
**Bouchons en liège — Caractérisation
d'un bouchon pauvre en germes par
dénombrement des unités formant
colonie de levures, de moisissures
et de bactéries, extraites en milieu
alcoolique et capables de s'y**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

*Cork stoppers — Characterization of a low-in-germs stopper, through
the enumeration of colony-forming units of yeasts, moulds and bacteria,
capable of both being extracted and growing in alcoholic medium*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/67a65906-d3cb-424f-a56e-dd8a40cf24d0/iso-10718-2015>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 10718:2015

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/67a65906-d3cb-424f-a56e-dd8a40cf24d0/iso-10718-2015>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 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

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Bouchons pauvres en germes	1
4 Principe	1
5 Réactifs et milieux de culture	1
6 Appareillage	3
7 Échantillonnage	3
8 Conditions d'essai	3
9 Extraction	4
10 Modes opératoires	4
10.1 Généralités.....	4
10.2 Mode opératoire rapide qui prévoit l'emploi d'un système de filtration et d'un milieu stérile prêt à l'usage.....	4
10.2.1 Préparation.....	4
10.2.2 Ensemencement sur WLD.....	4
10.2.3 Ensemencement sur M-Green.....	4
10.3 Mode opératoire qui prévoit l'emploi d'un système de filtration à stériliser et d'un milieu de culture déshydraté.....	5
10.3.1 Préparation des milieux.....	5
10.3.2 Préparation du système de filtration.....	5
10.3.3 Ensemencement sur WLD.....	5
10.3.4 Ensemencement sur M-Green.....	5
11 Essai à blanc	5
12 Incubation	5
13 Expression des résultats	6
13.1 Détermination du nombre d'ufc de bactéries par bouchon en liège.....	6
13.2 Détermination du nombre d'ufc de levures et de moisissures par bouchon.....	6
14 Rapport d'essai	6

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](http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/67a65906-d5cb-424f-a56c-dd8a40cf24d0/iso-10718-2015).

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 87, Liège.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 10718:2002), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Bouchons en liège — Caractérisation d'un bouchon pauvre en germes par dénombrement des unités formant colonie de levures, de moisissures et de bactéries, extraites en milieu alcoolique et capables de s'y développer

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 être extraites, à l'aide d'une solution alcoolique, durant 3 mois après la livraison.

La présente Norme internationale s'applique à tous les bouchons en liège de type prêt à l'emploi ayant subi un processus d'hygiénisation, emballés dans des conditions aseptiques et bien hermétiques.

La présente Norme internationale spécifie aussi les valeurs limite des colonies de levures, de moisissures et de bactéries qui peuvent se trouver sur des bouchons en liège soumis aux modes opératoires d'essai décrits dans cette Norme.

2 Références normatives

Les documents suivants, en totalité ou en partie, sont référencés de manière 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 7218, *Microbiologie des aliments — Exigences générales et recommandations*

ISO 17727, *Liège — Bouchons de liège pour vins tranquilles — Plan d'échantillonnage pour le contrôle qualité des bouchons de liège*

3 Bouchons pauvres en germes

Les bouchons de liège soumis aux méthodes d'essai décrites dans cette Norme sont désignés comme pauvres en germes s'ils présentent des résultats suivantes:

< 10 ufc de bactéries par bouchon (voir [13.1](#))

< 10 ufc de levures et moisissures par bouchon (voir [13.2](#))

4 Principe

Dénombrement direct de micro-organismes vivants (levures, moisissures et bactéries) par incubation sur un milieu de culture spécifique, après extraction à l'aide d'une solution alcoolique additionnée d'acide tartrique et suivi d'une filtration sur membrane.

5 Réactifs et milieux de culture

5.1 Solution physiologique (0,85 % NaCl)¹⁾ ou solution de Ringer (1/4 X)¹⁾ ayant la composition suivante:

1) Ce produit est disponible dans le commerce.

