NORME INTERNATIONALE

ISO
8199

Première édition
1988-06-15

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

Qualité de l'eau — Guide général pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture

iTeh STANDARD PREVIEW

Water quality — General guide to the enumeration of micro-organisms by culture

(standards.iteh.ai)

ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9d30ebf9-acc7-4701-86ec-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

Numéro de référence
ISO 8199 : 1988 (F)

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 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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

La Norme internationale ISO 8199 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau.*

ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9d30ebf9-acc7-4701-86ec-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

L'annexe A est donnée uniquement à titre d'information.

© Organisation internationale de normalisation, 1988 ●

Imprimé en Suisse

Introduction

Les techniques d'isolement et de dénombrement des micro-organismes, basées sur leur capacité à croître sur des milieux de culture spécifiés, sont un moyen important et largement utilisé pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau. Le but du présent guide est de réunir en un seul document les informations communes aux diverses techniques de dénombrement pour éviter la répétition des détails techniques dans chaque norme et pour faciliter le choix de la technique la plus appropriée à un problème donné.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9d30ebf9-acc7-4701-86ec-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9d30ebf9-acc7-4701-86ec-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

Qualité de l'eau — Guide général pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale présente des directives concernant des manipulations communes à chaque technique d'examen microbiologique de l'eau, en particulier la préparation des échantillons, les milieux de culture et l'appareillage. Elle décrit également les diverses méthodes de dénombrement possibles et les critères de choix d'une technique particulière.

2 Références normatives

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5c6a0e1b-ac67-4701-8bec-0e27af1ffe4/iso-8199-1988

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication de cette norme, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur cette Norme internationale 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 3534 : 1977, *Statistique — Vocabulaire et symboles.*

ISO 3696 : 1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécifications et méthodes d'essai.*

ISO 5667-2 : 1982, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2 : Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

ISO 5667-3 : 1985, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3 : Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.*

ISO 6887 : 1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

3 Principe

Le principe général de ces techniques consiste à ensemencer une quantité connue d'échantillon d'eau sur un milieu de culture (solide ou liquide). On suppose que pendant l'incubation chaque micro-organisme présent se multiplie pour donner soit une colonie visible directement sur milieu solide, soit des changements d'apparence dans un milieu liquide. Le choix de telle ou telle méthode ne dépend pas seulement de la nature des micro-organismes recherchés, mais également de la nature de l'eau et des raisons à l'origine de l'examen.

4 Sécurité et hygiène en laboratoire

Outre les directives générales et légales concernant la sécurité en laboratoire, une attention particulière ainsi qu'une hygiène personnelle très stricte sont requises pendant les travaux de microbiologie, en raison des risques toujours existants de contact avec des micro-organismes pathogènes. De plus, des milieux qui ne sont pas nécessairement conçus pour les agents pathogènes peuvent néanmoins favoriser leur croissance, de sorte que la manipulation et l'élimination de toutes les cultures requièrent la plus grande attention. Une technique scrupuleuse est la base de méthodes microbiologiques sûres et il est important que toute personne concernée par les travaux de microbiologie reçoive une formation appropriée. Il est également important que les installations et le matériel de laboratoire nécessaires soient conformes aux règles de sécurité et aux bonnes pratiques de laboratoire.

Certaines précautions sont essentielles en laboratoire, non seulement pour éviter la contamination des échantillons et des milieux de culture, mais également pour éviter les risques d'infection du personnel de laboratoire notamment

— observer scrupuleusement les précautions d'hygiène personnelle, couper court les ongles et porter des protections pour les cheveux et la barbe, si nécessaire;

— se laver les mains à l'eau chaude et au savon avant et après les travaux microbiologiques, ainsi qu'après chaque passage aux toilettes;

— porter des vêtements de protection au laboratoire;

— stériliser toutes les cultures à l'autoclave et stériliser et désinfecter les appareils et matériels entrés en contact avec elles avant de les jeter ou de les réutiliser;

— ne pas manger, boire ou fumer dans le laboratoire;

— signaler tout accident, liquide répandu ou événement inhabituel, à un responsable;

— dans le doute, demander conseil.

