
**Pâtes, papiers et cartons — Analyse
microbienne —**

Partie 1:
**Dénombrement des bactéries et
des spores bactériennes basé sur la
désintégration**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Pulp, paper and board — Microbiological examination —

*Part 1: Enumeration of bacteria and bacterial spores based on
disintegration*

ISO 8784-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 8784-1:2014](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2014

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

Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20

Tel. + 41 22 749 01 11

Fax + 41 22 749 09 47

E-mail copyright@iso.org

Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	1
4 Principe	2
5 Milieux de culture et diluants	2
5.1 Généralités.....	2
5.2 Eau.....	2
5.3 Milieux de culture relatifs au nombre total de bactéries et au nombre de spores.....	2
5.4 Diluants.....	2
6 Appareillage et matériel	3
6.1 Généralités.....	3
6.2 Liste de matériel.....	3
7 Échantillonnage	3
8 Préparation du matériau pour essai	4
8.1 Généralités.....	4
8.2 Détermination de la teneur en matière sèche.....	4
8.3 Pesée.....	4
8.4 Désintégration.....	5
9 Détermination du nombre total de bactéries et du nombre de spores bactériennes	5
9.1 Généralités.....	5
9.2 Ensemencement relatif au nombre total de bactéries.....	5
9.3 Ensemencement relatif au nombre de spores.....	6
9.4 Incubation.....	6
10 Dénombrement des colonies	6
11 Calcul et expression des résultats	7
11.1 Calcul.....	7
11.2 Interprétation.....	8
11.3 Rapport.....	8
12 Rapport d'essai	8
Annexe A (informative) Liquide de dilution	9
Annexe B (informative) Fidélité	10
Bibliographie	14

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 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.

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](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 6, *Papiers, cartons et pâtes*, sous-comité SC 2, *Méthodes d'essais et spécifications de qualité des papiers et cartons*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 8784-1:2005), qui a fait l'objet d'une révision technique.

La deuxième édition s'appliquait aux levures et aux moisissures ainsi qu'aux bactéries. Les principales modifications apportées par rapport à l'édition précédente sont les suivantes:

- cette troisième édition n'est applicable qu'aux bactéries et aux spores bactériennes, elle ne s'applique plus aux levures ni aux moisissures;
- la température d'incubation est passée de (37 °C ± 1 °C) à (32 °C ± 2 °C) (9.4);
- deux déterminations sont réalisées en parallèle (Articles 8 et 9);
- le résultat peut être exprimé en fonction de la «masse reçue» en plus d'être exprimé en fonction de la masse sèche (8.2, 11.1 et Article 12).

L'ISO 8784 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Pâtes, papiers et cartons — Analyse microbiologique*:

- *Partie 1: Dénombrement des bactéries et spores bactériennes basé sur la désintégration*

Introduction

La présente partie de l'ISO 8784, qui traite de l'analyse microbiologique de la pâte commerciale sèche, du papier et du carton, est dans ses grandes lignes fondée sur l'ISO 4833[1], malgré des conditions différentes. Toutefois, elle fournit des précisions particulières lorsque cela s'avère nécessaire. Elle est destinée à l'estimation du nombre d'unités formant colonie (UFC) de bactéries aérobies et de spores bactériennes.

Compte tenu de la précision des techniques exigées dans les modes opératoires aseptiques, des résultats reproductibles de bonne qualité peuvent être garantis uniquement par un personnel qualifié en microbiologie.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 8784-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8784-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/43920fab-d1da-4c8a-979f-69e759621c9e/iso-8784-1-2014>

Pâtes, papiers et cartons — Analyse microbienne —

Partie 1:

Dénombrement des bactéries et des spores bactériennes basé sur la désintégration

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 8784 spécifie une méthode de détermination du nombre total d'unités formant colonie de bactéries et de spores bactériennes, dans la pâte commerciale sèche, le papier et le carton, après désintégration. Le dénombrement se rapporte à un milieu spécifique.

2 Références normatives

Les documents suivants, en tout ou partie, sont référencés de façon normative dans le présent document et sont indispensables pour son application. 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 186:2002, *Papier et carton — Échantillonnage pour déterminer la qualité moyenne.*

ISO 7213:1981, *Pâtes — Échantillonnage pour essais.*

ISO 638:2008, *Papiers, cartons et pâtes — Détermination de la teneur en matières sèches — Méthode par séchage à l'étuve.*

3 Termes et définitions

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

3.1

bactérie

organisme microscopique unicellulaire ayant une structure cellulaire de type procaryote, qui se reproduit par division et peut croître dans les conditions d'essai spécifiées dans la présente partie de l'ISO 8784

3.2

spore bactérienne

structure hautement résistante en sommeil

EXEMPLE Endospore provenant d'un genre particulier de bactérie.

