

---

---

**Bouchons en liège — Dénombrement des  
unités formant colonie de levures, de  
moisissures et de bactéries capables de se  
développer dans un milieu alcoolique**

*Cork stoppers — Enumeration of colony-forming units of yeasts, moulds  
and bacteria capable of growth in an alcoholic medium*

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 10718:2002

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002>



**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 décline 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. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 10718:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002>

© ISO 2002

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 de l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

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](mailto:copyright@iso.ch)  
Web [www.iso.ch](http://www.iso.ch)

Imprimé 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 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 10718 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 87, Liège.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 10718:1993), dont elle constitue une révision technique.

**ITeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002>

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

ISO 10718:2002

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002>

# Bouchons en liège — Dénombrement des unités formant colonie de levures, de moisissures et de bactéries capables de se développer dans un milieu alcoolique

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode de dénombrement des unités formant colonie de levures, de moisissures et de bactéries qui peuvent exister sur les bouchons en liège, et qui, dans certaines conditions, peuvent se développer dans une solution alcoolique.

La présente Norme internationale est applicable aux bouchons en liège soumis aux traitements habituels de sanitation.

## 2 Référence normative

Le document normatif suivant contient 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 cette publication ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente du document normatif indiqué 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.

ISO 10718:2002

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

## 3 Principe

Dénombrement direct de micro-organismes vivants (levures, moisissures et bactéries) par incubation dans des milieux de culture après extraction en solution alcoolique additionnée d'acide tartrique et suivi d'une filtration sur membrane.

## 4 Réactifs et milieux de culture

**4.1 Solution physiologique (0,85 % NaCl)<sup>1)</sup> ou solution de Ringer (1/4 X)<sup>1)</sup> ayant la composition suivante.**

Chlorure de sodium	2,25 g/l
Chlorure de potassium	0,105 g/l
Chlorure de calcium 6H <sub>2</sub> O	12 g/l
Bicarbonate de sodium	0,05 g/l
pH final (obtenu de la mixture)	7,0 ± 0,2

1) Ce produit est disponible dans le commerce.

**4.2 WLD** (pour le dénombrement des bactéries), ayant la composition suivante.

Extrait de levure	4,0 g/l
Hydrolysat de caséine	5,0 g/l
Dextrose	50,0 g/l
Potassium phosphate biacide	0,55 g/l
Chlorure de magnésium	0,425 g/l
Chlorure de calcium	0,125 g/l
Sulfate de magnésium	0,125 g/l
Sulfate de manganèse	0,002 5 g/l
Chlorure ferrique	0,002 5 g/l
Vert de bromocrésol	0,022 g/l
Cyclohexymide (actidione)	0,004 g/l
pH final (obtenu de la mixture)	5,5 ± 0,2

**4.3 M-Green** (pour le dénombrement de levures et de moisissures), ayant la composition suivante.

Extrait de levure	9,0 g/l
Dextrose (cérélose)	50,0 g/l
Peptone	10,0 g/l
Sulfate de magnésium	2,10 g/l
Phosphate de potassium	2,0 g/l
Diastase	0,05 g/l
Thiamine	0,05 g/l
Vert de bromocrésol	0,026 g/l
pH final (obtenu de la mixture)	4,6 ± 0,2

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

[ISO 10718:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002)

**4.4 Acide tartrique.**

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002>

**4.5 Éthanol à 96 %.**

**4.6 Agent mouillant.**

**4.7 Gel de triptone.**

**4.8 Diphényle.**

Il convient de conserver les réactifs et les milieux de culture conformément aux instructions du fabricant.

## 5 Appareillage

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, ce qui suit.

### 5.1 Système pour la filtration sur membrane.

L'un ou l'autre des systèmes de filtration sur membrane décrits en 5.1.1 et 5.1.2 peut être utilisé.

