NORME INTERNATIONALE

ISO 19344

FIL 232

Première édition
2015-12-15

Lait et produits laitiers — Ferments lactiques, probiotiques et produits fermentés — Quantification de bactéries lactiques par cytométrie en flux

Milk and milk products — Starter cultures, probiotics and fermented products — Quantification of lactic acid bacteria by flow cytometry

Numéros de référence
ISO 19344:2015(F)
FIL 232:2015(F)

© ISO et FIL 2015



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO et FIL 2015, Publié en Suisse

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland
Tel. +41 22 749 01 11
Fax +41 22 749 09 47
copyright@iso.org
www.iso.org

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

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 et réactifs **3**
5.1 Généralités 3
5.2 Solution de peptone-sel 3
5.3 Diluants et réactifs pour les protocoles de coloration 3
5.3.1 Protocole A 4
5.3.2 Protocole B 5
5.3.3 Protocole C 5
6 Appareillage **6**
7 Échantillonnage **7**
8 Préparation de l'échantillon pour essai **7**
8.1 Généralités 7
8.2 Cultures lyophilisées 7
8.3 Cultures congelées 8
8.4 Produits laitiers fermentés 8
9 Mode opératoire **9**
9.1 Généralités 9
9.2 Coloration 9
9.2.1 Protocole A 9
9.2.2 Protocole B 9
9.2.3 Protocole C 10
9.3 Analyse par cytométrie en flux 10
9.3.1 Généralités 10
9.3.2 Instruments et réglages 11
9.4 Fenêtrage 12
9.4.1 Généralités 12
9.4.2 Protocole A 12
9.4.3 Protocole B 14
9.4.4 Protocole C 15
10 Calcul et expression des résultats **16**
11 Facteurs critiques affectant les résultats **18**
12 Fidélité **19**
12.1 Essai interlaboratoires 19
12.2 Répétabilité 19
12.3 Reproductibilité 19
13 Rapport d'essai **20**
Annexe A (informative) **Schéma des protocoles de coloration** **21**
Annexe B (informative) **Exemple de calcul de la dilution appropriée de l'échantillon** **23**
Annexe C (informative) **Essai interlaboratoires** **24**
Bibliographie **27**

© ISO et FIL 2015 – Tous droits réservés

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'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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou sur la liste ISO des déclarations de brevets reçues (voir www.iso.org/patents).

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 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'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: Avant-propos - Informations supplémentaires.

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 34, *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5, *Lait et produits laitiers*, et la Fédération Internationale du Lait (FIL). Le présent document est publié conjointement par l'ISO et la FIL.

© ISO et FIL 2015 – Tous droits réservés

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.

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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

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.

L'ISO 19344 | FIL 232 a été élaborée par le Comité permanent chargé des *Méthodes d'analyse pour les microorganismes du lait* de la Fédération internationale du lait (FIL) et par le Comité technique ISO/TC 34 *Produits alimentaires*, sous-comité SC 5 *Lait et produits laitiers*.

Les travaux ont été réalisés par le groupe de projet mixte ISO/FIL sur la *Quantification des bactéries lactiques par cytométrie en flux* du Comité permanent chargé des *Méthodes d'analyse pour les microorganismes du lait*, sous la conduite de son chef de projet, Dr Sandra Casani (DK).

© ISO et FIL 2015 – Tous droits réservés

Introduction

La quantification des bactéries lactiques est un facteur important dans l'évaluation de la qualité des ferments lactiques, des probiotiques et des produits laitiers fermentés. Les bactéries lactiques contenues dans ces produits peuvent être examinées selon différents principes méthodologiques, les techniques de numération sur plaque étant les plus traditionnelles et les plus couramment utilisées. Les techniques plus récentes comprennent la cytométrie en flux qui permet de déterminer les cellules en tant qu'unités actives et/ou totales. Les avantages de la cytométrie en flux comprennent une faible variation, une différenciation entre cellules actives et cellules totales et la possibilité d'une vitesse d'analyse élevée. De plus, la quantification et l'utilisation de la fraction de cellules actives par cellules totales est une caractéristique clé et un outil important de la cytométrie en flux pour évaluer l'adéquation d'une population de cellules donnée. Ceci est particulièrement intéressant pour certaines applications telles que l'optimisation du procédé de production et l'évaluation de la stabilité pendant la durée de conservation.

L'Organisation internationale de normalisation (ISO) et la Fédération Internationale du Lait (FIL) attirent l'attention sur le fait que la conformité au présent document peut impliquer l'utilisation de brevets relatifs au protocole de coloration C décrit dans le présent document.

Ni l'ISO ni la FIL ne prennent position en ce qui concerne la preuve, la validité et le domaine d'application de ces droits de propriété intellectuelle.

