôle des aliments.

L'ISO et la FIL collaborent étroitement sur toutes les activités de normalisation concernant les méthodes d'analyse et d'échantillonnage du lait et des produits laitiers. Depuis 2001, l'ISO et la FIL publient conjointement leurs Normes internationales en utilisant les logos et les numéros de référence des deux organisations.

La FIL attire l'attention sur le fait que la mise en application du présent document peut entraîner l'utilisation d'un ou de plusieurs brevets. La FIL ne prend pas position quant à la preuve, à la validité et à l'applicabilité de tout droit de brevet revendiqué à cet égard. À la date de publication du présent document, la FIL n'avait pas reçu notification qu'un ou plusieurs brevets pouvaient être nécessaires à sa mise en application. Toutefois, il y a lieu d'avertir les responsables de la mise en application du présent document que des informations plus récentes sont susceptibles de figurer dans la base de données de brevets, disponible à l'adresse www.iso.org/brevets. La FIL ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié tout ou partie de tels droits de propriété.

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Le présent document a été élaboré par le *Comité permanent sur d'analyse de la microbiologie laitière* de la FIL et le comité technique de l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*. Il est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

L'ensemble des travaux a été confié au groupe de projet mixte ISO/FIL (D09) du *Comité permanent sur les méthodes de microbiologie laitière*, sous la conduite de son chef de projet Masamichi Muto (JP).

ITeH Standards
Document Preview

[ISO 29981:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/edc7027e-7312-439c-83de-08179f3cb127/iso-29981-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/edc7027e-7312-439c-83de-08179f3cb127/iso-29981-2024>

Introduction

Les bifidobacteria sont des bacilles chimio-organotrophes non acido-résistants, non sporulés, à Gram positif, non mobiles et catalase-négatifs, qui produisent de l'acide acétique, de l'acide lactique et de l'acide formique. Le glucose est dégradé exclusivement et de manière caractéristique par le shunt fructose-6-phosphate dans lequel la fructose-6-phosphate phosphocétolase (F6PPK, EC 4.1.2.22) clive le fructose-6-phosphate en acétylphosphate et érythrose-4-phosphate.

De nombreux rapports montrent que les bifidobacteria ont diverses fonctions physiologiques et qu'ils sont largement utilisés dans les aliments, dans les produits laitiers tels que les yaourts, les préparations pour nourrissons et les laits en poudre, ainsi que dans les produits non laitiers tels que les ferments et cultures probiotiques. De nombreux produits contenant des bifidobacteria décrivent le nombre de cellules bactériennes sur l'étiquette du produit, ce qui constitue un indicateur majeur de la fonctionnalité. Une méthode précise de dénombrement des bifidobacteria, telle que celle présentée dans le présent document, est importante pour garantir le nombre de cellules bactériennes.

Les principales modifications techniques répertoriées dans l'Avant-propos, introduites dans le présent document par rapport à l'ISO 29981 | l'FIL 220:2010, sont considérées comme majeures (voir l'ISO 17468). Ces modifications techniques ont un impact majeur sur les caractéristiques de performance de la méthode.

iTeh Standards
(<https://standards.iteh.ai>)
Document Preview

[ISO 29981:2024](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/edc7027e-7312-439c-83de-08179f3cb127/iso-29981-2024)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/edc7027e-7312-439c-83de-08179f3cb127/iso-29981-2024>

Produits laitiers — Dénombrement des bifidobacteria présumés — Technique par comptage des colonies

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de dénombrement sélectif des bifidobacteria dans les produits laitiers en utilisant une technique par comptage des colonies à 37 °C dans des conditions anaérobies.

La méthode est applicable aux produits laitiers tels que les laits fermentés (par exemple, le yaourt) et non fermentés (par exemple, les laits pasteurisés, les laits écrémés, les concentrés de protéines de lactosérum), les poudres de lait et les préparations (par exemple, les préparations pour nourrissons, les préparations de suite pour nourrissons plus âgés, produits pour enfants en bas âge) où ces micro-organismes sont présents et viables, en combinaison avec d'autres bactéries lactiques ou seuls. La méthode s'applique également aux ferments et cultures probiotiques. Pour les critères de qualité proposés pour les produits laitiers, voir, par exemple, CXS 243-2003^[6].