**5.1.1 Système de filtration stérile**, prêt à l'usage, comprenant un entonnoir en polypropylène de capacité d'au moins 100 ml, une membrane stérile (porosité 0,45 µm), une boîte stérile et une pompe à vide avec robinet à trois voies pour couper le vide.

NOTE Ce système est disponible dans le commerce.

**5.1.2 Système de filtration traditionnel**, comprenant un entonnoir avec capacité minimale de 100 ml (en acier inoxydable, en verre ou en polycarbonate, pouvant être stérilisé en autoclave ou en étuve), une membrane stérile (porosité 0,45 µm), une boîte stérile avec un tampon absorbant et une pompe à vide.

**5.2 Incubateur réfrigéré**, pouvant être maintenu à 30 °C ± 2 °C.

**5.3 Réfrigérateur**, pouvant être maintenu à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.

**5.4 Agitateur orbital à platine** ou **agitateur oscillant** réglable à une vitesse de 140 r/min à 160 r/min ou **agitateur aller-retour** réglable à une vitesse de 140 à 160 aller-retour.

**5.5 pH-mètre**, thermocompensé, avec une précision de ± 0,1 à 25 °C.

**5.6 Flacons en verre**, avec bouchon à vis, de capacité appropriée pour que les quatre bouchons restent immergés dans 100 ml de solution.

## 6 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage dans des conditions d'asepsie.

Utiliser des récipients stériles et conserver l'échantillon à une température comprise entre 2 °C et 8 °C jusqu'au moment de l'analyse.

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

## 7 Conditions pour l'essai

La préparation du matériau et le mode opératoire doivent être exécutés dans des conditions d'asepsie et selon les règles définies dans l'ISO 7218.

[ISO 10718:2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002>

## 8 Extraction

**8.1** Préparer la solution physiologique ou la solution de Ringer (4.1). Ajouter, en agitant, l'agent mouillant (4.6), de façon à obtenir une concentration de 10 g/l et ensuite ajouter le gel de triptone (4.7) pour obtenir une concentration de 1 g/l. Ensuite, ajuster le pH à une valeur comprise entre 3 et 3,5 avec de l'acide tartrique (4.4). Répartir environ 90 ml de la solution par chaque flacon (5.6) et stériliser.

**8.2** Après le refroidissement, ajouter en asepsie 10 ml d'éthanol (4.5) à chaque flacon.

**8.3** Introduire quatre bouchons dans chaque flacon en assurant que les bouchons restent complètement immergés. Agiter les flacons pendant 1 h à une vitesse de 140 r/min à 160 r/min et à une température comprise entre 20 °C et 25 °C.

Le nombre de flacons dépendra du plan d'échantillonnage choisi. La moitié des flacons sera employée pour les ensemencements sur WLD et l'autre moitié pour les ensemencements sur M-Green. Pour chaque milieu de culture, préparer un flacon supplémentaire pour l'essai en blanc.

## 9 Modes opératoires

### 9.1 Généralités

Si l'on emploie des systèmes de filtration et des milieux stériles prêts à l'usage, suivre le mode opératoire 9.2.

Si l'on emploie des systèmes de filtration à stériliser et des milieux déshydratés, suivre le mode opératoire 9.3.

## 9.2 Mode opératoire rapide qui prévoit l'emploi de systèmes de filtration et de milieux stériles prêts à l'usage

### 9.2.1 Préparation

Préparer le système de filtration (5.1.1).

### 9.2.2 Ensemencements sur WLD

Positionner l'entonnoir complet avec la membrane stérile sur la tête de filtration de la pompe à vide. Filtrer en asepsie la solution d'extraction du flacon préparée conformément à l'article 8. En fin de filtration, couper le vide du circuit d'aspiration pour rééquilibrer la pression atmosphérique.