3.3

nombre total de bactéries

nombre d'unités formant colonie (UFC) de bactéries et de spores bactériennes, formées après incubation dans un milieu de culture type, dans les conditions d'essai spécifiées dans la présente partie de l'ISO 8784

3.4

nombre de spores

nombre d'unités formant colonie (UFC) de spores bactériennes, formées après incubation dans un milieu de culture type, dans les conditions d'essai spécifiées dans la présente partie de l'ISO 8784

4 Principe

La présente méthode d'ensemencement en profondeur implique un dénombrement des colonies dans un milieu de culture type. Une suspension fibreuse préparée à partir d'échantillons de papier, de carton ou de pâte est ensemencée dans une gélose. Deux déterminations sont réalisées en parallèle. Pour le dénombrement de spores bactériennes, la suspension fibreuse est chauffée avant l'ensemencement pendant 10 min à 80 °C. Les boîtes sont incubées à 32 °C pendant 48 h. Le nombre total de bactéries ou de spores bactériennes est obtenu par dénombrement des colonies formées dans la gélose.

La valeur moyenne des deux déterminations réalisées en parallèle est calculée et les résultats sont exprimés en nombre d'UFC par gramme d'échantillon.

5 Milieux de culture et diluants

5.1 Généralités

Tous les substrats et diluants doivent être convenablement stérilisés. Lors de la préparation du milieu de culture, s'assurer que les ingrédients sont entièrement dissous en les mélangeant pendant qu'ils chauffent avant de les répartir dans des récipients appropriés pour la stérilisation. Voir l'ISO 11133[2] relative à l'assurance qualité et aux lignes directrices pour la préparation et la production de milieux de culture.

5.2 Eau

Lorsque de l'eau est mentionnée dans une formule, utiliser de l'eau distillée ou purifiée; voir l'ISO 11133[2].

5.3 Milieux de culture relatifs au nombre total de bactéries et au nombre de spores

Les milieux de culture doivent être préparés de la manière suivante ou selon les instructions du fabricant à partir de milieux de culture déshydratés disponibles dans le commerce. Les milieux prêts à l'emploi peuvent être utilisés lorsque leur composition est comparable à celle donnée dans la présente partie de l'ISO 8784. Pour les essais de performance des milieux, voir l'ISO 11133[2].

Composition par litre de la gélose pour dénombrement:

Tryptone	5,0 g
Extrait de levure	2,5 g
Dextrose	1,0 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml
pH final	7,0 ± 0,2

En l'absence de gélose pour dénombrement, la gélose à l'extrait de glucose tryptone (TGE) peut être utilisée (voir A.3). L'utilisation de TGE comme autre milieu de culture est admise si elle donne des résultats comparables au milieu de culture type. Le milieu de culture utilisé doit être consigné dans le rapport d'essai (voir Article 12).

5.4 Diluants

Il est préférable d'utiliser la solution de Ringer (voir A.1) bien que d'autres solutions isotoniques puissent être utilisées. Les pastilles Ringer sont disponibles dans le commerce.

Pour faciliter la libération des cellules par les fibres, il est recommandé d'ajouter 20 µl de Tween 80 (voir A.2) par litre à la solution de Ringer, avant la stérilisation par autoclave.

Le diluant utilisé et l'ajout éventuel de Tween 80 doivent être consignés dans le rapport d'essai (voir [Article 12](#)).

6 Appareillage et matériel

6.1 Généralités

Tout le matériel de laboratoire et les parties du matériel en contact direct avec l'échantillon et le diluant ou le milieu de culture doivent être stérilisés.

NOTE Pour des conseils sur le matériel de microbiologie courant, voir l'ISO 7218[4].

6.2 Liste de matériel

6.2.1 Utiliser du matériel de laboratoire ordinaire pour microbiologie, et le matériel suivant.

6.2.2 Matériel d'emballage approprié, par exemple feuille d'aluminium (non revêtue et inerte), enveloppes prêtes à l'emploi de dimensions différentes ou sacs plastiques auto-fermants, tous disponibles dans le commerce.

