
**Qualité de l'eau — Recherche et
dénombrement des entérocoques
intestinaux dans les eaux de surface et
résiduares —**

Partie 1:

Méthode miniaturisée (nombre le plus
probable) par ensemencement en milieu
liquide

ISO 7899-1:1998

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d467bc16-cf82-4ccd-b2bc-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d467bc16-cf82-4ccd-b2bc-c452260d8787/iso-7899-1-1998)

*Water quality — Detection and enumeration of intestinal enterococci in
surface and waste water —*

*Part 1: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid
medium*



Sommaire

	Page
1	1
2	1
3	2
4	2
5	2
6	3
7	3
8	5
9	6
10	7
11	7
Annexe A (informative) Exemple de logiciel pour une analyse statistique des NPP	8
Annexe B (informative) Exemple de logiciel en BASIC pour le calcul des NPP	11
Annexe C (informative) Sel de mer synthétique.....	13
Annexe D (informative) Caractéristiques de performance de la méthode	14
Annexe E (normative) Critères de qualité pour la fabrication du milieu en microplaques	15
Annexe F (normative) Procédure de préparation de microplaques d'étalonnage	17
Annexe G (informative) Bibliographie	19

© ISO 1998

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'éditeur.

Organisation internationale de normalisation
Case postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse
Internet iso@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 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.

La Norme internationale ISO 7899-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

ISO 7899-1:1998

<https://standards.iso.org/standards/catalogue.html> Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 7899-1:1984), dont elle constitue une révision technique.

L'ISO 7899 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduaires*:

- *Partie 1: Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) par ensemencement en milieu liquide*
- *Partie 2: Méthode par filtration sur membrane*

Les annexes E et F font partie intégrante de la présente partie de l'ISO 7899. Les annexes A, B, C, D et G sont données uniquement à titre d'information.

Introduction

Le but de cette partie de l'ISO 7899 est de mettre en évidence les principaux entérocoques intestinaux, à savoir *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* et *E. hirae*, fréquemment rencontrés dans les excréments de l'homme et des animaux homéothermes. D'autres souches de streptocoques fécaux, à savoir *E. avium*, *E. cecorum*, *E. columbae* et *E. gallinarum* ainsi que *Streptococcus bovis/equinus* peuvent à l'occasion être comptées, mais elles ne s'observent que rarement dans les échantillons de l'environnement. Leur récupération tend à être faible. *Enterococcus casseliflavus* et *E. mundtii* sont des espèces non fécales qui, présentes dans des échantillons d'eau (à cause de matériel végétal ou d'effluents industriels), pourront être dénombrés comme entérocoques fécaux. Ces espèces et d'autres espèces rares non fécales tendent à produire un pigment jaune sur un milieu non sélectif. La possible interférence des espèces non fécales d'*Enterococcus* devrait par conséquent être prise en compte dans l'interprétation des résultats.

(standards.iteh.ai)

ISO 7899-1:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d467bc16-cf82-4ccd-b2bc-cfe4322bdcd8/iso-7899-1-1998>

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduaires —

Partie 1:

Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) par ensemencement en milieu liquide

1 Domaine d'application

La présente partie de ISO 7899 spécifie une méthode miniaturisée pour la recherche et le dénombrement des entérocoques intestinaux majeurs dans les eaux de surface et résiduaires par ensemencement en milieu liquide. La présente méthode est applicable à tous les types d'eaux de surface et résiduaires, plus particulièrement celles riches en matières en suspension.

La présente méthode n'est pas applicable à l'eau potable ou tout autre type d'eau dont la valeur guide est inférieure à 15 pour 100 ml.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 7899. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie de l'ISO 7899 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 3951:1989, *Règles et tables d'échantillonnage pour les contrôles par mesures des pourcentages de non conformes.*

ISO 5667-1:1980, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1: Guide général pour l'établissement des programmes d'échantillonnage.*

ISO 5667-2:1991, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

ISO 5667-3:1994, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3: Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.*

ISO 8199:1988, *Qualité de l'eau — Guide général pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.*

ISO/CEI Guide 2:1996, *Normalisation et activités connexes — Vocabulaire général.*

3 Définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 7899, les définitions données dans le Guide 2 ISO/CEI ainsi que la définition suivante s'appliquent.

3.1

entérocoques intestinaux

micro-organismes capables de croître en aérobiose à 44 °C et d'hydrolyser le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucoside (MUD) en présence d'acétate de thallium, d'acide nalidixique et de chlorure 2,3,5-triphényl-tétrazolium (TTC) dans le milieu liquide spécifié

4 Principe

L'échantillon dilué est ensemencé dans une série de puits d'une microplaque contenant le milieu de culture déshydraté.