5 Diluants et milieux de culture

5.1 Généralités

Les composants entrant dans la préparation des milieux de culture doivent être de même qualité et les produits chimiques de qualité analytique reconnue. Il est également possible d'utiliser des milieux complets déshydratés. Les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée sur verre ou déminéralisée et exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance de micro-organismes dans les conditions de l'essai. Elle doit être conforme aux spécifications de l'ISO 3696, degré 3.

5.1.1 Stérilisation

Les diluants et les milieux de culture doivent être répartis dans des récipients supportant la stérilisation en autoclave. Dans la plupart des cas, une température de 121 °C ± 1 °C durant 15 min est appropriée. Toutefois, une durée et une température différentes peuvent parfois s'avérer nécessaires et les détails seront alors donnés dans chaque norme.

La stérilisation par filtration est également possible pour les substances thermolabiles.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/0f08a1f0-ec7-4701-96ac-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

5.2 Diluants

Un des diluants suivants devrait être utilisé.

5.2.1 Eau peptonée

Composition

Peptone	1,0 g
Eau, quantité suffisante pour	1 000 ml

Préparation

Dissoudre la peptone dans environ 950 ml d'eau. Ajuster le pH en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium [c(NaOH) = 1 mol/l] ou une solution d'acide chlorhydrique [c(HCl) = 1 mol/l], de sorte qu'après stérilisation le pH soit de 7,0 ± 0,1. Compléter avec de l'eau à 1 000 ml, répartir et stériliser.

5.2.2 Solution peptonée saline

Composition

Peptone	1,0 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau, quantité suffisante pour	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau et ajuster le pH en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium [c(NaOH) = 1 mol/l] ou une solution d'acide chlorhydrique [c(HCl) = 1 mol/l], de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,0 ± 0,1. Compléter avec de l'eau à 1 000 ml, répartir et stériliser.

5.2.3 Solution de Ringer — quart de concentration

Composition

Chlorure de sodium	2,25 g
Chlorure de potassium	0,105 g
Chlorure de calcium (anhydre)	0,12 g
Carbonate de sodium	0,05 g
Eau, quantité suffisante pour	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau et compléter à 1 000 ml.

5.2.4 Solution tampon de phosphate

Composition

Dihydrogénoorthophosphate de potassium (KH_2PO_4)	42,5 mg
Chlorure de magnésium ($MgCl_2$) (voir note)	190 mg
Eau	1 000 ml

Préparation

a) Solution de phosphate

Dissoudre 34 g de phosphate dans 500 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,2 ± 0,5 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l et compléter avec de l'eau distillée à 1 000 ml.

NOTE — Alternativement, une quantité équivalente de sulfate de magnésium ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) peut être utilisée.

b) Solution de chlorure de magnésium

Dissoudre 38 g de chlorure de magnésium dans 1 000 ml d'eau distillée.

Solution finale

Pour l'utilisation, ajouter 1,25 ml de solution de phosphate a) et 5,0 ml de solution de chlorure de magnésium b) à 1 000 ml. Répartir en quantités suffisantes et stériliser en autoclave à 121 °C ± 1 °C durant 15 min.

5.2.5 Eau distillée

Répartir et stériliser l'eau distillée d'une qualité appropriée (voir 5.1).

5.3 Milieux de culture

En général, après stérilisation en récipients hermétiques, les milieux de culture peuvent être conservés dans des conditions satisfaisantes pendant plusieurs mois à température ambiante, à condition d'être tenus à l'obscurité et maintenus hermétiquement fermés. Les milieux répartis stérilement peuvent être conservés entre 4 °C et 10 °C pendant 1 mois maximum; avant l'utilisation, ils doivent être examinés avec soin afin de détecter toute contamination, évaporation excessive ou tout autre signe de détérioration. La plupart des réactifs se conservent mieux à 4 °C. Les milieux de culture fournis préconditionnés doivent être utilisés selon les instructions du fabricant.

6 Stérilisation des appareils et de la verrerie

Les appareils et la verrerie qui ne sont pas fournis stériles doivent être stérilisés selon l'une des méthodes suivantes:

a) dans un four, à 160 °C ± 2 °C durant 1 h (ou 170 °C ± 2 °C durant 40 min);

b) dans un autoclave, à 121 °C ± 1 °C durant 20 min minimum.

