
Norme internationale



7704

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

Qualité de l'eau — Évaluation des membranes filtrantes utilisées pour des analyses microbiologiques

Water quality — Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses

Première édition — 1985-03-15

ITh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 7704:1985](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e484983-3be9-4164-8512-a6c27509f037/iso-7704-1985>

CDU 628.163.067 : 579.68.08

Réf. n° : ISO 7704-1985 (F)

Descripteurs : eau, qualité, analyse microbiologique, membrane, filtre, essai.

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 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 7704 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

[ISO 7704:1985](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e484983-3be9-4164-8512-a6c27509f037/iso-7704-1985)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e484983-3be9-4164-8512-a6c27509f037/iso-7704-1985>

Qualité de l'eau — Évaluation des membranes filtrantes utilisées pour des analyses microbiologiques

0 Introduction

De nombreuses études comparatives effectuées sur des membranes filtrantes font état de différences importantes entre les diverses compositions chimiques, les diverses sortes et les différents lots de membranes, en ce qui concerne leur capacité à retenir les bactéries des échantillons d'eau.

Il est donc très important que l'un des outils de base de la microbiologie aquatique, en l'occurrence la membrane filtrante, soit normalisé autant que possible, non seulement pour obtenir des résultats homogènes mais aussi pour permettre l'élaboration de procédures normalisées pour la numération de micro-organismes spécifiques.

1 Objet

1.1 La présente Norme internationale spécifie des méthodes d'évaluation et de comparaison de membranes filtrantes conçues pour la numération d'organismes spécifiques et de populations microbiennes mixtes.

1.2 Les méthodes fournissent une ligne de conduite générale pour la comparaison du taux de rétention des bactéries, des levures et d'autres champignons sur les membranes filtrantes par rapport aux taux obtenus par les techniques d'étalement en surface et d'incorporation en gélose.

2 Domaine d'application

2.1 La présente méthode est applicable pour l'évaluation, par les utilisateurs, de tout filtre microporeux destiné à l'analyse d'échantillons d'eau. Elle s'applique aux filtres de toute porosité pouvant être utilisés dans les conditions décrites.

2.2 Pour certaines applications particulières, il est possible que des milieux, une température et une durée d'incubation, une atmosphère de même que des témoins (technique par étalement en surface ou par incorporation en gélose) appropriés soient à employer. Les résultats obtenus pour une espèce ou un groupe de micro-organismes peuvent ne pas être valables pour d'autres groupes.

3 Définition

membrane filtrante : Milieu de filtration mince, non fibreux, pour les liquides et les gaz, dont le diamètre moyen des pores est supérieur à 0,01 µm et sur lequel les particules plus grandes

que la grandeur des pores sont retenues à la surface ou près de la surface lorsqu'on applique une aspiration ou une pression.

4 Principe

4.1 Filtration d'échantillons aqueux ou de cultures pures en suspension liquide au travers des membranes filtrantes d'essai, à l'aide de techniques conventionnelles. Au minimum, cinq répétitions par échantillon sont nécessaires. On considère qu'un total de 200 colonies est le nombre minimal permettant d'effectuer des comparaisons statistiques.

4.2 Évaluation de l'efficacité de chaque type de membrane filtrante

a) par comparaison des numérations obtenues sur un milieu non sélectif à l'aide des méthodes par étalement en surface ou par incorporation en gélose et de celles obtenues à l'aide de la méthode par filtration sur membrane sur le même milieu (dans ces conditions, les meilleurs résultats obtenus expérimentalement par filtration sur membrane ne représentent que 80 à 90 % de ceux obtenus par étalement en surface);

b) par comparaison des résultats obtenus pour des organismes spécifiques, sur un milieu sélectif des membranes filtrantes, à l'aide des méthodes par étalement en surface ou par incorporation en gélose, et de ceux obtenus à l'aide de la méthode par filtration sur membrane sur le même milieu.

NOTE — Il se peut que la méthode par incorporation en gélose fournisse moins de colonies que la méthode par étalement en surface.

5 Diluants, milieux de culture et réactifs

5.1 Composants de base

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des diluants et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture et des réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Les mesurages du pH doivent être effectués au pH-mètre, les mesures étant rapportées à la température ambiante.

Si les milieux de culture préparés ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécification contraire, être conservés à l'obscurité à 4 ± 2 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

5.2 Diluant

Tout diluant stérile approprié peut être utilisé. L'emploi d'eau peptonée à 0,1 % (m/m) est recommandé pour la filtration sur membranes afin de réduire au minimum l'effet de choc que pourrait produire le contact de l'eau pure sur les micro-organismes.

