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

**Partie 3:
Dénombrement des levures et des
moisissures basé sur la désintégration**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Pulp, paper and board — Microbiological examination —

Part 3: Enumeration of yeast and mould based on disintegration

[ISO 8784-3:2022](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8030a940-4c6c-4d09-988c-8f0542bdc63a/iso-8784-3-2022)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8030a940-4c6c-4d09-988c-8f0542bdc63a/iso-8784-3-2022>



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8784-3:2022

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8030a940-4c6c-4d09-988c-8f0542bdc63a/iso-8784-3-2022>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2022

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée 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 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél.: +41 22 749 01 11
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos	iv
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 levures et de moisissures	2
5.4 Diluants	3
5.5 Surfactant non ionique	3
6 Appareillage et matériel	3
7 Échantillonnage	4
8 Préparation du matériau pour essai	4
8.1 Généralités	4
8.2 Pesée	5
8.3 Désintégration	5
9 Détermination du nombre de levures et de moisissures	5
9.1 Généralités	5
9.2 Ensemencement relatif au nombre de levures et de moisissures	5
9.3 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
Bibliographie	9

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. 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 nature volontaire des normes, 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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: www.iso.org/iso/avant-propos.html.

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 6, *Papiers, cartons et pâtes*, sous-comité SC 2, *Méthodes d'essais et spécifications de qualité des papiers et cartons*.

Une liste de toutes les parties de la série ISO 8784 peut être consultée sur le site web de l'ISO.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/members.html.

Pâtes, papiers et cartons — Analyse microbiologique —

Partie 3:

Dénombrement des levures et des moisissures basé sur la désintégration

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode de détermination du nombre total d'unités formant colonie de levures et de moisissures dans de 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 sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 186, *Papier et carton — Échantillonnage pour déterminer la qualité moyenne*

ISO 638-1, *Papiers, cartons, pâtes et nanomatériaux cellulosiques — Détermination de la teneur en matières sèches par séchage à l'étuve — Partie 1: Matériaux sous forme solide*

ISO 7213, *Pâtes — Échantillonnage pour essais*

3 Termes et définitions

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

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

- ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponible à l'adresse <https://www.electropedia.org/>

3.1

levure

micro-organisme aérobic, mésophile qui, à 25 °C et en utilisant un milieu gélosé mycologique dans les conditions décrites dans le présent document, se développe à la surface du milieu en formant des colonies rondes, mates ou brillantes, présentant le plus souvent un contour régulier et une surface plus ou moins convexe

Note 1 à l'article: Des levures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface, d'un milieu forment des colonies rondes et lenticulaires.

3.2

moisissure

micro-organisme aérobic, mésophile filamenteux qui, à la surface d'un milieu gélosé mycologique et dans les conditions décrites dans le présent document, développe habituellement des propagules/germes plats ou duveteux ou des colonies présentant souvent des fructifications colorées et des formes de sporulation

Note 1 à l'article: Des moisissures se développant en profondeur, plutôt qu'à la surface, d'un milieu peuvent former des colonies rondes et lenticulaires.

3.3

dénombrement des levures et des moisissures

nombre d'unités formant colonie (UFC) de *levures* (3.1) et de *moisissures* (3.2), formées après incubation dans un milieu de culture type, dans les conditions d'essai spécifiées dans le présent document

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.

Les boîtes sont incubées à (25 ± 1) °C pendant 5 j. Le nombre total de levures et de moisissures est obtenu par dénombrement des colonies formées dans la gélose. 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 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.

5.3 Milieux de culture relatifs au nombre total de levures et de moisissures

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. Des milieux prêts à l'emploi peuvent être utilisés lorsque leur composition est comparable à celle donnée dans le présent document. Pour les essais de performance des milieux, voir l'ISO 11133.

Composition par litre du milieu gélosé Sabouraud au dextrose et chloramphénicol (SDCA):

- dextrose 40,0 g
- hydrolysate pepsique de tissus animaux 5,0 g
- hydrolysate pancréatique de caséine 5,0 g
- chloramphénicol 0,050 g
- gélose 15,0 g
- eau 1 000 ml.

