

NORME INTERNATIONALE

ISO
8784-1

Première édition
1987-02-01



INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION
МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ

**Papier et carton — Détermination des propriétés
microbiologiques —**

**Partie 1:
Dénombrement bactériologique total**

(standards.iteh.ai)

Paper and board — Determination of microbiological properties —

[ISO 8784-1:1987](#)

Part 1: Total bacterial count [standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7688f36-25dd-46c2-9271-57e8a0d4e28a/iso-8784-1-1987](#)

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 normalement 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.

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 8784-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 6, *Papiers, cartons et pâtes*.

[ISO 8784-1:1987](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e768836-25dd-46c2-9271-57e84674e28a/iso-8784-1-1987)

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

Papier et carton — Détermination des propriétés microbiologiques —

Partie 1 : Dénombrement bactériologique total

0 Introduction

La présente partie de l'ISO 8784 pour l'examen bactériologique du papier et du carton est fondée en gros sur l'ISO 4833 en donnant des précisions particulières lorsque cela s'avère nécessaire. Il est prévu de ne prendre en considération que la teneur totale en bactéries sans chercher à isoler des souches ayant une importance pour la santé publique.

Compte tenu de la particularité des techniques en bactériologie, on ne peut attendre de résultats reproductibles qu'avec un personnel qualifié. De plus, du personnel non qualifié peut s'exposer à des risques pour la santé.

1 Objet et domaine d'application

La présente partie de l'ISO 8784 spécifie une méthode de détermination de la population bactérienne totale des papiers et des cartons (c'est-à-dire toutes les bactéries présentes à la fois sur et dans la feuille de papier ou de carton). Elle est applicable à la plupart des papiers et des cartons, particulièrement les classes aliments.

La méthode ne convient pas à des matériaux tels que le papier sulfurisé ou le papier résistant à l'état humide qui ne peuvent pas être entièrement désintégrés.

2 Références

ISO 186, *Papier et carton — Échantillonnage pour déterminer la qualité moyenne.*

ISO 4833, *Microbiologie — Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes — Méthode par comptage des colonies obtenues à 30 °C.*

3 Définition

Dans le cadre de la présente partie de l'ISO 8784, la définition suivante est applicable :

dénombrement bactériologique total : Nombre total de colonies bactériennes qui se sont formées dans un milieu de culture étalon après incubation dans des conditions spécifiées.

4 Principe

Préparation de boîtes de culture à partir de dilutions spécifiées de papier ou de carton dans un milieu de culture spécifié. Incubation des boîtes à l'air pendant 72 h à 30 °C et calcul du nombre de bactéries par gramme d'échantillon à partir du nombre de colonies comptées dans les boîtes choisies et du facteur de dilution.

5 Matériaux

5.1 Alcool éthylique, méthylique ou isopropylique, pour désinfecter les instruments.

5.2 Tampons en coton non absorbant ou tampons jetables.

5.3 Milieu de culture : mélange tryptone-glucose-agar pour comptage des bactéries. Ce milieu de culture existe sous forme déshydratée. La formule est donnée dans l'annexe.

Si on ne peut se procurer ce mélange, on peut utiliser le mélange agar-agar pour comptage ou tout autre milieu. L'utilisation d'un mélange autre que le mélange tryptone-glucose-agar doit être mentionnée dans le procès-verbal d'essai.

5.4 Diluant : on préférera la solution de Ringer mais on peut utiliser toute solution isotonique.

Le choix d'une solution autre que la solution de Ringer doit être mentionné dans le procès-verbal d'essai. On ne peut utiliser de solutions différentes au cours du même essai. La formule de la solution de Ringer est donnée dans l'annexe.

6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et

6.1 Balance, précise à 0,1 g, munie d'un plateau assez large pour recevoir une boîte de Petri.

6.2 Appareil de comptage des colonies, comportant à la base un système d'éclairage à fond noir équipé d'une lentille grossissant au moins 1,5 fois. Il peut être nécessaire de s'aider d'une loupe afin d'augmenter le grossissement jusqu'à 8 ou 10 fois pour faciliter le comptage des colonies de bactéries.

6.3 Désintégrateurs, à cuve en métal ou en verre d'une capacité d'environ 500 ml, munis d'une hélice tournant à grande vitesse ou de tout autre système permettant de déchiqueter le papier ou le carton. Mettre un capuchon en papier ou en feuille d'aluminium sur le bouchon de chaque cuve avant de la porter à la stérilisation.

6.4 Incubateur, pouvant être réglé à 30 ± 1 °C.

6.5 pH-mètre.

6.6 Autoclave pour stérilisation à la vapeur, pouvant travailler à 120 °C sous 100 kPa*.

6.7 Étuve, munie d'un thermomètre, pouvant être maintenue à 165 ± 2 °C pendant 3 h.