Lorsque les membranes filtrantes ne sont pas stériles, elles doivent être stérilisées, avant utilisation, selon les instructions du fabricant, ou en leur absence, en autoclave à 115 °C ± 1 °C durant 10 min ou désinfectées, pour les organismes végétatifs, dans de l'eau distillée douce, portée à ébullition durant 10 min.

7 Échantillons

7.1 Échantillonnage

Pour les directives sur les techniques d'échantillonnage, se reporter à l'ISO 5667-2.

Le premier objectif est d'obtenir un échantillon aussi représentatif que possible de l'eau à examiner. Dans ce but, certaines précautions communes à toutes les méthodes d'échantillonnage pour les examens microbiologiques sont nécessaires:

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

a) pour être réutilisables, les flacons d'échantillonnage doivent pouvoir résister à des stérilisations répétées sans produire ni dégager de substances susceptibles d'inhiber ou de favoriser la croissance bactérienne;

ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d30e3b-ab79-4701-86ec-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

b) les flacons d'échantillonnage doivent contenir un agent qui neutralise tout désinfectant restant dans l'eau et doivent être stériles. L'agent neutralisant ne doit pas affecter la viabilité ou la croissance des organismes recherchés. Pour le chlore, 0,1 ml d'une solution stérile de thiosulfate de sodium ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) à 1,8 % (m/m) doit, avant stérilisation, être ajouté dans chaque bouteille de capacité 100 ml;

c) il convient d'être très attentif pour éviter toute contamination accidentelle de l'échantillon durant le prélèvement et la manipulation ultérieure;

d) l'échantillon doit être examiné dès que possible après le prélèvement, de préférence dans les 6 h;

e) toute bouteille d'échantillonnage doit être clairement identifiable et doit être accompagnée d'informations suffisantes concernant la nature de l'échantillon et les raisons pour lesquelles l'examen est demandé.

7.2 Conservation et manipulation

Pour les directives concernant la conservation et la manipulation des échantillons, se reporter à ISO 5667-3.

En règle générale, les échantillons doivent être transportés au laboratoire pour examen dans les meilleurs délais. Dans le cas où un retard est envisagé, les échantillons devraient être placés dans un conteneur frais isolé.

7.3 Préparation de la prise d'essai

Avant l'examen, bien mélanger l'échantillon en agitant vigoureusement pour obtenir une répartition uniforme des micro-organismes et, selon la nature de l'eau et la teneur en bactéries attendue, faire toutes les dilutions nécessaires à ce stade.

Pour les dilutions décimales, mesurer 90 ml ou 9 ml de diluant et transvaser dans des flacons ou des tubes de dilution stériles. Il est possible également d'utiliser des quantités de diluant préalablement stérilisé dans des flacons à bouchons à vis. Procéder à une ou plusieurs dilutions décimales en ajoutant un volume d'eau d'échantillon à neuf volumes de diluant. À l'aide d'une autre pipette ou par un moyen mécanique, bien mélanger et prélever un volume de cette dilution pour l'ajouter à neuf autres volumes de diluant. Répéter ces opérations autant de fois qu'il est nécessaire. Préparer une quantité suffisante de chaque dilution pour tous les essais à effectuer avec le même échantillon. Pour les dilutions autres que les dilutions décimales, ajuster le volume de diluant en fonction du volume d'échantillon.

Pour les directives générales concernant la préparation des dilutions décimales, se reporter à l'ISO 6887; ces directives peuvent également s'appliquer à la préparation de dilutions avec un facteur autre que le facteur 10.

8 Dénombrement après ensemencement des prises d'essai de l'échantillon sur (ou dans) un milieu solide

8.1 Principe

Une prise d'essai de l'échantillon d'eau est mélangée ou étalée à la surface d'un milieu de culture solide spécifié de sorte qu'après incubation, des micro-organismes forment des colonies dans ou sur le milieu.

Pour des raisons pratiques, on considère que chaque colonie provient d'un seul micro-organisme ou d'un amas de micro-organismes présents dans l'échantillon au moment de l'ensemencement. En tenant compte du volume de prise d'essai et du nombre de colonies formées, le résultat peut donc être exprimé comme le nombre d'unités génératrices de colonies dans un volume donné de l'échantillon, par exemple 1 ml ou 100 ml.