Dissoudre les composants (y compris le chloramphénicol) ou le milieu complet déshydraté dans l'eau en chauffant. Répartir le milieu dans des récipients appropriés. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 min. Après stérilisation, le pH doit être de $5,6 \pm 0,2$, la mesure étant effectuée à température ambiante.

5.4 Diluants

Solution de Ringer titrée à $\frac{1}{4}$

Composition par litre:

- chlorure de sodium (NaCl) 2,250 g;
- chlorure de potassium (KCl) 0,105 g;
- chlorure de calcium (CaCl_2) $6 \text{ H}_2\text{O}$ 0,120 g;
- hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3) 0,050 g;
- eau 1 000 ml.

NOTE 1 Il est préférable d'utiliser la solution de Ringer bien que d'autres solutions isotoniques puissent être utilisées. Voir l'ISO 6887-1.

NOTE 2 Des pastilles Ringer sont disponibles dans le commerce.

5.5 Surfactant non ionique

Monooléate de polyoxyéthylène sorbitane (Tween 80).

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

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8030a940-4c6c-4d09-988c-8f0542bdc63a/iso-8784-3-2022>

6 Appareillage et matériel

6.1 Généralités

Il est admis de remplacer la verrerie réutilisable et le plastique par un appareillage jetable si celui-ci a des spécifications appropriées.

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

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

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

6.2 Appareillage pour stérilisation par chaleur sèche (four) et par chaleur humide (autoclave)

Voir l'ISO 7218.

6.3 Poste de sécurité biologique, classe II.

6.4 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.

6.5 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.

6.6 Incubateur, permettant de maintenir une température constante de (25 ± 1) °C.

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

6.8 Pipette, d'un volume approprié et 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.

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

6.10 Balance, avec une exactitude de $\pm 0,01$ g.

6.11 Dispositifs de découpe, tels que des ciseaux, des bistouris et/ou des couteaux.

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. 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 à travers plusieurs couches de l'échantillon de papier ou de carton, pour produire une pile. Retirer la feuille supérieure.

Si l'échantillon représente un lot de pâte, l'échantillonnage doit être conforme à l'ISO 7213. Retirer plusieurs feuilles du dessus de chaque balle 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 la détermination. Pour le papier plus fin, plus de deux feuilles peuvent être utilisées pour la détermination.

Après l'échantillonnage, envelopper le matériau pour essai non exposé dans un emballage approprié (6.4).

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 la découpe/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.

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 638-1.

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

8.2 Pesée

Poser une boîte de Petri fermée ([6.7](#)) sur le plateau de la balance et déterminer la tare.

Tenir la ou les feuilles d'une main par un bord avec des pinces stériles et couper et éliminer les bords restants avec des ciseaux stériles. Découper le matériau pour essai 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 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 ([6.5](#)). S'assurer de la stérilité du désintégrateur ([6.5](#)) pour chaque matériau pour essai.

8.3 Désintégration

Utiliser la solution de diluant froide ajustée à température ambiante ([5.4](#)). Éviter la surchauffe (augmentation de la température de la suspension supérieure à 45 °C) pendant la désintégration compte tenu de ses effets sur le nombre de micro-organismes. S'assurer de la stérilité du désintégrateur ([6.5](#)) pour chaque matériau pour essai.

Désintégrer le matériau pour essai ([8.2](#)) dans la solution de diluant ([5.4](#)) pour obtenir une suspension fibreuse de 1 % (pour 2,0 g de matériau pour essai, il convient d'utiliser un volume de 200 ml de diluant et pour 3,0 g, il convient d'utiliser 300 ml). Désintégrer la suspension jusqu'à ce qu'elle soit exempte d'amas de fibres.