Les microplaques sont examinées sous rayonnement ultraviolet à 366 nm dans l'obscurité après une période d'incubation de 36 h minimum et 72 h maximum à 44 °C \pm 0,5 °C. La présence d'entérocoques est indiquée par une fluorescence résultant de l'hydrolyse du MUD. Les résultats sont donnés en nombre le plus probable (NPP) par 100 ml.

5 Appareillage

À l'exclusion du matériel livré stérile, la verrerie doit être stérilisée conformément aux instructions données dans l'ISO 8199.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

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

5.1 Appareillage pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave).

5.2 Étuve thermostatée, réglée à 44 °C \pm 0,5 °C.

5.3 Tunnel de séchage ou hotte à flux laminaire vertical (de préférence de classe II).

5.4 Chambre d'observation UV (lampe de Wood, 366 nm).

AVERTISSEMENT — La lumière UV cause une irritation des yeux et de la peau. Utiliser des lunettes et gants de protection.

5.5 Réfractomètre portable (optionnel).

5.6 pH-mètre, ayant une précision de \pm 0,1.

5.7 Tubes à essai, de dimensions 16 mm \times 160 mm et 20 mm \times 200 mm, ou **foies de capacités similaires**.

5.8 Multipipette à 8 canaux, réglable ou préréglée, ou tout système convenable pour mesurer et distribuer 200 μ l par puits.

5.9 Cônes stériles pour multipipette.

5.10 Matériel pour filtration sur membrane, conformément à l'ISO 8199, y compris filtres à membrane ayant une porosité nominale de 0,2 μ m, pour la stérilisation de liquides.

5.11 Microplaques stériles, à 96 puits de 350 µl, à fond plat, non fluorescentes.

5.12 Bandes adhésives stériles pour la fermeture des microplaques.

5.13 Boîtes de Petri stériles, de diamètre 90 mm.

6 Échantillonnage

Prélever les échantillons et les livrer au laboratoire conformément à l'ISO 8199 ainsi qu'à l'ISO 5667-1, l'ISO 5667-2 et l'ISO 5667-3.

7 Milieu de culture et diluant

7.1 Prescriptions générales

Pour garantir des résultats reproductibles, préparer le milieu de culture et les diluants à l'aide soit de constituants de qualité uniforme et de produits chimiques de qualité analytique reconnue, soit d'un diluant déshydraté ou d'un milieu complet déshydraté, préparés conformément aux instructions du fabricant. Les préparer avec de l'eau déminéralisée ou distillée exempte de substances pouvant inhiber la croissance dans les conditions de l'essai. Si les milieux ne sont pas utilisés immédiatement, les conserver dans l'obscurité à (5 ± 3) °C pour une période inférieure à 1 mois et dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

NOTE L'utilisation de produits chimiques d'autres qualités est permise, sous réserve de démontrer qu'ils ont une performance équivalente pour l'essai.

7.2 Diluants

ISO 7899-1:1998
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d467bc16-cf82-4ccd-b2bc-cfe4322bdcd8/iso-7899-1-1998>

7.2.1 Diluant spécial (DS)

Composition:

Sel marin synthétique ¹⁾	22,5 g
Solution de bleu de bromophénol (optionnel)	10 ml
Eau déminéralisée ou distillée (7.2.2)	1000 ml

Stériliser à l'autoclave (5.1) à 121 °C \pm 3 °C pendant 15 min à 20 min.

La solution de bleu de bromophénol est préparée en ajoutant 0,04 g dans 100 ml d'éthanol à 50 %. Elle est utilisée pour colorer le DS en bleu et éviter de le confondre avec l'eau déminéralisée ou distillée.

7.2.2 Eau déminéralisée ou distillée, exempte de substances inhibant la croissance dans les conditions de l'essai.

Stériliser à l'autoclave (5.1) à 121 °C \pm 3 °C pendant 20 min.

1) Une analyse type d'un sel de mer synthétique convenable et disponible dans le commerce est donnée dans l'annexe C. Des solutions de NaCl pur ne conviennent pas, car elles entraînent une inhibition prononcée.

7.3 Milieu de culture: milieu MUD/SF

7.3.1 Composition

7.3.1.1 Solution A

Tryptose	40 g
KH ₂ PO ₄	10 g
D(+)-galactose	2 g
Polyoxyéthylènesorbitane monooléate (Tween® 80 2))	1,5 ml
Eau déminéralisée ou distillée (7.2.2)	900 ml

À 900 ml d'eau, ajouter tryptose, KH₂PO₄, galactose et Tween® 80, tout en maintenant un chauffage doux et une agitation magnétique, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Laisser refroidir.