8.2 Méthodes

8.2.1 Généralités

Trois méthodes fondamentales peuvent être utilisées pour l'ensemencement sur milieu solide.

a) L'échantillon est mélangé au milieu qui a été préalablement fondu et refroidi à une température proche de la température de solidification; après incubation, les colonies qui se développent à la surface et à l'intérieur du milieu sont dénombrées.

b) L'échantillon est étalé à la surface d'un milieu gélosé sans trace d'humidité et après incubation, les colonies qui se développent à la surface sont dénombrées.

c) L'échantillon passe à travers une membrane qui retient les micro-organismes recherchés; la membrane est alors placée sur un milieu gélosé ou sur un tampon absorbant imprégné de bouillon de culture. Durant l'incubation, des colonies se forment à la surface de la membrane. Pour certains organismes, comme les anaérobies, la membrane peut également être placée, face en-dessous, dans une boîte de Petri et recouverte de milieu gélosé fondu.

8.2.2 Choix de la technique

Le choix de la technique dépend de plusieurs facteurs, notamment des caractéristiques physiques et chimiques de l'eau (voir 10.2.2), ainsi que de la nature des micro-organismes recherchés (voir 10.2.1), de leur concentration probable et de la précision requise pour l'essai. Les indications concernant les quantités d'échantillon d'eau qui peuvent être utilisées pour chaque méthode sont données en 8.2.3.1, 8.2.4.1 et 8.2.5.1 et les limites de détection sont mentionnées en 10.1.3. De plus, la précision des méthodes est traitée en 10.1.2. Les spécifications réglementaires peuvent également influer sur le choix de la technique à utiliser en indiquant, par exemple, la précision souhaitée ou si la détermination de la présence ou de l'absence d'un organisme dans une quantité spécifiée pour essai est suffisante.

8.2.3 Méthode par incorporation

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

8.2.3.1 Prise d'essai

La quantité de prise d'essai de l'échantillon, ou d'une dilution de l'échantillon, peut varier entre 0,1 ml et 5 ml, selon la dimension de la boîte de Petri et la quantité de milieu de culture utilisée. La dilution doit être choisie de sorte que le nombre présumé de colonies formées sur les boîtes de 90 à 100 mm de diamètre soit compris entre 25 et 300.

ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9d30ebf9-acc7-4701-86ec-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

8.2.3.2 Ensemencement

Faire régénérer le milieu nécessaire à l'eau bouillante ou à la vapeur. Le placer dans un bain d'eau à 45 °C ± 1 °C et ajouter, dans des conditions stériles, tous les composants nécessaires à ce stade.

Préparer et marquer les boîtes de Petri utiles, effectuer toutes les dilutions nécessaires conformément à 7.3 et, après avoir vigoureusement mélangé, répartir les prises d'essai dans les boîtes.

Retirer l'un après l'autre du bain d'eau les tubes de milieu fondu, sécher l'extérieur du tube et flamber le col. Ajouter immédiatement le milieu à la prise d'essai dans chaque boîte de Petri et mélanger soigneusement afin d'obtenir une répartition homogène des micro-organismes. Laisser refroidir les boîtes sur une surface horizontale, puis les faire incuber conformément à 8.2.6. En règle générale, on utilise 15 ml de milieu pour une prise d'essai de 1 ml ou 2 ml; pour des prises d'essai plus importantes, la composition du milieu doit être ajustée en conséquence.

8.2.4 Méthode par étalement

8.2.4.1 Prise d'essai

Pour une boîte de Petri de diamètre compris entre 90 mm et 100 mm, la quantité de prise d'essai d'échantillon, ou d'une dilution de l'échantillon, devrait être 0,1 ml à 0,5 ml. La dilution devrait être choisie de sorte que le nombre présumé de colonies formées soit compris entre 25 et 300, environ.

8.2.4.2 Ensemencement

Préparer et marquer des boîtes contenant chacune environ 15 ml de milieu de culture; la surface du milieu doit être séchée avant utilisation. Transférer à l'aide d'une pipette la prise d'essai sur la surface du milieu et l'étaler sur toute la surface à l'aide d'une baguette de verre stérile ou de tout autre instrument. Après absorption de l'inoculum, incuber conformément à 8.2.6.