6.8 Équipement permettant le flambage (lampe à alcool ou bec Bunsen).

6.9 Couteau, de préférence un scalpel à lame jetable pour découper le papier ou le carton.

6.10 Flacons pour diluer, de 250 ml à goulot étroit : bouteilles en verre ou en matière plastique fermées à vis ou à l'aide de bouchons en caoutchouc d'Escher.

6.11 Récipients pour échantillons secs, convenables pour la stérilisation.

NOTE — Des récipients en plastique ou en verre conviennent mais des enveloppes en papier sont préférables. Utiliser deux enveloppes, l'une à l'intérieur de l'autre. La grande enveloppe peut avoir comme dimensions 230 mm × 300 mm et la petite 160 mm × 240 mm. Elles devraient être en papier kraft épais résistant à la stérilisation dans une étuve à air chaud sans présenter de fragilisation, ni engendrer de sous-produits toxiques. Après l'opération de stérilisation, coller la patte de l'enveloppe extérieure avec un adhésif ou un ruban adhésif sensible à la pression.

6.12 Fioles : fioles coniques ou bouteilles fermées à vis pouvant contenir des produits stériles.

6.13 Boîtes de Petri, de préférence 100 mm × 15 mm.

6.14 Pipettes, bulbe de pipette (aspirateur) et récipients. Pipettes de Mohr graduées de 10 ml. La pipette de Mohr de 10 ml, dont le bout a été coupé pour donner une ouverture de 3 mm, est celle qui convient le mieux pour mesurer des suspensions de fibres ; des pipettes de 10 ml pour sérologie conviennent également. Des pipettes de Mohr spéciales calibrées à partir de la plus grosse extrémité conviennent et sont à préférer aux pipettes de Mohr classiques. Elles doivent être placées dans des boîtes métalliques ou enveloppées de papier kraft épais résistant à la stérilisation.

Des seringues de taille convenable avec des pipettes non réutilisables conviennent également.

Toutes les pipettes doivent être bouchées avec du coton côté succion avant d'être stérilisées.

6.15 Ciseaux, de préférence avec un côté coupant de 100 mm à 160 mm.

6.16 Pincés, permettant de manipuler des échantillons de papier ou de carton.

7 Stérilisation du matériel

Selon la nature du matériel à stériliser, procéder selon l'une des trois méthodes suivantes.

7.1 Stérilisation à la vapeur (autoclave)

Stériliser le matériel ci-après à 120 °C pendant 20 min sous 100 kPa :

- cuves du désintégrateur (6.3) ;
- milieux de culture (5.3) ;
- bouteilles pour échantillon ;
- solution pour dilution (5.4) ;
- pincés (6.16) ;
- ciseaux (6.15).

7.2 Stérilisation à la chaleur sèche

Stériliser le matériel ci-après à 165 ± 2 °C pendant 3 h :

- enveloppes en papier kraft (6.11) ;
- pipettes (6.14) ;
- scalpels (6.9).

NOTE — Les pipettes doivent être parfaitement sèches avant d'être stérilisées. On évitera de laisser roussir les enveloppes.

7.3 Flambage

Laisser les ciseaux, pincés, scalpels et autres instruments dans l'alcool (5.1). Les retirer de l'alcool au moment de l'emploi, les laisser égoutter et brûler (voir 6.8) l'alcool restant.

8 Échantillonnage

8.1 Choisir un nombre d'échantillons représentatif du lot de papier ou de carton soumis à l'essai, selon l'ISO 186. Suivre la fréquence d'échantillonnage selon l'ISO 186.

NOTE — Un échantillon peut contenir plus d'une feuille de papier ou de carton.

* 100 kPa = 1 bar

8.2 Utiliser soit une enveloppe stérile, soit deux enveloppes stériles, l'une à l'intérieur de l'autre, pour chaque échantillon (voir la note de 6.11). Pour chaque lot, découper plusieurs épaisseurs de papier ou de carton et les retirer afin d'éliminer la contamination en surface. À l'aide d'un scalpel (6.9) stérile, trancher parallèlement au bord du rouleau ou de la balle sur plusieurs épaisseurs, puis effectuer une seconde entaille parallèle. Pratiquer alors une entaille à angle droit rejoignant le bas des deux entailles précédentes. Découper en écartant la feuille du dessus. Ouvrir avec précaution l'enveloppe stérile et y glisser les échantillons de papier ou de carton. Réaliser une entaille horizontale en haut de la patte de l'enveloppe à environ 200 mm du bas et faire glisser les échantillons dans l'enveloppe intérieure. Fermer l'enveloppe extérieure avec un adhésif ou un ruban adhésif sensible à la pression. Les échantillons devraient avoir environ 100 mm × 200 mm de dimensions.

