

NORME  
INTERNATIONALE

ISO  
9998

Première édition  
1991-11-01

---

---

**Qualité de l'eau — Techniques d'évaluation et  
de contrôle des milieux microbiologiques  
servant au comptage des colonies pour les  
essais d'évaluation de la qualité de l'eau**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Water quality — Practices for evaluating and controlling microbiological  
colony count media used in water quality tests*

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9b02cd8-6648-40e6-a922-  
bf63eb0ce0bc/iso-9998-1991](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9b02cd8-6648-40e6-a922-bf63eb0ce0bc/iso-9998-1991)



Numéro de référence  
ISO 9998:1991(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 vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 9998 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

[ISO 9998:1991](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9b02cd8-6648-40e6-a922-b567eb10ca7bc/iso-9998-1991)

Les annexes A et B font partie intégrante de la présente Norme internationale. L'annexe C est donnée uniquement à titre d'information.

© ISO 1991

Droits de reproduction réservés. 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

Imprimé en Suisse

## Introduction

Le développement des micro-organismes sur milieu de culture dépend de plusieurs facteurs très importants, à savoir

- a) les substances nutritives adéquates doivent être disponibles;
- b) l'oxygène ou d'autres gaz doivent être disponibles;
- c) un certain degré d'humidité est nécessaire;
- d) le milieu doit être au pH de réaction adéquat;
- e) les températures adéquates doivent être maintenues;
- f) le milieu doit être stérile et maintenu exempt de contamination après ensemencement;
- g) le milieu doit pouvoir être reproduit avec une variabilité minimale;
- h) il convient d'éviter le surpeuplement des boîtes.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9b02cd8-0c48-40c6-a922-bf53eb0ce0bc/iso-9998-1991>

Pour assurer la reproductibilité des résultats microbiologiques et permettre la réalisation d'études comparatives interlaboratoires, il faut suivre des règles strictes pour la préparation des milieux microbiologiques. Des directives visant à assurer la préparation adéquate de milieux pouvant être employés avec des espérances de croissance similaires dans différents laboratoires sont présentées ci-après.

Page blanche

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 9998:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9b02cd8-6648-40e6-a922-bf63eb0ce0bc/iso-9998-1991>

# Qualité de l'eau — Techniques d'évaluation et de contrôle des milieux microbiologiques servant au comptage des colonies pour les essais d'évaluation de la qualité de l'eau

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale traite de la comparaison et de l'évaluation du même milieu préparé à partir de constituants provenant de lots différents.

Elle traite également de la comparaison et de l'évaluation de milieux différents utilisés pour un objectif identique.

Elle ne traite ni de la formulation ni de la préparation des milieux, mais seulement du produit fini prêt à l'emploi.

La présente méthode est applicable à l'évaluation de tout milieu solide destiné à l'isolement et au dénombrement de colonies bactériennes.

## 2 Référence normative

La norme suivante contient 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, l'édition indiquée était en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer l'édition la plus récente de la norme indiquée ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

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

## 3 Essais de productivité/de sélectivité

**3.1** La méthode générale à suivre consiste à ensemencer les milieux de culture à évaluer avec des organismes et à comparer leurs performances, lorsqu'on veut

- a) effectuer un choix entre plusieurs milieux proposés par différents fabricants, ou
- b) sélectionner le milieu le mieux approprié, ou
- c) évaluer la variabilité interlots.

L'ensemencement peut être réalisé soit par une méthode quantitative, soit par simple étalement sur boîte à l'aide d'une anse bouclée ou, pour les milieux liquides, introduction des germes à la pipette. Il est également possible d'utiliser une série d'échantillons d'eau naturelle à forte population bactérienne. Ce mode de sélection est plus proche de la réalité, mais présente un inconvénient: les organismes les plus exigeants peuvent ne pas être présents dans l'échantillon d'eau employé.

**3.2** Des exemples d'analyses statistiques sont présentés dans l'annexe A.

## 4 Préparation et contrôle des milieux

### 4.1 Application

Les contrôles et modes opératoires suivants peuvent être appliqués à chaque lot de milieu fourni par un fabricant ou préparé en laboratoire à partir des constituants de base (voir également l'ISO 8199).