8.2.5 Méthode par filtration sur membrane

8.2.5.1 Prise d'essai

La quantité maximale de prise d'essai dépend de la filtrabilité de l'échantillon d'eau et des membranes utilisées. Cette technique convient aux eaux contenant peu de matières particulaires en suspension, par exemple l'eau potable. Avec des membranes dont les pores ont un diamètre moyen de 0,45 µm, il est possible de filtrer plusieurs litres d'eau de ce type à travers une même membrane et d'obtenir ainsi une très grande sensibilité pour l'essai; cependant, pour certains organismes, une filtration à travers une membrane d'un diamètre moyen de pore de 0,22 µm peut être nécessaire. Choisir une quantité pour un essai d'échantillon, ou d'une dilution de celui-ci de façon à obtenir moins de 100 colonies sur une membrane de 47 mm ou 50 mm de diamètre.

8.2.5.2 Filtration

Relier l'appareillage de filtration stérile à une source de vide. Placer une membrane stérile, côté quadrillé vers le haut, sur le disque poreux de la base du filtre en ne saisissant que le bord extérieur de la membrane à l'aide d'une pince à mors plat stérile. Bien placer l'entonnoir stérile sur la base du filtre. L'arrivée d'air étant fermée, verser ou transférer à l'aide d'une pipette soit :

a) un volume connu d'échantillon, ou d'une dilution de celui-ci, soigneusement mélangé;

b) le contenu d'un flacon contenant la prise d'essai et une quantité suffisante de diluant pour obtenir un volume total d'au moins 20 ml à 30 ml;

c) au moins 20 ml de diluant, auquel on ajoute directement la prise d'essai mesurée et mélangée à l'aide d'une pipette.

Ouvrir le robinet et faire un vide d'environ 70 kPa pour filtrer lentement l'eau à travers la membrane. Refermer le robinet aussitôt que l'échantillon a été filtré.

8.2.5.3 Transfert de la membrane

Retirer l'entonnoir et transférer la membrane à l'aide d'une pince stérile, en s'assurant qu'il n'y a pas d'air emprisonné entre la membrane et le milieu, sur l'un des milieux suivants :

a) un milieu gélosé dans une boîte de Petri;

b) un tampon absorbant stérile préalablement saturé avec un milieu liquide dans une boîte de Petri. Pour éviter toute croissance envahissante, éliminer l'excès de milieu avant ou après le transfert de la membrane sur le coussinet;

c) une boîte de Petri, ou un peu de milieu gélosé dans une boîte de Petri; recouvrir ensuite la membrane de milieu gélosé fondu (45 °C).

Pour différentes quantités d'un même échantillon, l'entonnoir peut être réutilisé sans être désinfecté dans la mesure où les quantités les moins importantes sont filtrées les premières. Pour filtrer un autre échantillon, utiliser un autre appareillage stérile, ou désinfecter l'entonnoir pour les organismes végétatifs, en le plongeant dans l'eau bouillante durant au moins 1 min, par exemple. Il est possible également de suivre les instructions du fabricant concernant la désinfection. Durant la filtration d'une série d'échantillons, il n'est pas nécessaire de désinfecter la base du filtre, sauf en cas de contamination ou de détérioration de la membrane.

Ne pas alterner la filtration avec le même appareil d'échantillons reconnus pollués et d'échantillons d'eau traitée. Filtrer tout d'abord tous les échantillons d'eau chlorée et ceux dont on attend un résultat négatif, puis ceux qui sont présumés pollués. Il est possible également de réserver un appareillage de filtration sur membrane pour tous les échantillons chlorés et un autre pour les échantillons pollués.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

8.2.6 Incubation

Retourner les boîtes ensemencées et les placer dans un incubateur ou dans un récipient étanche dans un bain d'eau. Les boîtes contenant des membranes sur tampons imbibés doivent être placées dans un récipient étanche à l'air ou à l'eau pour éviter toute dessiccation du milieu.

ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9d1feb19-acc7-4701-8665-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

La durée et la température d'incubation doivent être choisies en se reportant à une méthode normalisée puisqu'elles dépendent du micro-organisme, ou des groupes de micro-organismes recherchés.