Les détenteurs de ces droits de propriété intellectuelle ont garanti à l'ISO et à la FIL qu'ils souhaitent négocier des licences gratuites ou à des conditions raisonnables et non discriminatoires avec les demandeurs sur tout le territoire couvert par les brevets. À cet égard, les déclarations des détenteurs de ces droits de propriété intellectuelle sont enregistrées avec l'ISO. Il est possible d'obtenir des informations auprès de:

Chr. Hansen A/S
Boege Alle 10-12
2970 Hoersholm
Denmark

L'attention est attirée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues autres que ceux identifiés ci-devant. Ni l'ISO ni la FIL ne sauraient être tenues pour responsables de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO (www.iso.org/brevets) et l'IEC (http://patents.iec.ch) tiennent à jour des bases de données de brevets concernant leurs normes, pouvant être consultées en ligne. Les utilisateurs sont invités à consulter les bases de données pour obtenir les informations les plus récentes sur les brevets.

© ISO et FIL 2015 – Tous droits réservés

Lait et produits laitiers — Ferments lactiques, probiotiques et produits fermentés — Quantification de bactéries lactiques par cytométrie en flux

AVERTISSEMENT — L'utilisation de la présente Norme internationale peut impliquer l'emploi de produits et la mise en œuvre d'opérations à caractère dangereux. La présente Norme internationale n'a pas pour objectif de traiter tous les problèmes de sécurité liés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de la présente Norme internationale d'établir, avant de l'utiliser, les procédures d'hygiène et de sécurité appropriées et de déterminer si certaines restrictions réglementaires s'appliquent.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode normalisée permettant de quantifier les bactéries lactiques actives et/ou totales et les souches probiotiques dans les ferments lactiques utilisés dans les produits laitiers, au moyen de la cytométrie en flux. La méthode s'applique également aux probiotiques utilisés dans les produits laitiers et aux produits laitiers fermentés, tels que les yaourts, contenant essentiellement des bactéries lactiques.

La présente Norme internationale ne s'applique pas à la différenciation taxonomique des bactéries. En raison de sa non-spécificité, la méthode peut quantifier d'autres bactéries que celles indiquées dans le domaine d'application de la présente Norme internationale, lorsqu'elles sont présentes dans l'échantillon. Cela peut conduire à une surestimation des dénombrements.

La concentration minimale de cellules bactériennes dans l'échantillon avant l'application de cette méthode normalisée dépend des taux de dilution utilisés dans chaque protocole. En général, on considère que 10^6 cellules par gramme ou ml se situent dans la plage minimale.

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à 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 6887-1:1999, *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 6887-5:2010, *Microbiologie des aliments — 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 des aliments — Exigences générales et recommandations*

ISO 7889 | FIL 117, *Yaourt — Dénombrement des micro-organismes caractéristiques — Technique de comptage des colonies à 37 °C*

ISO 15214, *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles — Technique par comptage des colonies à 30 °C*

3 Termes et définitions

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

© ISO et FIL 2015 – Tous droits réservés

3.1
bactérie lactique
bactérie Gram-positive, non mobile, non sporogène, catalase-négative, nitrate-réductase-négative et cytochrome-oxydase-négative, qui ne liquéfie pas la gélatine et ne produit pas d'indole

Note 1 à l'article: Une bactérie lactique présente un métabolisme fermentatif essentiellement saccharolytique. L'acide lactique est le principal produit final résultant de l'utilisation de glucides.

EXEMPLE Les bactéries lactiques importantes pour l'industrie laitière sont: *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc* et *Lactobacillus*.

3.2
souches probiotiques
microorganismes vivants qui, administrés en quantité suffisante, procurent un bénéfice pour la santé de l'hôte

EXEMPLE Les souches probiotiques importantes sont: *Bifidobacterium animalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus plantarum* et *Propionibacterium freudenreichii*.

Note 1 à l'article: Voir la Référence [1].

3.3
unités fluorescentes actives
UFA
événements dénombrés dans une fenêtre spécifique des caractéristiques de diffusion/fluorescence de cellules supposées vivantes, c'est-à-dire de cellules colorées par l'indicateur d'activité spécifique utilisé dans le protocole

3.4
unités fluorescentes non actives
n-UFA
événements dénombrés dans une fenêtre spécifique des caractéristiques de diffusion/fluorescence de cellules supposées mortes, c'est-à-dire de cellules endommagées dans une mesure telle qu'elles ne sont pas colorées par l'indicateur d'activité spécifique utilisé dans le protocole

3.5
unités fluorescentes totales
UFT
somme de UFA et n-UFA

3.6
% d'unités fluorescentes actives
% UFA
rapport en pourcentage de UFA à UFT

4 Principe

4.1 Une prise d'essai ou un échantillon pour essai est préparé(e) et dilué(e) si nécessaire.

4.2 Les suspensions initiales, et/ou dilutions si nécessaire, sont colorées conformément à l'un des trois protocoles suivants, selon l'objet de la coloration des cellules fluorescentes, afin de différencier les unités fluorescentes actives et totales:

a) double coloration ciblant les acides nucléiques par le colorant fluorescent rouge, non perméant, iodure de propidium (PI), et l'activité enzymatique intracellulaire basée sur le clivage des isomères mixtes de diacétate de 5(6)-carboxyfluorescéine (cFDA) en carboxyfluorescéine fluorescente verte par les estérases intracellulaires;

© ISO et FIL 2015 – Tous droits réservés