ISO 10718:2015(F)

Chlorure de sodium	2,25 g/l
Chlorure de potassium	0,105 g/l
Chlorure de calcium 6H ₂ O	12 g/l
Bicarbonate de sodium	0,05 g/l
pH final (du mélange)	7,0 ± 0,2

5.2 WLD (pour le dénombrement des bactéries), ayant la composition suivante:

Extrait de levure	4,0 g/l
Hydrolysate de caséine	5,0 g/l
Dextrose	50,0 g/l
Potassium phosphate biacide	0,55 g/l
Chlorure de potassium	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 (du mélange)	5,5 ± 0,2

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 10718:2015](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/67a65906-d3cb-424f-a56e-dd8a40cf24d0/iso-10718-2015)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/67a65906-d3cb-424f-a56e-dd8a40cf24d0/iso-10718-2015>

5.3 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 (du mélange)	4,6 ± 0,2

5.4 Acide tartrique.

5.5 Éthanol à 96 %.

5.6 Agent mouillant.

5.7 Gel de triptone.

5.8 Diphényle.

5.9 Eau déminéralisée (ou eau de pureté équivalente).

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

6 Appareillage

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

6.1 Système pour la filtration sur membrane.

L'un ou l'autre des systèmes de filtration sur membrane décrits en [6.1.1](#) et [6.1.2](#) peut être utilisé.

6.1.1 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 vide²⁾.

6.1.2 Système de filtration traditionnel, comprenant un entonnoir de 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 de Pétri stérile avec un tampon adsorbant et une pompe à vide.

6.2 Incubateur, pouvant être maintenu à 30 °C ± 2 °C.

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

6.4 Agitateur orbital à platine ou **agitateur oscillant** ou **agitateur va-et-vient** réglables selon les modèles à une vitesse de 140 r/min à 160 r/min ou de 140 à 160 osc/min ou de 140 à 160 aller-retour/min.

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

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

7 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage dans des conditions d'asepsie selon la norme ISO 17727.

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

8 Conditions d'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.

2) Ce système est disponible dans le commerce.

9 Extraction

9.1 Préparer la solution physiologique ou la solution de Ringer (5.1). Ajouter, en agitant, l'agent mouillant (5.6), de façon à obtenir une concentration de 10 g/l et ensuite ajouter le gel de triptone (5.7) 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 (5.4). Répartir environ 90 ml de la solution par chaque flacon (6.6) et stériliser.

9.2 Après le refroidissement, ajouter en asepsie 10 ml d'éthanol (5.5) à chaque flacon.

9.3 Introduire quatre bouchons en liège 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 est utilisée 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 à blanc.

10 Modes opératoires

10.1 Généralités

Si l'on emploie des systèmes de filtration et des milieux stériles prêts à l'usage, suivre le mode opératoire 10.2.

Si l'on emploie des systèmes de filtration à stériliser et des milieux déshydratés, suivre le mode opératoire 10.3.

10.2 Mode opératoire rapide qui prévoit l'emploi d'un système de filtration et d'un milieu stérile prêt à l'usage

10.2.1 Préparation

Préparer le système de filtration (6.1.1).

10.2.2 Ensemencement 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 9. En fin de filtration, couper le vide du circuit d'aspiration pour rééquilibrer la pression atmosphérique.

Juste avant l'ensemencement, ajouter du diphényle (5.8) 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 une rétro-infection. 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 chacun des flacons.

10.2.3 Ensemencement 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 9. En fin de filtration, couper le vide du circuit d'aspiration pour rééquilibrer la pression atmosphérique.

Ajouter le milieu de culture M-Green (5.1) 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 une rétro-infection. 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 chacun des flacons.

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

10.3 Mode opératoire qui prévoit l'emploi d'un système de filtration à stériliser et d'un milieu de culture déshydraté

10.3.1 Préparation des milieux

Préparer et stériliser les milieux WLD (5.2) et M-Green (5.3) conformément aux instructions du fabricant.

Ajouter du diphényle (5.8) 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.

10.3.2 Préparation du système de filtration

Stériliser et préparer le système de filtration (6.1.2).

10.3.3 Ensemencement sur WLD

Filtrer en asepsie la solution d'extraction préparée conformément à l'Article 9, en employant une membrane stérile.

Transférer la membrane sur une boîte de Petri contenant WLD.

Répéter ce mode opératoire pour chacun des flacons.

10.3.4 Ensemencement sur M-Green

Filtrer en asepsie la solution d'extraction préparée conformément à l'Article 9, en employant une membrane stérile.

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

Répéter ce mode opératoire pour chacun des flacons.

11 Essai à blanc

Préparer un essai à blanc pour chaque milieu.

12 Incubation

Retourner les boîtes de WLD et de M-Green et incuber dans un incubateur (6.2) réglé à 30 °C ± 2 °C pendant 3 jours.

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