L'incubation peut être effectuée en deux étapes.

Une pré-incubation d'une durée variable, 2 à 4 h par exemple, à une température moins élevée pour permettre la revivification des organismes en état de choc, suivie d'une période plus longue d'incubation à la température appropriée à l'organisme recherché. Le changement peut être effectué soit en transférant les cultures dans un autre incubateur ou un autre bain d'eau, soit en utilisant un appareillage qui règle automatiquement la température après une période donnée. L'idéal serait que toutes les boîtes soient placées dans l'incubateur ou le bain d'eau en même temps.

Il est possible également de faire incuber les membranes durant une période limitée (2 h ou 4 h), par exemple) sur milieu de revivification, puis de les transférer sur un autre milieu, généralement sélectif, pour poursuivre l'incubation.

8.3 Dénombrement

Après incubation, les boîtes de Petri ou les membranes doivent être examinées immédiatement. Si ceci n'est pas possible, elles doivent être conservées entre 4 °C et 5 °C durant de courtes périodes, à condition que ceci ne modifie pas l'apparence des colonies.

8.3.1 Comptage des colonies

Pour le comptage «total» sur milieu non sélectif, toutes les colonies doivent être comptées. Avec des milieux sélectifs et différenciés, ne compter que les colonies qui montrent l'aspect caractéristique de l'organisme recherché. Lors de ces comptages, il est rare de compter des organismes n'appartenant qu'à un seul groupe taxinomique mais, en pratique, cette divergence peut être acceptée et le résultat exprimé comme résultat présumé. Pour une caractérisation plus précise, des examens de confirmation sont nécessaires.

Toutefois, si les colonies sont très nombreuses il peut ne pas être possible d'en déterminer un nombre suffisant pour obtenir un résultat précis. Dans ce cas, il faudrait dénombrer le plus grand nombre de colonies possible provenant d'une zone donnée de la boîte ou de la membrane.

8.4 Calcul des résultats

Étant donné que chaque colonie est supposée provenir d'un seul micro-organisme ou d'un seul amas de micro-organismes, le résultat est exprimé par le nombre d'unités génératrices de colonie dans la quantité de référence spécifiée d'échantillon (généralement 100 ml ou 1 ml) selon l'équation suivante :

$$C_s = \frac{N}{(n_1 V_1 F_1) + (n_2 V_2 F_2) + \ldots + (n_i V_i F_i)} V_s$$

où

C_s est le nombre d'unités génératrices de colonie dans le volume de référence V_s d'échantillon;

N est la somme de toutes les colonies comptées dans les boîtes ou membranes provenant des dilutions $F_1, F_2, \ldots F_i$;

$n_1, n_2 \ldots n_i$ sont les nombres de boîtes comptées pour les dilutions $F_1, F_2 \ldots F_i$;

$V_1, V_2 \ldots V_i$ sont les volumes d'essai utilisés pour les dilutions $F_1, F_2 \ldots F_i$;

$F_1, F_2 \ldots F_i$ sont les dilutions utilisées pour les prises d'essai $V_1, V_2 \ldots V_i$ ($F = 1$ pour un échantillon non dilué, $F = 0{,}1$ pour une dilution décimale, etc.);

V_s est la quantité de référence choisie pour exprimer la concentration de l'échantillon en micro-organismes.

NOTE — Le comptage total ainsi obtenu est la moyenne pondérée des comptages effectués sur chaque boîte.

Ce qui suit est un exemple de calcul pour les méthodes par incorporation ou par étalement :

Si le volume de solution d'essai utilisé V_i est 1 ml, et si les comptages suivants sont obtenus avec les dilutions respectives

Dilution	Dénombrement
10^{-2}	74 et 104 colonies
10^{-3}	9 et 15 colonies

alors, $C_s = \dfrac{74 + 104 + 9 + 15}{(2 \times 1 \times 0{,}01) + (2 \times 1 \times 0{,}001)} V_s$

$$= \frac{202}{0{,}022} V_s$$

$$= 9182\ V_s$$

et si V_s est 1 ml, alors

$C_s = 9{,}18 \times 10^3$/ml

Il est souhaitable de rendre compte des résultats d'un tel comptage avec des limites de confiance de 95 %, qui peuvent être obtenues en appliquant la formule suivante :

$$C + 2 \pm 2\sqrt{C + 1}$$

où C est le nombre de colonies comptées ou la somme des colonies comptées.