Les bifidobacteria utilisés dans les produits laitiers appartiennent généralement aux espèces suivantes (par exemple, Références [7] et [10]):

- *Bifidobacterium adolescentis*;
- *B. animalis* subsp. *animalis*;
- *B. animalis* subsp. *lactis*;
- *B. bifidum*;
- *B. breve*;
- *B. longum* subsp. *infantis*;
- *B. longum* subsp. *longum*.

iTeh Standards

(<https://standards.iteh.ai>)

Document Preview

ISO 29981:2024

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/iso/edc7027e-7312-439c-83de-08179f3cb127/iso-29981-2024>

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 de la chaîne alimentaire — 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 6887-5, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 5: Règles spécifiques pour la préparation du lait et des produits laitiers*

ISO 7218, *Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences générales et recommandations pour les examens microbiologiques*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

3.1 bifidobacteria

micro-organismes anaérobies de la famille des *Bifidobacteriaceae*, généralement capables de se développer dans/sur la gélose TOS-MUP ou la gélose TOS en formant des colonies types et en présentant certaines caractéristiques à l'examen microscopique

Note 1 à l'article: La morphologie des colonies types de bifidobacteria dans/sur la gélose TOS-MUP et la gélose TOS est décrite en 9.6. L'examen microscopique et les autres essais de confirmation sont décrits en 9.7.

4 Principe

4.1 Généralités

Le dénombrement des bifidobacteria exige trois étapes successives telles que spécifiées à l'[Annexe A](#).

La gélose TOS-MUP contient l'antibiotique sel de lithium de mupirocine (MUP), qui inhibe la croissance de la plupart des bactéries lactiques couramment utilisées dans les produits tels que les laits fermentés et non fermentés (par exemple, les laits pasteurisés, le lait écrémé, le concentré de protéines de lactosérum), les laits en poudre et les préparations pour nourrissons, ainsi que les ferments et cultures probiotiques (voir Référence [8]).

En raison de la sélectivité prouvée de l'antibiotique MUP lorsqu'il est ajouté au milieu de base, il n'y a généralement pas de croissance des bactéries types du yaourt (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), des cultures mésophiles (par exemple, *Lactococcus lactis*), de *Lactobacillus acidophilus*, de *Lacticaseibacillus casei* et de *Lacticaseibacillus rhamnosus* sur le milieu spécifié. Cette propriété a été soumise à essai avec un nombre représentatif de souches et d'isolats de référence.

Pour le dénombrement des bifidobacteria à partir d'échantillons contenant uniquement des bifidobacteria, la gélose TOS avec ou sans l'antibiotique MUP peut être utilisée.

4.2 Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

Une dilution initiale et des dilutions décimales sont préparées à partir de l'échantillon d'essai.

4.3 Isolement et sélection pour confirmation

La gélose TOS-MUP ou la gélose TOS estensemencée avec une quantité déterminée de l'échantillon d'essai si le produit est liquide, ou de la suspension mère dans le cas d'autres produits. D'autres boîtes sont préparées dans les mêmes conditions, en utilisant des dilutions décimales de l'échantillon d'essai ou de la suspension mère.

Les boîtes sont incubées en anaérobiose à 37 °C pendant 72 h. Alternativement, si la taille de la colonie est suffisamment grande pour être comptée avec précision, elles peuvent être examinées après une incubation de 48 h.

4.4 Confirmation

Les colonies de bifidobacteria présumés peuvent être confirmées par un examen microscopique et/ou des essais appropriés (par exemple, test F6PPK, voir Références [11] et [14]).

La confirmation des bifidobacteria présumés par un examen microscopique est requise, mais est facultative dans le cas d'échantillons d'essai contenant uniquement des bifidobacteria.

4.5 Calcul

Le nombre de bifidobacteria par millilitre ou gramme de l'échantillon d'essai est calculé à partir du nombre de colonies types confirmées par boîte.

5 Milieux de culture et réactifs

Suivre les pratiques de laboratoire courantes conformément à l'ISO 7218. La composition des milieux de culture et des réactifs et leur préparation sont spécifiées à l'Annexe B. Pour les essais de performance des milieux de culture, suivre les procédures conformément à l'article B.5 et à l'ISO 11133.

6 Matériel et consommables

Le matériel jetable est une alternative acceptable à la verrerie réutilisable s'il possède des spécifications appropriées. Le matériel de laboratoire microbiologique habituel (voir ISO 7218) et, en particulier, le matériel suivant, doivent être utilisés.