9 Préparation de l'échantillon pour essai

Mettre une boîte de Petri vide (6.13) sur le plateau de la balance (6.1) et déterminer la tare. Couper l'enveloppe renfermant les échantillons (8.2) le long de la patte supérieure, avec un scalpel (6.9) stérile ou des ciseaux (6.15). Ouvrir l'enveloppe en pressant les faces sans toucher à la surface intérieure et retirer l'échantillon à l'aide des pinces (6.16) stériles. En tenant avec une pince le bord des échantillons, découper puis éliminer les bords à l'aide de ciseaux stériles. Réaliser des découpes à 10 ou 20 mm l'une de l'autre, parallèlement à un côté de l'échantillon. Faire basculer le couvercle de la boîte de Petri précédemment tarée mais le laisser sur la balance. Couper des carrés de papier ou de carton et les laisser tomber dans la boîte de Petri, réalisant des découpes perpendiculaires à celles qui ont été réalisées comme décrit ci-dessus. Couper suffisamment de papier ou de carton pour obtenir environ 2,0 g d'échantillon. Remettre en place le couvercle de la boîte de Petri. Peser l'ensemble boîte et papier. Par différence avec la tare, on obtient la masse exacte de la prise d'essai.

10 Mode opératoire

10.1 Désintégration

Vider l'échantillon de 2,0 g de papier ou de carton dans une cuve stérile du désintégrateur (6.3) avec 200 ml de solution de Ringer (5.4) stérile également afin d'obtenir une concentration fibreuse de 1,0 %. Utiliser une cuve stérile par échantillon. Lorsqu'on ajoute le papier, le carton ou le diluant dans la cuve, ne pas toucher le bouchon métallique avec les doigts mais le soulever par l'intermédiaire du capuchon de papier que l'on y a posé avant de porter à la stérilisation. Soulever en même temps le capuchon et le bouchon métallique mais juste assez pour accéder à la cuve. Lorsqu'on passe plusieurs échantillons dans le même désintégrateur, refroidir la solution de Ringer afin d'éviter que la température ne dépasse 45 °C dans la cuve. Laisser le capuchon de papier sur le bouchon afin de prévenir toute contamination lorsqu'on ouvre ou qu'on touche la cuve.

10.2 Ensemencement et incubation

La pièce dans laquelle on pèse et enseme les échantillons doit être exempte de courants d'air et de poussière. Environ 30 min avant l'ensemencement, nettoyer la paillasse avec un désinfectant ad hoc.

Verser la suspension immédiatement après la désintégration (10.1). (Voir note 1.)

Répartir environ 10 ml de la suspension correspondant à 0,1 g de papier ou de carton à l'aide d'une pipette de 10 ml à large orifice (6.14) dans cinq boîtes de Petri (6.13) en quantités à peu près égales. Préparer et ensemer d'autres dilutions à plus faible concentration de la suspension à 1 % si on suppose que l'échantillon présente une forte concentration en bactéries. On recommande comme dilutions pour l'ensemencement: 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} (voir notes 2 et 3).

En moins de 5 min, ajouter à chaque boîte 15 à 20 ml du milieu de culture (5.3) choisi refroidi à environ 45 °C.

Immédiatement après l'addition du milieu de culture à l'échantillon dilué dans la boîte de Petri, agiter pour rompre les amas de fibres et pour obtenir une distribution à peu près égale des fibres dans le milieu de culture. Il est important que tous les amas soient désintégrés afin que l'examen soit plus facile et plus précis. Préparer une boîte de contrôle avec seulement de la solution de Ringer et du milieu de culture afin de vérifier leur état stérile en l'absence d'une éventuelle contamination due à l'air.

Agiter les boîtes inoculées, les poser sur une surface horizontale et laisser durcir. Les retourner ensuite et les placer dans l'incubateur (6.4). Les laisser à 30 ± 1 °C pendant 72 h.

NOTES

1 Dans certains cas, une mousse considérable peut se former, auquel cas il est nécessaire de laisser la mousse se séparer de la suspension avant l'ensemencement. Lorsque de tels cas se produisent, le capuchon et le bouchon doivent rester sur la cuve afin de maintenir la stérilité.

2 Lorsqu'il est nécessaire de disposer de plus fortes dilutions du broyat de l'échantillon, par exemple une dilution à 10^{-1} , ajouter 10 ml de la suspension à 1 % à 90 ml de diluant stérile et répartir 10 ml de cette suspension dans cinq boîtes de Petri qui contiendront alors chacune 0,01 g de papier ou de carton. On peut également préparer de plus fortes dilutions.