7.3.1.2 Solution B

NaHCO ₃	4 g
Acide nalidixique	250 mg
Eau déminéralisée ou distillée (7.2.2)	50 ml

Ajouter les deux composants à 50 ml d'eau, tout en maintenant un chauffage doux et une agitation magnétique. Laisser refroidir.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

7.3.1.3 Solution C

Acétate de thallium (I)	2 g
Chlorure de 2,3,5-triphényl-2H-tétrazolium	0,1 g
Eau déminéralisée ou distillée (7.2.2)	50 ml

Ajouter les deux composants à 50 ml d'eau distillée, tout en maintenant un chauffage doux et une agitation magnétique. Laisser refroidir.

7.3.1.4 Solution D

MUD (4-méthylumbelliféryl-β-D-glucoside)	150 mg
<i>N,N</i> -diméthylformamide	2 ml

AVERTISSEMENT — L'acétate de thallium et le *N,N*-diméthylformamide sont toxiques. Utiliser sous une hotte d'aspiration de vapeurs chimiques.

7.3.2 Préparation

Mélanger les solutions A+B+C+D.

Ajuster le pH à 7,5 ± 0,2.

Stériliser par filtration sur membrane de porosité moyenne de 0,2 µm (5.10).

Répartir en microplaques de 96 puits (5.11) à raison de 100 µl de milieu par puits (capacité minimale de 350 µl) et déshydrater immédiatement sous tunnel de séchage ou hotte à flux laminaire (5.3).

La fabrication du milieu doit respecter les critères de qualité donnés à l'annexe E.

2) Tween® 80 est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 7899 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

8 Mode opératoire

8.1 Choix des dilutions

Le nombre de dilutions à ensemercer varie en fonction du niveau de contamination présumé de l'eau à analyser. Le tableau 1 donne quelques exemples.

Tableau 1

Origine de l'échantillon	Nombre de dilutions	Nombre de puits/dilution	Plage de mesure, bactéries par 100 ml
Eaux de baignade	2	64 puits au 1/2 32 puits au 1/20	15 à $3,5 \times 10^4$
Autres eaux de surface	4	24 puits au 1/2 24 puits au 1/20 24 puits au 1/200 24 puits au 1/2 000	40 à $3,2 \times 10^6$
Eaux résiduaires et stations d'épuration	6	16 puits au 1/2 jusqu'à 16 puits au 1/200 000	60 à $6,7 \times 10^8$

8.2 Préparation des dilutions

NOTE Il est recommandé d'utiliser des modes opératoires dans un poste de sécurité biologique, la dilution et le pipetage pouvant produire des aérosols.

8.2.1 Eaux douces et eaux saumâtres (usées) [salinité < 30 g/kg, mesurée à l'aide d'un réfractomètre (5.5) ou de méthodes équivalentes]

Préparer, sur un portoir, le nombre de tubes stériles (5.7) correspondant au nombre de dilutions choisies. Introduire dans chacun d'eux 9 ml de diluant spécial (7.2.1).

Agiter vigoureusement l'échantillon (voir l'article 6) afin d'obtenir une répartition homogène des micro-organismes et transférer immédiatement, à l'aide d'une pipette stérile, 9 ml de cet échantillon homogénéisé dans le premier des tubes contenant 9 ml de diluant (7.2.1) (dilution 1/2).

Avec une nouvelle pipette, transférer 1 ml de cette dilution (homogénéisée) dans le deuxième tube (dilution 1/20).

À partir du deuxième tube (dilution 1/20 soigneusement homogénéisée), procéder, si nécessaire, à une autre dilution à 1/10 afin d'obtenir la dilution suivante (1/200).

Continuer ainsi jusqu'à ce que toutes les dilutions aient été préparées.

8.2.2 Eaux de mer (salinité \geq 30 g/kg)

Préparer, sur un portoir, le nombre de tubes stériles (5.7) correspondant au nombre de dilutions choisies. Introduire dans le premier tube 9 ml d'eau déminéralisée ou distillée (7.2.2) et dans les suivants 9 ml de diluant spécial (7.2.1).

Agiter vigoureusement l'échantillon (voir l'article 6) afin d'obtenir une répartition homogène des micro-organismes et transférer immédiatement, à l'aide d'une pipette stérile, 9 ml de cet échantillon homogénéisé dans le premier des tubes contenant 9 ml de diluant (7.2.2) (dilution 1/2).

Avec une nouvelle pipette stérile, transférer 1 ml de cette dilution (homogénéisée) dans le deuxième tube (dilution 1/20).

À partir du deuxième tube (dilution 1/20 soigneusement homogénéisée), procéder, si nécessaire, à une autre dilution à 1/10 afin d'obtenir la dilution suivante (1/200).

