
Norme internationale



7899/2

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

**Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux —
Partie 2: Méthode par filtration sur membrane**

Water quality — Detection and enumeration of faecal streptococci — Part 2: Method by membrane filtration

Première édition — 1984-12-15

ITeH STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7899-2:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f38b814c-f88b-4da6-9bf3-78da2ff131d9/iso-7899-2-1984>

CDU 579.68 : 579.862.1

Réf. n° : ISO 7899/2-1984 (F)

Descripteurs : eau, qualité, essai, détection, bactérie, pollution de l'eau.

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 7899/2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7899-2:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/f38b814c-f88b-4da6-9b3-78da2ff131d9/iso-7899-2-1984>

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux —

Partie 2: Méthode par filtration sur membrane

0 Introduction

À travers le monde, les opinions divergent sur le fait de considérer les streptocoques comme indicateurs de pollution fécale. Dans la présente partie de l'ISO 7899, une méthode est décrite pour isoler les streptocoques possédant le groupe antigène D. Dans le cadre de l'examen de l'eau, ces organismes peuvent être considérés comme indicateurs de pollution fécale. Il se peut cependant qu'un petit nombre de streptocoques du groupe D trouvés dans l'eau proviennent également d'autres habitats. La sélectivité des milieux utilisés permet d'obtenir en pratique un comptage des streptocoques du groupe D, valable pour la plupart des cas. Dans cette méthode, à défaut d'une confirmation sérologique, on utilisera le terme « streptocoques fécaux ».

Dans certaines circonstances cependant une identification plus poussée et un groupement sérologique des streptocoques isolés peuvent être nécessaires.

L'ISO 7899 comprend les parties suivantes:

- Partie 1: Méthode par enrichissement en milieu liquide.
- Partie 2: Méthode par filtration sur membrane.

1 Objet

La présente partie de l'ISO 7899 spécifie une méthode pour la recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux dans les eaux, par filtration sur membrane.

2 Domaine d'application

La méthode peut être appliquée à tous les types d'eaux, excepté lorsque de grandes quantités de substances susceptibles d'être retenues par la membrane sont présentes.

3 Références

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

Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage.

Partie 3: Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.

ISO 7704, *Qualité de l'eau — Évaluation des membranes filtrantes utilisées pour des analyses microbiologiques.*

4 Définitions

4.1 streptocoques présumés fécaux: Bactéries donnant une réaction positive avec les milieux (6.2.1 et 6.2.2) spécifiés dans la présente partie de l'ISO 7899.

4.2 streptocoques fécaux: Bactéries, donnant une réaction positive avec le milieu (6.2.3) spécifié dans la présente partie de l'ISO 7899, et donnant une réaction négative dans l'essai à la catalase.

5 Principe et réactions

5.1 Filtration, incubation et dénombrement

Le dénombrement des streptocoques fécaux est basé sur la filtration d'un volume donné d'échantillon d'eau à travers une membrane filtrante de porosité (0,45 µm) suffisante pour retenir les bactéries.

La membrane est placée sur un milieu sélectif contenant de l'azoture de sodium (destiné à inhiber la croissance des bactéries gram-négatives) et du chlorure de triphényl-2, 3, 5 tétrazolum comme indicateur incolore, réduit en rouge par les streptocoques fécaux.

Après incubation, toutes les colonies développées qui présentent une couleur rouge, marron ou rose, soit en leur centre soit à leur périphérie, sont dénombrées comme streptocoques présumés fécaux.

5.2 Confirmation

Une confirmation sur un milieu plus sélectif peut être réalisée si nécessaire.

Le milieu de confirmation, gélose biliée à l'esculine et à l'azoture, est incubé à 44 °C pendant 48 h. Les streptocoques fécaux se développent sur ce milieu et hydrolysent l'esculine; le produit final, la dihydroxy-6, 7 coumarine, se combine avec les ions fer(III) pour donner un composé de coloration foncée à noire qui diffuse dans le milieu.

En complément, un essai à la catalase est effectué avec les colonies suspectes sur un milieu de confirmation solide.

Les colonies qui donnent une réaction à l'esculine positive et sont catalase-négatives peuvent être considérées comme streptocoques fécaux.