6.2.3 Désintégrateur, mélangeur électrique à grande vitesse doté d'un récipient en métal (de préférence en acier inoxydable) ou en verre pouvant être stérilisé.

NOTE Un autre système d'homogénéisation d'efficacité équivalente peut être utilisé.

6.2.4 Incubateur, permettant de maintenir une température constante de $32\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.2.5 Boîtes de Petri, d'un diamètre de 90 mm (normalisé) ou de 140 mm à 150 mm (autre possibilité).

6.2.6 Pipettes, d'un volume approprié, à large ouverture.

La largeur de l'ouverture doit être assez grande pour qu'une suspension fibreuse à 1 % puisse facilement couler dans l'embout de la pipette.

NOTE 10 ml ou 50 ml représentent un volume approprié.

6.2.7 Bain-marie, permettant de maintenir une température de $80\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

6.2.8 Matériel de dénombrement des colonies ou dispositif grossissant, d'un grossissement compris entre 1,5 x et 2,5 x.

NOTE L'utilisation de lentilles supplémentaires peut être nécessaire pour augmenter le grossissement jusqu'à 10 fois, afin de faciliter le dénombrement des unités formant des colonies bactériennes se présentant sous forme de points, et aussi pour garantir qu'aucun autre élément à l'exception des colonies de bactéries n'est compté (voir [Article 10](#)).

6.2.9 Balance, précise à 0,01 g.

6.2.10 Unité de stérilisation, autoclave permettant de stériliser à 121 °C .

7 Échantillonnage

S'assurer que le mode opératoire d'échantillonnage est réalisé en utilisant des techniques d'asepsie.

Si l'échantillon représente un lot de papier ou de carton, l'échantillonnage doit être conforme à l'ISO 186:2002. Découper plusieurs couches supérieures dans chaque unité de papier ou de carton à échantillonner et les retirer pour éliminer la contamination en surface. Utiliser un couteau stérile et découper plusieurs feuilles de l'échantillon de papier ou de carton, en produisant une pile. Retirer la feuille supérieure.

Si l'échantillon représente un lot de pâte, l'échantillonnage doit être conforme à l'ISO 7213:1981. Retirer plusieurs feuilles du dessus de chaque liasse de chaque unité de pâte commerciale sèche pour éliminer la contamination en surface.

Dans les autres cas, échantillonner un nombre suffisant d'unités pour que le matériau pour essai soit représentatif du papier, du carton ou de la pâte commerciale sèche à soumettre à essai. Pour tous les modes opératoires d'échantillonnage ou d'analyse, s'assurer que le matériau pour essai prélevé est représentatif de l'échantillon reçu.

Dans l'idéal, il convient qu'un échantillon de pâte commerciale sèche, de papier ou de carton contienne au moins quatre feuilles (dont au moins deux feuilles pour les essais et deux servant à la protection), ayant chacune une dimension minimale de 200 mm × 250 mm.

NOTE Pour le carton ou un matériau plus épais, il se peut qu'une seule feuille suffise pour chaque détermination en parallèle. Pour le papier plus fin, plus de deux feuilles peuvent être utilisées pour chaque détermination en parallèle.

Après l'échantillonnage, envelopper le matériau pour essai non exposé dans un emballage approprié (6.2.2).

8 Préparation du matériau pour essai

8.1 Généralités

Il est préférable d'effectuer le mode opératoire dans des conditions d'asepsie. Une hotte à flux laminaire est recommandée pour l'ensemencement. Déballez le matériau pour essai dans des conditions d'asepsie. Retirer les feuilles protectrices en haut et en bas de la pile d'échantillons, sans toucher les feuilles d'essai au centre de la pile.

Le mode opératoire en 8.3 et 8.4 doit être répété pour les deux déterminations en parallèle.

8.2 Détermination de la teneur en matière sèche

Si le résultat doit être exprimé en fonction de la masse sèche, déterminer la teneur en matière sèche du matériau pour essai, X , conformément à l'ISO 638:2008.

Si le résultat doit être exprimé en fonction de la «masse reçue» (et non en fonction de la masse sèche), ne pas tenir compte de la teneur en matière sèche et le consigner [voir 11.1 et Article 12 j)].

8.3 Pesée

Deux déterminations sont réalisées en parallèle (8.1).

Poser une boîte de Petri fermée (6.2.5) sur le plateau de la balance et déterminer la tare.