5.3 Milieu gélosé

5.3.1 Milieu non sélectif

La gélose tryptone soja ou tout autre milieu semblable peut être utilisé dans le présent essai.

Préparer le milieu et verser une quantité déterminée de milieu soit dans des boîtes de Petri (dans le cas de numérations sur membranes filtrantes et de numérations par les techniques d'étalement en surface), soit dans des tubes appropriés (dans le cas d'incorporation en gélose). La couche de gélose dans les boîtes de Petri doit être d'au moins 3 mm. Tous les milieux utilisés pour chaque essai doivent être préparés à partir du même lot et en même temps.

5.3.2 Milieu sélectif

Les milieux utilisés doivent convenir aux organismes utilisés, en cultures, mixtes ou pures.

Préparer le milieu et verser une quantité déterminée de milieu soit dans des boîtes de Petri (dans le cas de numérations sur membranes filtrantes et de numérations par les techniques d'étalement en surface), soit dans des tubes appropriés (dans le cas d'incorporation en gélose). La couche de gélose dans les boîtes de Petri doit être d'au moins 3 mm. Tous les milieux utilisés pour chaque essai doivent être préparés à partir du même lot et en même temps.

6 Appareillage et verrerie

Nettoyer soigneusement toute la verrerie et l'équipement de filtration, en utilisant un détergent approprié dans de l'eau chaude; rincer à l'eau chaude puis avec de l'eau distillée.

Suivre les pratiques de laboratoire de microbiologie normalisées pour préparer la verrerie et l'équipement de filtration avant de les placer dans l'autoclave. Stériliser (voir 6.7) à 121 °C pendant 20 min par chaleur humide, ou à 170 °C pendant au moins 60 min par chaleur sèche.

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et

6.1 Unités de filtration sous vide pour membranes filtrantes, munies d'une fiole à filtrer sous vide, de tubes et d'un flacon destiné à retenir l'humidité.

6.2 Agitateur Vortex ou équipement semblable, pour mélanger les échantillons (facultatif).

6.3 Pincettes à mors plats (sans griffes).

6.4 Incubateur, bain d'eau ou cuve chauffante, réglables à diverses températures.

L'incubateur approprié doit être fréquemment contrôlé afin de s'assurer que la température désirée y règne bien pendant au moins 24 h. Pour cela, un thermomètre dont la précision a préalablement été vérifiée doit être placé à l'intérieur de l'incubateur, sur la tablette où seront placées les boîtes.

6.5 Compteur de colonies, à grossissement et éclairage appropriés.

6.6 Compteur manuel de colonies.

6.7 Autoclave ou autre équipement de stérilisation.

6.8 Table rotative (facultative) et **tige d'étalement** en verre.

6.9 Boîtes de Petri stériles, munies d'un couvercle percé de taille appropriée.

6.10 Pipettes jaugées stériles, de 0,1; 1,0 et 10 ml de capacités.

7 Préparation des échantillons

7.1 Qu'il s'agisse d'eau naturelle, d'échantillons d'eau de surface ou de cultures pures diluées pour évaluer les membranes filtrantes, il y aura lieu de procéder à une analyse avant l'essai, afin d'obtenir la dilution à utiliser (9.2.1). À tous les stades, bien mélanger (6.2) les échantillons ou les cultures afin d'obtenir une répartition homogène.

7.2 Si l'on utilise des cultures pures en état de stress ou non, établir la concentration des organismes d'essai sur un milieu approprié afin de s'assurer que l'on utilise bien le bon facteur de dilution pour obtenir la gamme de numérations appropriée (9.2.1).

7.3 Les échantillons utilisés pour établir les dilutions appropriées et les gammes de numérations adéquates peuvent servir au cours de l'essai définitif s'ils sont réfrigérés immédiatement après l'essai et s'ils ne sont pas conservés trop longtemps (pas plus de 48 h). Bien mélanger les échantillons afin de les homogénéiser au maximum.

8 Membranes filtrantes

Les membranes filtrantes doivent être stériles.

9 Mode opératoire

9.1 Ensemencement et incubation

Avant d'effectuer l'essai, faire sécher, dans des conditions aseptiques, les boîtes de Petri (6.9) contenant la gélose nutritive non sélective (5.3.1) ou la gélose sélective (5.3.2) vis-à-vis des organismes d'essai, en utilisant l'une des méthodes suivantes.