6.1 Appareil de stérilisation à sec (étuve) ou de stérilisation humide (autoclave), tel que spécifié dans l'ISO 7218.

6.2 Autoclave, capable de fonctionner à une température de $115\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$ et équipé de cycles courts de chauffage et de refroidissement.

6.3 Matériel pour culture en atmosphère anaérobie, tel que spécifié dans l'ISO 7218, capable de fonctionner à une température de $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, fournissant une atmosphère anaérobie de fraction volumique de 5 % à 20 % de dioxyde de carbone; une fraction volumique d'environ 70 % à 90 % d'azote; avec une fraction volumique d'environ 10 % d'hydrogène (non obligatoire). Il convient que le mélange gazeux ne contienne pas plus d'une fraction volumique de 1 % d'oxygène.

6.4 Réfrigérateur (facultatif), capable de fonctionner à $5\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$.

6.5 Bains-marie, l'un pouvant être maintenu à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et l'autre pouvant être maintenu entre 44 °C et 47 °C .

6.6 Tubes à essai ou fioles stériles, de capacité appropriée. Des bouteilles ou des fioles avec des bouchons à vis en métal ou en plastique non toxiques peuvent être utilisées.

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

6.8 Pipettes stériles graduées ou pipettes automatiques, de capacités nominales de 25 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml.

6.9 Boîtes de Pétri-stériles, ventilées, d'un diamètre d'environ 90 mm.

6.10 Mélangeur péristaltique (stomacher), avec sacs stériles, éventuellement avec un dispositif de réglage de la vitesse et du temps, comme spécifié dans l'ISO 7218.

6.11 Microscope (facultatif), de préférence avec contraste de phase, et avec lames et lamelles, conformément à l'ISO 7218.

6.12 Matériel de comptage de colonies avec une loupe (facultatif), par exemple 8 fois à 10 fois, comme spécifié dans l'ISO 7218.

7 Échantillonnage

L'échantillonnage ne fait pas partie de la méthode spécifiée dans le présent document. Suivre la Norme internationale spécifique traitant du produit concerné. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique traitant de l'échantillonnage du produit concerné, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

Les techniques d'échantillonnage recommandées sont données dans l'ISO 707 | FIL 50 pour le lait et les produits laitiers.

Il est important que le laboratoire reçoive un échantillon représentatif du produit à l'étude. Il convient que l'échantillon n'ait été ni endommagé ni modifié au cours du transport ou du stockage.

8 Préparation de l'échantillon d'essai

Préparer l'échantillon d'essai à partir de l'échantillon de laboratoire conformément à la Norme internationale spécifique traitant du produit concerné: suivre les procédures spécifiées dans l'ISO 6887-1 et l'ISO 6887-5. S'il n'existe pas de Norme internationale spécifique disponible, il est recommandé que les parties concernées se mettent d'accord à ce sujet.

9 Mode opératoire (<https://standards.iteh.ai>)

9.1 Généralités

Prendre toutes les précautions nécessaires pour garantir que la préparation et l'examen des échantillons en laboratoire soient effectués dans des conditions aseptiques (voir l'ISO 7218).

Effectuer les procédures spécifiées de [9.2](#) à [9.5](#) mélangeant doucement, pour limiter l'exposition aux conditions aérobies telles que les bulles d'air.

9.2 Préparation de la prise d'essai et de la dilution primaire

9.2.1 Produits laitiers en poudre (par exemple, préparations pour nourrissons), y compris ferments et cultures probiotiques déshydratées

Suivre les procédures spécifiées dans l'ISO 6887-5 et les étapes mentionnées ci-dessous.

Chauffer les bouteilles de diluant au bain-marie ([6.5](#)) à 37 °C.

Masser le sac (à la main) pour dissoudre la prise d'essai. Puis mélanger dans un mélangeur péristaltique ([6.10](#)) pendant 2 min.

9.2.2 Produits à base de lait fermenté non séché (par exemple, yaourt) et non fermenté (par exemple, laits pasteurisés)

Suivre les procédures spécifiées dans l'ISO 6887-5 et les étapes mentionnées ci-dessous.

Bien mélanger le contenu du récipient d'échantillon fermé en le secouant et en le retournant à plusieurs reprises (de préférence 10 fois, avec un mouvement d'environ 300 mm, pendant 7 s environ). Si ce n'est pas possible, bien mélanger le contenu avec une spatule stérile ou similaire après ouverture de l'emballage pour obtenir des échantillons homogènes.