Tenir la ou les feuilles d'une main par le bord avec des pinces stériles et couper et éliminer les bords restants avec des ciseaux stériles. Découper l'échantillon en petits morceaux. Peser une quantité suffisante du matériau pour essai (masse d'environ 2 g à 3 g), m , dans la boîte de Petri, pour pouvoir préparer une suspension fibreuse d'une concentration de 1 %.

NOTE 1 Pour des raisons pratiques, il peut être utile de découper une quantité suffisante de petits morceaux afin de pouvoir répéter l'essai.

NOTE 2 Afin de réduire le temps de désintégration, il peut être utile de découper des morceaux de taille inférieure à 5 mm.

Transvaser, dans des conditions d'asepsie, le matériau pour essai dans le récipient du désintégrateur (6.2.3).

8.4 Désintégration

Deux déterminations sont réalisées en parallèle (8.1).

Utiliser la solution de diluant froide (5.4) pour éviter la surchauffe (augmentation de la température de la suspension supérieure à 45 °C) pendant la désintégration. S'assurer de la stérilité du récipient du désintégrateur (6.2.3) pour chaque matériau pour essai.

Désintégrer le matériau pour essai (8.3) dans la solution de diluant (5.4), de volume, V , nécessaire pour obtenir une suspension fibreuse de 1 % (pour 2,0 g, utiliser 200 ml; pour 3,0 g, utiliser 300 ml). Désintégrer jusqu'à ce que la suspension soit exempte d'amas de fibres.

D'autres systèmes d'homogénéisation d'efficacité équivalente peuvent être utilisés; cela doit être consigné dans le rapport d'essai. S'il est difficile d'obtenir une suspension fibreuse exempte d'amas de fibres en utilisant un désintégrateur, un autre matériel approprié peut être utilisé en plus. Si c'est le cas, le matériel utilisé doit être consigné dans le rapport d'essai.

9 Détermination du nombre total de bactéries et du nombre de spores bactériennes

9.1 Généralités

Le mode opératoire en 9.2, 9.3 et 9.4 doit être répété pour les deux déterminations en parallèle.

Le mode opératoire doit être réalisé dans des conditions d'asepsie. Le plan de travail doit être nettoyé avec un désinfectant approprié. Si possible, l'utilisation d'une hotte à flux laminaire est recommandée pour l'ensemencement.

Les modes opératoires de détermination du nombre total de bactéries et du nombre de spores bactériennes sont similaires, sauf pour l'ensemencement relatif au nombre de spores pour lequel il convient de faire chauffer le matériau pour essai désintégré conformément à 9.3.

Après désintégration de l'échantillon, ajouter la suspension fibreuse dans des boîtes de Petri. Lors de l'utilisation de l'embout de pipette à large ouverture, s'assurer qu'aucun amas de fibres ne reste dans l'embout.

NOTE Il se peut que des bactéries et des spores soient présentes sur des fibres. Si une suspension de fibres non homogène est ajoutée dans une boîte de Petri, le nombre de colonies pourrait être erroné.

9.2 Ensemencement relatif au nombre total de bactéries

Ce mode opératoire doit être répété pour les deux déterminations en parallèle (9.1).

9.2.1 Immédiatement après la désintégration, répartir, à l'aide d'une pipette stérile à large ouverture (6.2.6), 10 ml, v , de la suspension fibreuse à 1 % dans 5 boîtes de Petri normalisées stériles (6.2.5), c'est-à-dire qu'il convient que le volume se rapproche autant que possible de 2 ml par boîte de 90 mm, ce qui représente 0,1 g de matériau pour essai. Dans les 5 min maximum, verser dans chaque boîte 15 ml à 20 ml du milieu de culture sélectionné (5.3) refroidis à environ 45 °C. Immédiatement après cet ajout, agiter en tournant pour obtenir une répartition uniforme des fibres dans le milieu de culture. Éviter les mouvements circulaires qui ne permettent pas la séparation des colonies. Il est important de désintégrer tous les amas pour permettre un examen plus facile et plus précis des boîtes. La limite de détection est de 10 UFC/g.

Si des boîtes de Petri de taille différente (de 140 mm à 150 mm) sont utilisées, répartir, à l'aide d'une pipette à large ouverture (6.2.6), 50 ml, v , de la suspension fibreuse à 1 % dans 5 boîtes de Petri stériles (6.2.5), c'est-à-dire environ 10 ml par boîte, ce qui représente 0,5 g de matériau pour essai. Dans ce cas, la limite de détection est de 2 UFC/g.