Juste avant l'utilisation au milieu WLD, ajouter du diphényle (4.8) dissous dans une solution éthanolique à 10 % de façon à obtenir une concentration de 30 ppm en diphényle. Ajouter le milieu WLD contenu dans l'ampoule, aspirer légèrement et couper le vide. Enlever l'ensemble de filtration et mettre en place le bouchon à la base du système de filtration pour éviter les rétro-infections. Enlever la partie cylindrique de l'entonnoir. Soulever le couvercle de l'entonnoir et l'adapter sur l'ensemble filtre/boîte de Petri.

Répéter ce mode opératoire pour tous les flacons.

### 9.2.3 Ensemencements sur M-Green

Positionner l'entonnoir complet avec la membrane stérile sur la tête de filtration de la pompe à vide. Filtrer en asepsie la solution d'extraction préparée conformément à l'article 8. En fin de filtration, couper le vide du circuit d'aspiration pour rééquilibrer la pression atmosphérique.

Ajouter le milieu M-Green contenu dans l'ampoule, aspirer légèrement et couper le vide. Enlever l'ensemble de filtration et mettre en place le bouchon à la base du système de filtration pour éviter les rétro-infections. Enlever la partie cylindrique de l'entonnoir. Soulever le couvercle de l'entonnoir et l'adapter sur l'ensemble filtre/boîte de Petri.

Répéter ce mode opératoire pour tous les flacons.

Les milieux déshydratés sur membranes doivent être réhydratés avec de l'eau déminéralisée et stérilisée.

## 9.3 Mode opératoire qui prévoit l'emploi de systèmes de filtration à stériliser et de milieux de culture déshydratés

### 9.3.1 Préparation des milieux

Préparer et stériliser les milieux WLD (4.2) et M-Green (4.3) conformément aux instructions du fabricant.

Ajouter du diphényle (4.8) dissous dans une solution éthanolique à 10 % au milieu WLD de façon à obtenir une concentration de 30 ppm en diphényle.

Préparer les boîtes de Petri.

### 9.3.2 Préparation du système de filtration

Stériliser et préparer le système de filtration (5.1.2).

### 9.3.3 Ensemencements sur WLD

Filtrer en asepsie la solution d'extraction préparée conformément à l'article 8, en employant une membrane stérile.

Transférer la membrane sur une boîte de Petri contenant WLD.

Répéter ce mode opératoire pour tous les flacons.

#### 9.3.4 Ensemencements sur M-Green

Filter en asepsie la solution d'extraction du flacon conformément à l'article 8, en employant une membrane stérile.

Transférer la membrane sur une boîte de Petri contenant M-Green.

Répéter ce mode opératoire pour tous les flacons.

## 10 Essai en blanc

Préparer un essai en blanc pour chaque milieu.

## 11 Incubation

Retourner les boîtes de WLD et de M-Green et incuber dans un incubateur réfrigéré (5.2) à  $30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  pendant 3 jours.

Observer et compter les colonies dans chaque boîte au moins toutes les 24 h.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

## 12 Expression des résultats

ISO 10718:2002

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002)

[1eab8b69c5c4/iso-10718-2002](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/33464788-491f-4733-8713-1eab8b69c5c4/iso-10718-2002)

### 12.1 Détermination du nombre d'UFC de bactéries par bouchon

Après la période d'incubation spécifiée, dénombrer les colonies de bactéries présentes dans chaque boîte de WLD, toujours en se rapportant à la dernière lecture valable.

Pour chaque boîte, le nombre d'unités formant colonie (UFC) par bouchon est obtenu à l'aide de la formule suivante:

$$\frac{N_b}{4}$$

où

$N_b$  est le nombre total de colonies de bactéries dénombrées;

4 est le nombre de bouchons soumis à l'essai.

Le résultat de l'essai est la moyenne arithmétique des valeurs de chaque boîte arrondie par excès à l'unité la plus proche.

### 12.2 Détermination du nombre d'UFC de levures et de moisissures par bouchon

Après la période d'incubation spécifiée, dénombrer les colonies de levures et de moisissures présentes dans chaque boîte de M-Green, toujours en rapportant à la dernière lecture valable.