- a) Couvrir les boîtes de Petri et les entreposer en position renversée à l'obscurité (si le milieu est sensible à la lumière) et à une température de 25 à 30 °C pendant 15 à 17 h.
- b) Couvrir les boîtes de Petri et les entreposer en position renversée à l'obscurité et à une température de 45 à 50 °C pendant 2 à 3 h.
- c) Après avoir enlevé les couvercles, placer les boîtes de Petri dans une hotte à flux laminaire d'air filtré, à la température de la pièce, pendant 1 h. Si l'on choisit cette méthode, utiliser des dispositifs de vérification de la stérilité.

Les échantillons (voir chapitre 7) doivent être à disposition immédiate afin d'effectuer les essais sans délai. Utiliser le même échantillon pour ensemercer les différents milieux. Des volumes égaux, compris entre 0,1 et 0,5 ml d'une dilution appropriée de la culture, doivent être utilisés pour l'ensemencement des boîtes témoins ou pour la filtration sur membranes. Le volume de 0,5 ml ne doit pas être dépassé en raison des exigences de la méthode d'étalement en surface.

Afin d'éviter tout biais des résultats, les essais témoins par étalement en surface doivent être effectués en alternance avec l'essai sur membrane filtrante, en utilisant les mêmes milieux nutritifs ou sélectifs que pour l'essai sur membrane filtrante.

Si l'on compare plus d'une sorte de membranes filtrantes, celles-ci doivent être intercalées avec les essais témoins par étalement en surface ou par incorporation en gélose jusqu'à l'obtention du nombre requis de doubles à partir de l'échantillon spécifique.

Les milieux avec et sans membrane filtrante sont incubés après ensemencement dans des conditions de température et de durée appropriées aux organismes d'essai.

9.1.1 Méthode par filtration sur membrane

9.1.1.1 À l'aide des pinces stériles (6.3), prendre de façon aseptique une membrane filtrante (chapitre 8) à essayer et la centrer, le côté quadrillé vers le haut, sur la base du support du filtre. Placer l'entonnoir filtrant dans le montage et immobiliser à l'aide du support prévu à cette fin. Relier la fiole à filtrer et la valve à vide à une pompe à vide (voir 6.1).

9.1.1.2 En l'absence de vide, ajouter de 20 à 30 ml de diluant stérile (5.2). De façon aseptique, transférer (voir 6.10), dans l'eau de dilution de l'entonnoir, le même volume de la dilution d'échantillon homogénéisé que celui utilisé pour la méthode par étalement en surface (9.1.1.1). Faire le vide et filtrer entièrement le contenu. Toujours sous vide, rincer deux fois l'entonnoir, avec 20 à 30 ml d'eau de dilution stérile. Arrêter la pompe

à vide dès que l'eau du dernier rinçage est passée à travers le filtre. Enlever l'entonnoir filtrant puis, au moyen de pinces stériles, la membrane filtrante de la base.

9.1.1.3 Placer la membrane examinée soit sur le milieu non sélectif (5.3.1), soit sur le milieu sélectif (5.3.2), selon l'ordre de rotation. Dérouler la membrane filtrante sur la surface gélosée de la boîte de Petri, en s'assurant qu'il n'y a pas d'air emprisonné entre la membrane et la surface de gélose. Si l'on remarque la présence d'une bulle d'air, soulever la membrane afin d'éliminer l'air et la déposer de nouveau sur la gélose.

9.1.1.4 Toutes les boîtes doivent être incubées (voir 6.4) à la température et pendant la durée appropriées à la nature des organismes utilisés pour l'essai.

9.1.2 Méthode par étalement en surface

9.1.2.1 De façon aseptique, transférer (voir 6.10) et étaler [à l'aide de la tige d'étalement en verre (6.8) préalablement trempée dans de l'alcool et passée à la flamme] 0,1 à 0,5 ml de la dilution appropriée de l'échantillon sur la surface préséchée du milieu gélosé nutritif non sélectif ou du milieu gélosé sélectif des membranes filtrantes. Une table rotative peut être utilisée pour étaler l'inoculum uniformément sur la surface de la plaque. Remettre les couvercles des boîtes de Petri et laisser les parties aliquotes d'échantillon s'absorber complètement avant de renverser les boîtes.

9.1.2.2 Toutes les boîtes doivent être incubées (voir 6.4) dès que possible après absorption de l'humidité, à la température et pendant la durée appropriées à la nature des organismes utilisés pour l'essai.