6 Milieux de culture et réactifs

AVERTISSEMENT — Tous les milieux sélectifs décrits dans la présente partie de l'ISO 7899 contiennent de l'azoture de sodium. Cette substance étant très toxique, des précautions doivent être prises pour éviter tout contact avec elle, en particulier par inhalation de fines poussières lors de la préparation des milieux complets déshydratés disponibles dans le commerce. Les milieux contenant de l'azoture ne doivent pas être mélangés avec des acides minéraux forts car de l'acide azothydrique (HN₃) toxique peut être produit. Les solutions contenant de l'azoture sont également susceptibles de former des composés explosifs au contact de canalisations métalliques, par exemple celles des éviers.

6.1 Composants de base.

Pour l'uniformité des résultats, utiliser, pour la préparation des milieux, soit des composants de qualité homogène et des produits chimiques de qualité analytique reconnue, soit un milieu complet déshydraté.

L'azoture de sodium se dégrade au cours du temps, aussi les milieux complets déshydratés ont une durée de stockage limitée.

Utiliser uniquement de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente.

6.2 Milieux de culture.

6.2.1 Gélose KF pour streptocoques (Kenner)

6.2.1.1 Milieu de base

protéose peptone	10,0 g
extrait de levure	10,0 g
chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g

glycérophosphate de sodium	10,0 g
maltose	20,0 g
lactose	1,0 g
azoture de sodium (NaN ₃)	0,4 g
pourpre de bromocrésol (solution à 15 g/l dans l'éthanol)	1 ml
agar-agar	12 à 20 g ¹⁾
eau	1 000 ml

Dissoudre les composants dans l'eau en chauffant dans un bain d'eau à ébullition.

Après dissolution complète, poursuivre le chauffage pendant 5 min.

Laisser refroidir entre 50 et 60 °C.

6.2.1.2 Solution de TTC

chlorure de triphényl-2, 3, 5 tétrazolium	1 g
eau	100 ml

Dissoudre l'indicateur dans l'eau en agitant.

Stériliser par filtration (0,22 µm).

Protéger la solution de la lumière.

6.2.1.3 Milieu complet

milieu de base (6.2.1.1)	1 000 ml
solution de TTC (6.2.1.2)	10 ml

Ajouter la solution de TTC au milieu de base refroidi entre 50 et 60 °C. Le TTC est thermolabile, aussi doit-on éviter de surchauffer.

Ajuster si nécessaire le pH à 7,2 avec une solution stérile de carbonate de sodium à 100 g/l.

Verser le milieu dans les boîtes de Petri sur une épaisseur d'au moins 3 mm et laisser refroidir sur une surface horizontale.

Les boîtes peuvent être conservées à l'obscurité jusqu'à 30 jours, à 4 ± 2 °C.

6.2.2 Gélose-m pour entérocoques (Slanetz et Bartley)

6.2.2.1 Milieu de base

tryptose	20,0 g
extrait de levure	5,0 g
glucose	2,0 g
monohydrophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	4,0 g
azoture de sodium (NaN ₃)	0,4 g
agar-agar	15,0 g
eau, q.s.p.	1 000 ml

Dissoudre les composants dans l'eau à ébullition.

Après dissolution complète, poursuivre le chauffage pendant 5 min.

Refroidir entre 50 et 60 °C.

1) Selon les instructions du fabricant.

6.2.2.2 Solution de TTC

Voir 6.2.1.2.

6.2.2.3 Milieu complet

milieu de base (6.2.2.1)	1 000 ml
solution de TTC (6.2.2.2)	10 ml

Ajouter la solution de TTC au milieu de base refroidi entre 50 et 60 °C.

Ajuster si nécessaire le pH à 7,2 avec une solution stérile de carbonate de sodium à 100 g/l.

Verser le milieu dans les boîtes de Petri sur une épaisseur d'au moins 3 mm et laisser refroidir sur une surface horizontale.

Les boîtes peuvent être conservées jusqu'à 30 jours à l'obscurité et entre 2 et 10 °C.

6.2.3 Gélose biliée à l'esculine et l'azoture

tryptone	17,0 g
peptone	3,0 g
extrait de levure	5,0 g
bile de bœuf, déshydratée	10,0 g
chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
esculine	1,0 g
citrate double de fer(III) et d'ammonium	0,5 g
azoture de sodium (NaN ₃)	0,15 g
agar-agar	12 à 20 g ¹⁾
eau	1 000 ml

Dissoudre les composants dans l'eau à ébullition.