Par exemple, si l'on dénombre 100 colonies sur une membrane, le nombre réel d'organismes donné dans 100 ml d'échantillon d'eau est vraisemblablement compris entre 82 et 122. Toutefois, pour les nombres plus faibles, inférieurs à 20 colonies environ, cette formule par approximation devient inexacte, comme toutes les autres; il convient alors de se reporter aux tables de Poisson.

9 Dénombrement

9.1 Principe

Les prises d'essai de l'échantillon d'eau sont incorporées dans un milieu liquide conçu pour permettre la croissance d'un micro-organisme particulier ou d'un groupe de micro-organismes. Si la croissance se produit dans un milieu liquide, le nombre le plus probable de micro-organismes présents dans l'échantillon d'origine peut être estimé uniquement par les méthodes statistiques décrites ci-dessous. En pratique, les résultats obtenus sont toujours imprécis et la précision ne peut être améliorée qu'en accroissant le nombre d'échantillons ou de prises d'essai de l'échantillon examiné.

9.2 Applications

9.2.1 Essai permettant de déceler la présence ou l'absence de micro-organismes

Après ensemencement et incubation d'une seule prise d'essai d'échantillon dans un tube de milieu liquide et la preuve ou non de la croissance d'un micro-organisme donné dans ce milieu, la seule conclusion pouvant être tirée est la présence, ou l'absence, du micro-organisme dans le volume d'essai.

Cette méthode peut être utilisée pour vérifier la conformité aux règles exprimée sous la forme : «absence de ... [désignation du micro-organisme] dans ... ml», mais ne permet pas d'évaluer la concentration en micro-organismes.

9.2.2 Estimation du nombre le plus probable (NPP)

Le principe de la méthode NPP consiste à ensemencer de nombreuses prises d'essai d'un même échantillon et/ou de dilutions de celui-ci, dans des tubes de milieu de culture liquide.

On suppose que, pendant l'incubation, chaque tube ayant reçu un ou plusieurs organisme(s) avec l'inoculum présentera une croissance qui va provoquer ou non des modifications caractéristiques dans le milieu. Compte tenu que certains tubes sont négatifs, le nombre le plus probable de micro-organismes dans une quantité spécifiée d'échantillon peut être estimé à partir du nombre et de la répartition des tubes positifs.

Il convient de choisir entre les différents systèmes d'ensemencement NPP (9.3.2) en fonction du nombre présumé d'organismes dans l'échantillon étudié, des spécifications réglementaires, de la précision requise et de toute autre considération pratique. La précision dépend du nombre de tubes ensemencés : elle croît comme une fonction de la racine carrée du nombre de tubes utilisés; par exemple, le nombre de tubes doit être quadruplé pour doubler la précision. En pratique, avec les systèmes utilisés habituellement, la précision est toujours faible. D'autre part, avec ces systèmes, la sensibilité qui dépend de la quantité totale examinée est, en pratique, généralement suffisante.

9.3 Mode opératoire

Le choix de la méthode NPP dépend de facteurs similaires à ceux mentionnés en 8.2.2 et les indications suivantes concernent la méthode applicable à la plupart des cas.

9.3.1 Prise d'essai

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/903fcb9e-acc7-4701-86ec-0e27af1ffca4/iso-8199-1988

Le fait d'ajouter la prise d'essai ne doit pas modifier la composition du milieu au point de perturber de façon notable la croissance des micro-organismes recherchés. Des quantités de prise d'essai inférieures ou égales à 1 ml sont normalement ajoutées à des milieux simple concentration. Des prises d'essai comprises entre 1 ml et 50 ml sont normalement ajoutées à des volumes égaux de milieu double concentration, à condition que l'échantillon ne contienne pas de sels organiques en excès ou de substances toxiques susceptibles de perturber la croissance bactérienne. Pour des quantités supérieures à 50 ml des milieux plus concentrés peuvent être utilisés. Dans certains cas particuliers, les milieux stériles déshydratés peuvent être dissous à froid (ou à 30 °C) dans l'échantillon à analyser.