9.1.3 Méthode par incorporation en gélose

9.1.3.1 De façon aseptique, transférer (voir 6.10) le même volume de la dilution d'échantillon homogénéisé que celui utilisé pour la méthode par étalement en surface (9.1.2.1) au fond d'une boîte de Petri stérile (6.9). Ajouter une quantité donnée de gélose fondue (45 °C), soit de la gélose nutritive non sélective (5.3.1), soit de la gélose sélective (5.3.2) des membranes filtrantes, et mélanger soigneusement les deux solutions par des mouvements de va-et-vient et circulaires.

9.1.3.2 Laisser la gélose se solidifier complètement, puis renverser la boîte de Petri et incubé (voir 6.4) pendant la durée et à la température requises.

9.1.3.3 Afin d'assurer le contrôle de stérilité de la gélose, étaler plusieurs tubes de gélose fondue dans des boîtes.

9.2 Interprétation

9.2.1 Numération des colonies (méthode par filtration sur membrane)

Utiliser le compteur de colonies (6.5) pour la numération, à la surface de la membrane, de toutes les colonies typiques (provenant d'échantillons mixtes ou de cultures pures). Si l'on a utilisé plus d'une dilution d'un échantillon pour l'essai, la dilution choi-

sie pour la numération devrait idéalement contenir de 25 à 100 colonies et l'on devrait avoir un nombre suffisant de doubles afin d'obtenir au moins 200 colonies par traitement.

9.2.2 Numération des colonies (méthodes par étalement en surface et par incorporation en gélose)

La même dilution d'échantillon choisie pour la numération sur la membrane doit être utilisée pour l'étalement en surface et pour l'incorporation en gélose aux fins de comparaison des taux de rétention. Utiliser le compteur de colonies (6.5) pour faciliter la numération (voir 6.6) de toutes les colonies situées à la surface ainsi qu'au-dessous de cette surface (couche inférieure). Suivre les techniques usuelles de numération telles qu'établies au laboratoire de l'expérimentateur.

10 Expression des résultats

10.1 Mode de calcul

Pour chaque échantillon utilisé pour l'essai, calculer la moyenne arithmétique des numérations de l'organisme cible à partir de cinq répétitions (ou plus) pour chaque traitement.

Le taux de rétention, R , exprimé en pourcentage, pour chaque échantillon, est donné par l'équation

$$R = \frac{m_m}{m_c} \times 100$$

où

m_m est la moyenne des numérations effectuées sur membrane filtrante;

m_c est la moyenne des numérations obtenues par étalement en surface ou par incorporation en gélose.

10.1.1 Établir le pourcentage de rétention à partir des résultats de numérations par membrane filtrante et par boîte avec gélose non sélective.

10.1.2 Établir le pourcentage de rétention à partir des résultats des numérations par membrane filtrante et par boîte avec gélose sélective.

10.2 Interprétation des résultats

10.2.1 Lorsqu'on évalue les variations entre différents lots de membranes filtrantes produits par un même fabricant, les numérations obtenues pour un lot donné doivent se situer dans l'intervalle de confiance à 95 % du lot de comparaison pour être considérées comme équivalentes à ce lot.

L'intervalle de confiance à 95 % se calcule à l'aide des formules

$$m + 2 (\sqrt{m+1} + 1) \text{ pour la limite supérieure}$$

$$m - 2 (\sqrt{m+1} - 1) \text{ pour la limite inférieure}$$

où m est la moyenne arithmétique des numérations bactériennes obtenues sur le lot de membranes filtrantes témoins.

10.2.2 Lorsqu'on compare les numérations sur membranes filtrantes à celles obtenues dans des boîtes (noter que c'est par la méthode d'étalement en surface qu'on obtient les numérations les plus élevées sur boîtes; aussi est-il recommandé d'employer cette méthode), les membranes produisant des numérations de 80 % ou plus par rapport aux numérations des boîtes témoins sont considérées comme acceptables. Si une membrane est utilisée aux seules fins de la numération d'organismes spécifiques, on utilise les données relatives aux milieux sélectifs.

10.2.3 Considérer une marque ou un type particulier de membrane, de préférence uniquement s'il fournit des numérations moyennes de colonies, m_m , de 20 % ou plus de colonies que les autres membranes.

11 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus, en précisant clairement le mode d'expression utilisé. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente Norme internationale, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de la membrane filtrante, des cultures, des milieux et des diluants utilisés.

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7704:1985

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e484983-3be9-4164-8512-a6c27509f037/iso-7704-1985>

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7704:1985

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/7e484983-3be9-4164-8512-a6c27509f037/iso-7704-1985>