### 4.2 Mesure du pH

Préparer le milieu, le stériliser comme spécifié et mesurer le pH à l'aide d'un pH-mètre électronique. Pour la plupart des milieux, il convient d'ajuster le pH à la valeur cible à 25 °C,  $\pm 0,2$  unités. Vérifier le pH du milieu stérilisé, après solidification dans le cas des milieux solides.

Le pH de réaction du milieu de culture, qui exprime sa concentration en ions hydrogène, est un facteur très important de la croissance des micro-organismes. La plupart des micro-organismes préfèrent des milieux de pH à peu près neutre, mais certains exigent un milieu nettement acide.

La dérive du pH, ainsi que d'autres problèmes relatifs au pH, peuvent avoir différentes causes:

- surchauffe;
- homogénéisation insuffisante;
- stérilisation trop poussée;
- utilisation de verre alcalin;
- contamination des récipients;
- impuretés de l'eau distillée;
- régénération répétée du milieu ou stockage prolongé, notamment à des températures élevées;
- hydrolyse des constituants.

### 4.3 Résistance du gel

Pour les milieux gélosés, on peut effectuer un contrôle de résistance sur une boîte préalablement séchée, à l'aide d'une anse bouclée. Des méthodes de séchage sont spécifiées dans l'article 6.

Une résistance insuffisante peut avoir différentes causes:

- absence de gélose dans la solution;
- homogénéisation insuffisante;
- proportion milieu déshydraté/volume d'eau incorrecte;
- dérive du pH due à l'hydrolyse d'un acide (les géloses «acides», par exemple à base d'extrait de malt, se décomposent lors d'un chauffage prolongé ou à de régénérations répétées);
- non compensation de la dilution du milieu gélosé due à l'addition de l'inoculum.

Un milieu gélosé présentant une résistance excessive peut inhiber la formation de colonies typiques, ce qui entraîne généralement le développement de colonies bombées, souvent plus petites que la normale. L'effet inhibiteur de la sécheresse de surface du milieu gélosé peut être encore plus marqué pour les cultures sur membrane.

### 4.4 Eau

La nature de l'eau utilisée pour préparer les milieux est un facteur très important et peut constituer l'une des principales causes de non-comparabilité de milieux préparés dans des laboratoires différents ou même dans le même laboratoire. Il est fortement déconseillé d'utiliser l'eau du robinet pour préparer les milieux, car elle contient diverses substances, variables d'un jour sur l'autre, dont la présence dans le milieu peut stimuler ou inhiber la croissance.

Il est recommandé d'utiliser, pour préparer les milieux, de l'eau distillée sur verre et, pour les études de croissance critique, de l'eau bidistillée sur verre ou de l'eau ultra-pure<sup>1)</sup>. L'eau non conforme aux prescriptions définies pour l'eau distillée sur verre peut contenir des substances susceptibles d'altérer les performances des milieux.

Bien que la dérive du pH soit une caractéristique inhérente à l'eau purifiée, l'obtention de valeurs extrêmes indique une contamination chimique.

### 4.5 Verrerie

La propreté de la verrerie est un facteur critique de la préparation des milieux. Des traces de détergents ou de substances chimiques peuvent avoir une forte influence sur la composition du milieu et la croissance sur ce milieu. Certaines solutions de nettoyage étant difficiles à éliminer totalement, il est recommandé de procéder à des contrôles de pH sur la verrerie propre (notamment si elle a été trempée dans des solutions acides ou basiques).

Certains agents mouillants ou détergents utilisés pour laver la verrerie peuvent contenir des substances bactériostatiques ou inhibitrices, et il faut effectuer 6 à 12 rinçages successifs à l'eau ultra-pure pour éliminer toute trace de ces produits et assurer l'absence d'action bactériostatique résiduelle.

1) Eau pouvant être obtenue avec un dispositif similaire à un système Milli-Q à 4 cartouches avec filtration sur membrane du produit final.

Le système Milli-Q est un exemple de produit approprié disponible sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné.

Le mode opératoire à suivre pour vérifier l'absence de résidus, qui est extrait de [1], est décrit dans l'annexe B.

#### 4.6 Aspect

Le milieu préparé doit normalement avoir la couleur et la limpidité typiques. Le brunissement et l'apparition d'un précipité font partie des signes évidents d'erreur de préparation. Le brunissement peut résulter d'un échauffement excessif dû à une homogénéisation insuffisante.