S'il est difficile d'obtenir une suspension fibreuse exempte d'amas de fibres en utilisant un désintégrateur, un autre matériel approprié avec une efficacité équivalente peut être utilisé et ceci doit être consigné dans le rapport d'essai.

9 Détermination du nombre de levures et de moisissures

9.1 Généralités

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.

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 n'est resté dans l'embout.

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

9.2 Ensemencement relatif au nombre de levures et de moisissures

9.2.1 Immédiatement après la désintégration, répartir uniformément, à l'aide d'une pipette stérile à large ouverture ([6.8](#)), 10 ml, v , de la suspension fibreuse à 1 % dans 5 boîtes de Petri normalisées stériles ([6.7](#)), c'est-à-dire environ 2 ml pour chaque boîte (de 90 mm), ce qui représente 0,1 g de matériau pour essai.

9.2.2 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 juste des boîtes. La limite de détection est de 10 UFC/g.

Laisser la gélose se solidifier à température ambiante.

Vérifier la stérilité du milieu de culture, des diluants et des conditions d'essai en coulant des boîtes témoins dans les mêmes conditions que le matériau pour essai.

9.2.3 Si une dilution supérieure est exigée, ajouter 10 ml de la suspension fibreuse à 1 % à 90 ml de la solution de diluant (5.4). Agiter vigoureusement la suspension et ensemercer 10 ml de cette suspension comme décrit en 9.2.2.

Répéter ce mode opératoire (dilution par 10 pour chaque phase) jusqu'à l'obtention d'une dilution appropriée.

NOTE Si des nombres plus élevés sont prévus, il peut être utile de répartir 10 ml de la suspension fibreuse à 1 % dans cinq autres boîtes de Petri (140 mm à 150 mm) pour faciliter le dénombrement des unités formant colonies (UFC) de levures et de moisissures.

9.3 Incubation

Après la solidification de la gélose, retourner les boîtes de Petri et les ranger dans un incubateur (6.6) à (25 ± 1) °C pendant 3 à 5 jours.

10 Dénombrement des colonies

Avant d'examiner les boîtes de Petri échantillons incubées, vérifier les boîtes témoins afin de déceler la présence de colonies de levures et de moisissures. Si des boîtes témoins sont contaminées, le mode opératoire doit être répété dans sa totalité.

Compter le nombre d'unités formant colonie (UFC) de levures et de moisissures en utilisant le dispositif grossissant, si approprié (6.9). Noter le nombre de colonies trouvées sur chaque boîte de Petri incubée.

Si nécessaire, effectuer un examen à l'aide d'une loupe binoculaire ou d'un microscope afin de différencier les cellules de levures ou de moisissures des colonies de bactéries.

Pour des raisons statistiques, il est préférable de sélectionner des boîtes de Petri ayant 15 à 150 colonies par boîte pour le dénombrement des levures et des moisissures. Pour les échantillons non dilués, 15 colonies ou moins sont acceptables.

Si plus d'un tiers d'une boîte est recouvert de levures et de moisissures envahissantes, la boîte doit être éliminée. Si plus de deux boîtes sont éliminées, le mode opératoire d'essai doit être répété à partir de 8.2.

Si, après avoir répété l'essai, plus de deux boîtes sont éliminées, le résultat global doit être reporté comme étant «indénombrable en raison de la présence de colonies envahissantes».

Lire les boîtes entre 3 et 5 jours d'incubation. Sélectionner les boîtes (9.3) contenant moins de 150 colonies et compter ces colonies. Observer les boîtes après 3 jours et afin de s'assurer que la croissance est appropriée, compter les colonies après 5 jours. Si l'on observe un envahissement rapide des boîtes, compter les colonies après 3 jours, puis de nouveau après 5 jours d'incubation.

NOTE 1 Les méthodes de dénombrement des levures et en particulier des moisissures sont imprécises du fait qu'elles consistent en un mélange de mycélium, de spores asexuées et sexuées. Le nombre d'unités formant colonie dépend du degré de fragmentation du mycélium et de la proportion de spores capables de se développer sur le milieu.