Cette méthode est semblable dans son principe à celle décrite dans le chapitre 8 et présente les mêmes inconvénients en présence de fortes concentrations de sels organiques ou de substance toxiques.

Les inconvénients dus à la présence de fortes concentrations en minéraux ou en substances toxiques peuvent être évités en extrayant les micro-organismes de l'échantillon d'eau. Ceci peut êtrer fait au moyen d'une filtration sur membrane semblable à celle décrite en 8.2.5 ou, si l'eau est turbide, par l'addition à l'échantillon d'adjuvants de filtrage comme la diatomite, ou une suspension d'oxyde d'aluminium. Ces adjuvants de filtrage sédimentent en entraînant les micro-organismes; la séparation est obtenue par centrifugation ou filtration. Les membranes, la diatomite ou l'oxyde d'aluminium sont alors transférés dans le milieu de culture liquide.

9.3.2 Choix d'un système d'ensemencement

Différents systèmes d'ensemencement sont possibles. Les systèmes les plus usités, dits «symétriques», comprennent le même nombre de tubes constituant des séries pour chaque

dilution, les rapports de volume entre deux dilutions étant généralement de 1 à 10, comme indiqué par exemple dans les tables NPP (voir tableaux 1 et 3). On utilise généralement 3 ou 5 tubes dans chaque série pour chaque dilution, bien que la précision des résultats augmente avec le nombre de tubes dans chaque série. Au minimum 3 séries successives de tubes doivent être utilisées.

Théoriquement, il faudrait ensemencer un nombre suffisant de dilutions pour s'assurer qu'avec la plus grande quantité d'échantillon tous les tubes soient positifs et qu'avec la plus petite quantité tous les tubes soient négatifs. Toutefois, en pratique il n'est pas toujours possible, ni même nécessaire, d'utiliser de très nombreuses dilutions, la nature de l'eau, la teneur présumée en bactéries et une connaissance des conditions d'essai guidant généralement le choix de la gamme de dilutions permettant d'obtenir 3 séries de résultats acceptables pour le calcul de l'indice NPP (voir 9.5).

Avec ce système et lorsque le rapport prévu entre le nombre maximal et le nombre minimal de micro-organismes est inférieur à 100, ou lorsque la concentration est très faible, une seule opération de dilution par série de tubes, comme indiqué dans le tableau 2 par exemple, peut suffire au lieu d'une série de dilutions décimales. Dans les autres systèmes d'ensemencement dits «dissymétriques», les différents niveaux de dilutions ne comportent pas le même nombre de tubes. Ces systèmes ne sont pas aussi souples que les systèmes symétriques et ne sont utilisés que pour estimer le nombre de micro-organismes dans des limites bien définies. Par exemple, 5 tubes de milieu liquide peuvent être ensemencés avec des quantités connues d'échantillon ou de dilution d'échantillon, et 2 tubes supplémentaires peuvent être ensemencés, l'un avec une quantité égale d'une dilution décimale et l'autre avec une quantité égale de la dilution décimale suivante comme indiqué dans le tableau 5.

Les tables NPP indiquent les combinaisons de résultats de tubes négatifs et positifs qu'il est le plus probable de rencontrer. Si d'autres combinaisons moins probables, qui ne sont pas données, se produisent en pratique avec une fréquence plus grande qu'une pour 100 essais, cela suggère que les conditions statistiques sous-entendant l'estimation du NPP ne sont pas remplies, probablement parce que la technique est défectueuse.

Les valeurs NPP pour des combinaisons de réactions négatives et positives non indiquées dans les tables ou pour d'autres combinaisons dans un autre système d'ensemencement peuvent être calculées par l'application de la formule suivante :

$$\text{NPP} = \frac{\text{Nombre de tubes} \times \text{volume de référence de l'échantillon en ml}}{\text{Volume (en ml) d'échantillon dans tous les tubes avec des réactions négatives} \times \text{Volume (en ml) d'échantillon dans tous les tubes avec des réactions positives}}$$

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 8199:1988
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9d30ebf9-acc7-4701-86ec-0e27af1ffca4/iso-8199-1988