Ajuster le pH de façon qu'après stérilisation, il soit de $7,1 \pm 0,1$ à 25 °C.

Répartir par volumes de 250 ml dans des bouteilles à bouchons à vis de 500 ml de capacité.

Stériliser le milieu pendant 15 min à 121 ± 1 °C.

Refroidir entre 50 et 60 °C, verser dans des boîtes de Petri sur une épaisseur d'au moins 3 mm et laisser refroidir sur une surface horizontale.

6.3 Peroxyde d'hydrogène, solution à 30 g/l.

7 Appareillage

Matériel courant pour laboratoire de microbiologie, et

7.1 Appareillage pour filtration sur membrane.

7.2 Membranes filtrantes stériles, de porosité nominale de 0,45 µm.

La qualité des membranes filtrantes peut varier d'une marque à l'autre mais également d'un lot à l'autre. Il est par conséquent conseillé d'en vérifier régulièrement la qualité selon l'ISO 7704.

7.3 Incubateur, pouvant être réglé à 35 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C.

7.4 Incubateur, pouvant être réglé à $44 \pm 0,5$ °C.

7.5 Autoclave, pouvant être réglé à 121 ± 1 °C.

8 Échantillonnage

Voir ISO 5667/1, ISO 5667/2, et ISO 5667/3.

9 Mode opératoire

9.1 Traitement des échantillons

Les généralités, telles que le traitement des échantillons, la préparation des dilutions, feront l'objet d'une future Norme internationale.

9.2 Filtration et incubation

Une description générale de la technique de filtration sur membrane fera l'objet d'une future Norme internationale.

Filtrer un volume adéquat d'eau.

Placer la membrane filtrante soit sur gélose KF pour streptocoques (6.2.1) soit sur gélose-m pour entérocoques (6.2.2).

Incuber les boîtes à 35 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C pendant 44 ± 4 h.

9.3 Dénombrement

Après incubation, dénombrer toutes les colonies apparues présentant une coloration rouge, marron ou rose, soit à leur centre, soit à leur périphérie. Considérer ces colonies comme streptocoques fécaux présumés.

NOTE — Parfois des bactéries autres que des streptocoques du groupe D peuvent produire ce type de colonie. Une élévation de la température d'incubation à $44 \pm 0,5$ °C, après incubation initiale pendant 5 ± 1 h à 37 ± 1 °C peut prévenir la croissance de ces organismes.

1) Selon les instructions du fabricant.

9.4 Confirmation

Procéder à une subculture d'un échantillon représentatif des colonies typiques sur une boîte de gélose biliée à l'esculine et à l'azoture (6.2.3).

Incuber à $44 \pm 0,5$ °C pendant 48 h.

Considérer comme positives les boîtes présentant une coloration foncée à noire des colonies et/ou du milieu environnant.

9.5 Essai à la catalase

Déposer 1 goutte de la solution de peroxyde d'hydrogène (6.3) sur les colonies situées sur la gélose biliée à l'esculine et à l'azoture (6.2.3). Le développement de bulles d'oxygène révèle des organismes catalase-positifs. Seules les colonies catalase-négatives doivent être dénombrées comme streptocoques fécaux.

NOTE — Afin d'éliminer les erreurs dues à des réactions faussement négatives à la catalase, pouvant se produire sur la gélose biliée de l'esculine et à l'azoture, l'essai peut être répété sur un repiquage sur un milieu non sélectif.

10 Expression des résultats

Une description générale de l'expression des résultats et le calcul du nombre de bactéries dans l'échantillon feront l'objet d'une future Norme internationale.

11 Procès-verbal d'essai

Le procès-verbal d'essai doit contenir les indications suivantes:

- a) la référence à la présente partie de l'ISO 7899;
- b) tout détail nécessaire à l'identification complète de l'échantillon;
- c) le milieu sélectif, la température d'incubation et les essais de confirmation utilisés;
- d) les résultats exprimés sous la forme du nombre de streptocoques fécaux par volume d'échantillon, comme indiqué dans le chapitre 10;
- e) le nombre de colonies ayant fait l'objet des essais de confirmation, ainsi que le nombre de colonies confirmées comme streptocoques fécaux.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 7899-2:1984

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/b38b814c-f88b-4da6-9b3-78da2ff131d9/iso-7899-2-1984>