On observe parfois une dissolution incomplète du milieu déshydraté. Ce phénomène peut être dû à une imprégnation insuffisante, un chauffage inadéquat, une homogénéisation incomplète, ou à l'utilisation d'eau du robinet ou d'un récipient de taille trop petite pour permettre une convection suffisante.

Les milieux gélosés peuvent précipiter lors d'une stérilisation ou d'un chauffage prolongés. De même, la régénération répétée de la gélose solidifiée ou le maintien prolongé de la gélose liquéfiée à température élevée peuvent entraîner la formation d'un précipité dans le milieu. Il peut également y avoir flocculation de la gélose si le milieu liquide est maintenu au bain-marie à 43–45 °C pendant plus de 30 min, mais il est possible de disperser le précipité fluctuant en recuisant le milieu. Le maintien prolongé des milieux gélosés à l'état fondu peut également entraîner une dégradation de leurs qualités nutritives.

#### 4.7 Produits chimiques

Pour assurer la compatibilité des milieux, des réactifs et des solutions et la reproductibilité des résultats d'essai, il est recommandé d'utiliser pour la préparation des produits chimiques de qualité maximale. Il a souvent été signalé, par exemple, que certaines marques de dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) contiennent des quantités importantes d'impuretés pouvant toutes avoir une action inhibitrice ou stimulante sur la croissance bactérienne. La qualité des produits chimiques utilisés doit être consignée avec soin afin que les formulations ultérieures soient conformes à la formulation initiale.

La mise en solution correcte des produits chimiques et l'homogénéisation des solutions, des milieux et des réactifs sont des facteurs importants pour assurer l'homogénéité et la compatibilité des différents lots au sein d'un même laboratoire et d'un laboratoire à l'autre.

#### 4.8 Altération des propriétés conditionnant la revivification bactérienne ou la différenciation

La perte d'efficacité soudaine d'un milieu peut avoir de multiples causes, entre autres: régénérations répétées, chauffage prolongé ou excessif, homogénéisation insuffisante, carbonisation ou combustion, non compensation de la dilution des ingrédients due à l'addition de l'inoculum, modification de la composition par l'inoculum, par exemple par introduction d'électrolytes forts ou de sucre en solution, de détergents, d'antiseptiques, de métaux toxiques, de matériel protéique, etc.

Le point à noter est que certaines de ces erreurs n'entraînent pas de modification de l'aspect visuel par rapport à un milieu correctement préparé. La même erreur peut parfois être reproduite pendant des mois avant que l'on en arrive à se demander si le milieu a perdu de son efficacité, ou si les échantillons sont plus faiblement contaminés. Seule une surveillance constante peut permettre de réduire la fréquence de tels problèmes. Il est recommandé d'utiliser une culture pure produisant la réaction type sur le milieu (témoin positif).

#### 4.9 Durée de conservation

La durée de vie d'un milieu de culture, une fois préparé, dépend de plusieurs facteurs. S'il est souhaitable, pour les travaux les plus critiques, d'utiliser le milieu le jour même de sa préparation, de nombreux milieux peuvent être conservés sans risque au réfrigérateur pendant plusieurs semaines avant l'emploi. Les milieux liquides ou solides enfermés dans des récipients à bouchon vissé (pour empêcher l'évaporation) se prêtent mieux à une conservation prolongée que les milieux stockés en boîte ou dans des récipients bouchés avec de l'ouate.

Le stockage prolongé des milieux stériles n'est pas recommandé, à moins que leur stabilité n'ait été établie.

Il convient de porter sur tous les milieux préparés et tous les emballages entamés la date indiquant leur durée de conservation. Pour les milieux déshydratés non entamés, il convient de respecter les spécifications du fabricant relatives à la durée de conservation.

### 5 Analyses statistiques

#### 5.1 Généralités

Les microbiologistes sont constamment à la recherche du milieu le mieux approprié pour isoler et dénombrer de façon sélective un organisme cible ou une population d'organismes issus d'une prise d'essai ou d'un échantillon donné. Il existe sur ce

sujet une littérature abondante, et de nombreux auteurs qui préconisent chacun l'utilisation d'un milieu qu'ils considèrent comme le milieu optimal dans les conditions d'essai imposées. Les milieux préconisés dans ces études comparatives et ces recommandations tendent invariablement à avoir des adeptes régionaux, ce qui rend difficile les études comparatives de la qualité de l'eau comme le soulignait une étude notée en [2].