Continuer ainsi jusqu'à ce que toutes les dilutions aient été préparées.

8.3 Ensemencement et incubation des microplaques

8.3.1 Ensemencement

Transférer le contenu du premier tube de dilution dans une boîte de Petri vide, stérile, de diamètre d'au moins 90 mm.

À l'aide de la pipette multicanaux (5.8) munie de huit cônes stériles (5.9), répartir 200 µl dans chacun des puits de la microplaque (5.11) correspondant à cette première dilution.

Pour chacune des dilutions suivantes (1/20, 1/200, etc.), opérer de manière identique en changeant la boîte de Petri et la rangée de huit cônes stériles entre chaque dilution.

De façon équivalente, tout autre système convenable (5.8) peut être utilisé pour répartir 200 µl de chaque dilution par puits, selon le tableau 1.

ATTENTION — Éviter les contaminations par débordement d'un puits à l'autre.

8.3.2 Incubation

Une fois la microplaqueensemencée, la recouvrir d'une bande adhésive stérile (5.12) à usage unique, prévue à cet effet.

Incuber la microplaque à l'étuve (5.2) à 44 °C ± 0,5 °C pendant au minimum 36 h et au maximum 72 h.

NOTE Il convient de manipuler les microplaques avec précaution, sans les pencher.

8.4 Lecture des résultats

Placer chaque microplaque, recouverte d'une bande adhésive, dans la chambre d'observation UV (5.4).

Considérer comme positifs les puits dans lesquels on observe une fluorescence bleue.

NOTE La fluorescence n'évoluant pas avec le temps, la lecture peut être effectuée à tout moment après 36 h.

9 Expression des résultats

9.1 Détermination du nombre caractéristique

Pour chacune des dilutions choisies, noter le nombre de puits positifs (+).

Lorsque trois dilutions ou plus ont étéensemencées, un nombre caractéristique de 3 chiffres, le dernier étant 0 si possible, doit être consigné conformément à l'ISO 8199.

EXEMPLE 1: Eau de baignade

1/2 32 (+) sur 64

1/20 5 (+) sur 32

Consigner 32/5 comme étant le nombre caractéristique.

EXEMPLE 2: Autres eaux de surface

1/2 24 (+) sur 24

1/20 18 (+) sur 24

1/200 5 (+) sur 24

1/2 000 1 (+) sur 24

Consigner 18/5/1 comme étant le nombre caractéristique.

EXEMPLE 3: Eau résiduaire

1/2	16 (+) sur 16
1/20	16 (+) sur 16
1/200	12 (+) sur 16
1/2 000	5 (+) sur 16
1/20 000	0 (+) sur 16
1/200 000	0 (+) sur 16

Consigner 12/5/0 comme étant le nombre caractéristique.

9.2 Calcul du NPP et de son intervalle de confiance

Le NPP est une estimation statistique de la densité des micro-organismes, supposée répondre à une distribution de Poisson dans les volumes ensemencés. Des intervalles de confiance sont attachés à ce NPP.

Les logiciels présentés à l'annexe A et à l'annexe B permettent pour chaque configuration d'ensemencement de calculer le NPP d'entérocoques intestinaux par millilitre d'eau et l'intervalle de confiance à 95 %.

Pour les exemples qui suivent, NC est le nombre caractéristique, LI est la limite inférieure, et LS est la limite supérieure.

EXEMPLE 1:

Si NC = 32/5, le logiciel à l'annexe A donne 7,56 entérocoques par millilitre

(LI = 5,42; LS = 10,54)

Soit 756/100 ml (542 à 1 054).

EXEMPLE 2:

Si NC = 18/5/1, le logiciel à l'annexe A donne 159,08 par millilitre

(LI = 101,99; LS = 248,11)

EXEMPLE 3:

Si NC = 12/5/0, le logiciel à l'annexe A donne 1 724,61 par millilitre

(LI = 1 003,98; LS = 2 962,50)

Si aucun puits n'est positif, exprimer le résultat sous la forme suivante:

$< n/100$ ml

où n est le NPP pour 1 puits positif dans les conditions de dilution utilisées.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit donner toutes les indications nécessaires à l'identification complète de l'échantillon, la référence à la méthode utilisée et les résultats.

Le rapport d'essai doit en outre mentionner les phénomènes particuliers observés au cours de l'analyse et les opérations non spécifiées dans la méthode, ou considérées comme facultatives, ayant pu modifier les résultats.

11 Données de performance

Des informations sur la répétabilité et la reproductibilité de la procédure, obtenues à partir d'essais interlaboratoires, sont données à l'annexe D.