3 Ajuster la dilution des échantillons de papier et de carton pour obtenir un comptage d'environ 30 à 300 colonies par boîte. Il n'est parfois pas possible d'obtenir la limite inférieure pour les échantillons de papier et de carton ayant une faible concentration en bactéries.

4 La concentration en matériau fibreux réparti sur une surface donnée de la boîte est un facteur important intervenant dans l'observation du nombre de colonies observées pour un échantillon donné de papier ou de carton. Il est donc important de suivre avec soin les directives concernant la concentration fibreuse, le volume utilisé pour l'ensemencement ainsi que le nombre et la taille des boîtes de Petri utilisées.

10.3 Comptage

Rechercher la présence de colonies bactériennes sur les boîtes incubées. Compter le nombre de colonies à l'aide d'un compteur approprié (6.2), noter le nombre et la dilution. Rejeter les boîtes présentant plus de 300 colonies.

11 Expression des résultats

Exprimer les résultats sous forme de nombre de colonies bactériennes formant des unités par gramme de papier ou de carton. Pour obtenir cette valeur, multiplier le nombre de colonies pour

chaque dilution par le facteur de dilution. Par exemple, si on utilise la suspension à 1 % sans dilution, la teneur en échantillon d'origine dans les cinq boîtes sera de 0,1 g. Si le nombre total de colonies compté est de 22, la teneur sera de $22 \times 10 = 220$ colonies/g.

Si le même nombre de colonies avait été obtenu avec une dilution à 10^{-1} , le résultat aurait été de 2 200 colonies/g.

12 Fidélité

Les microbiologistes s'accordent sur le fait qu'une erreur intrinsèque de 10 % est normale pour le comptage des colonies. Comme les méthodes décrites utilisent ce type de comptage, cette erreur est acceptée par les microbiologistes. Un échantillon ensemencé en même temps par plusieurs microbiologistes exercés a présenté un écart de 5 %.

13 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit mentionner les indications suivantes :

- a) la référence à la présente partie de l'ISO 8784 ;
- b) l'identification des échantillons, des pièces et du lot ;
- c) la date et le lieu de l'essai ;
- d) les résultats exprimés en nombre de colonies bactériennes par gramme ;
- e) le nombre de colonies bactériennes dans la boîte de Petri de contrôle ;
- f) tout écart par rapport au mode opératoire spécifié dans la présente partie de l'ISO 8784.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 8784-1:1987](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7688f36-25dd-46c2-9271-57e8a0d4e28a/iso-8784-1-1987)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7688f36-25dd-46c2-9271-57e8a0d4e28a/iso-8784-1-1987>

Annexe

Milieux de culture et liquide de dilution appropriés

(Cette annexe fait partie intégrante de la norme.)

A.1 Milieux de culture

Mélange tryptone-glucose-agar		Mélange peptone-glucose-agar	
<i>Composition</i>		<i>Composition</i>	
bouillon de bœuf	3,0 g	peptone	5,0 g
tryptone	5,0 g	extrait de levure	2,5 g
dextrose (<i>d</i> -glucose)	1,0 g	dextrose (<i>d</i> -glucose)	1,0 g
agar-agar	15,0 g	agar-agar	14,0 g
eau distillée	1 000 ml	eau distillée	1 000 ml
pH	7,0	pH	7,0

Préparation

Lorsque le milieu de culture est préparé en laboratoire selon la formule ci-dessus, s'assurer que les composants sont entièrement dissous avant de verser dans des flacons appropriés et de stériliser.

NOTE — Le mélange tryptone-glucose-agar est commercialisé sous une forme déshydratée. Lorsqu'on utilise cette présentation, suivre les instructions portées sur la boîte.

[ISO 8784-1:1987](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7688f36-25dd-46c2-9271-57e8a0d4e28a/iso-8784-1-1987)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7688f36-25dd-46c2-9271-57e8a0d4e28a/iso-8784-1-1987>

A.2 Liquide de dilution

Solution de Ringer

Composition

chlorure de sodium (NaCl)	2,500 g
chlorure de potassium (KCl)	0,105 g
chlorure de calcium (CaCl ₂)	0,120 g
hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO ₃)	0,050 g
eau distillée ou déionisée	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les sels dans l'eau et verser dans des flacons appropriés. Stériliser la solution dans l'autoclave (6.6) pendant 15 min à 120 °C sous 100 kPa ou filtrer en milieu stérile sur des membranes appropriées (pores inférieurs à 0,5 µm).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 8784-1:1987](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7688b36-25dd-46c2-9271-57e8a0d4e28a/iso-8784-1-1987)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e7688b36-25dd-46c2-9271-57e8a0d4e28a/iso-8784-1-1987>

CDU 676.3/.7 : 579.6 : 57.087.23

Descripteurs : papier, carton, essai, analyse microbiologique, détermination, bactérie.

Prix basé sur 5 pages