Il est donc très important, pour pouvoir mener à l'échelle nationale et internationale des études comparatives de qualité des eaux, de normaliser autant que possible les milieux, qui constituent l'un des outils fondamentaux de l'analyse microbiologique de l'eau, afin de fournir des résultats cohérents mais aussi de permettre le développement de méthodes normalisées pour le dénombrement de micro-organismes spécifiques.

## 5.2 Principe

Des échantillons d'eau, des cultures pures (normales, stressées ou endommagées) ou des dilutions de ces échantillons ou cultures sont étalés, incorporés ou filtrés sur membrane. Les membranes sont ensuite déposées sur deux types au moins de milieux gélosés à comparer, la comparaison portant sur un nombre significatif de colonies observées sur plusieurs boîtes de répétition.

Pour les essais sur cultures pures, on utilise essentiellement les trois modes opératoires suivants, avant étalement, incorporation ou filtration sur membrane.

- a) Dilution des cultures pour permettre le dénombrement.
- b) Addition à des échantillons d'eau naturels à faibles populations bactériennes d'une culture pure de l'organisme cible, afin d'obtenir un nombre d'organismes cibles compris dans la gamme de comptage normale.
- c) Addition à des échantillons d'eau naturels à fortes populations bactériennes d'une culture pure de l'organisme cible, afin d'obtenir un nombre d'organismes cibles compris dans la gamme de comptage normale, avec ou sans dilution.

Pour les comptages de colonies à partir d'échantillons d'eau naturels, on utilise essentiellement les deux méthodes suivantes.

- a) Étalement direct ou incorporation directe d'un volume inférieur ou égal à 1,0 ml de l'échantillon pur ou dilué, selon les modes opératoires appropriés.
- b) Concentration de l'échantillon sur membrane filtrante et dépôt de cette membrane sur un milieu

gélosé approprié, pour obtenir un nombre d'organismes compris dans la gamme de comptage.

## 5.3 Réactifs et produits

Adaptés aux milieux comparés par les méthodes d'étalement, d'incorporation ou de filtration sur membrane. Une gélose nutritive non spécifique peut être incluse dans tous les essais pour les comptages de colonies issues de cultures pures. Il convient de comparer la revivification d'organismes, cibles ou non, sur des milieux sélectifs avec la revivification sur des milieux non sélectifs, et de vérifier la spécificité et la sélectivité.

## 5.4 Appareillage

Matériel permettant d'effectuer des essais d'étalement, d'incorporation au milieu, et de filtration sur membrane pour le dénombrement de l'organisme cible. Les boîtes de Petri destinées à l'étalement ont un diamètre de 100 mm environ. Elles peuvent également servir pour les essais avec filtration sur membranes. Toutefois, des boîtes de diamètre compris entre 50 mm et 60 mm peuvent s'avérer mieux adaptées.

## 5.5 Préparation des échantillons

**5.5.1** Prélever des échantillons d'eau douce ou sa-  
 lée destinés à la réalisation d'essais de comptage  
 « totaux » ou à l'obtention de la flore de fond pour  
 l'organisme cible puis, suivant les méthodes de la-  
 boratoire courantes, procéder à l'étalement, l'incor-  
 poration ou la filtration sur membrane. Faire incubé  
 les boîtes de Petri ensemencées, à la température  
 et pendant le temps appropriés. L'eau peut être  
 conservée à une température comprise entre 2 °C  
 et 4 °C.

Après incubation, examiner les boîtes de Petri et  
 procéder au comptage des colonies. Il convient  
 d'utiliser l'échantillon d'eau directement pour les  
 essais de comptage « totaux » ou de le compléter par  
 des volumes connus d'organisme cible pour les  
 études comparatives de milieux.

**5.5.2** Mettre en culture l'organisme cible pour les  
 milieux à comparer dans un bouillon, à la tempé-  
 rature appropriée. Après incubation, mettre l'orga-  
 nisme cible en état de stress en l'exposant pendant  
 24 h à une température comprise entre 2 °C et 4 °C.  
 Il est admis d'utiliser d'autres méthodes de mise en  
 état de choc ou d'endommagement préalablement  
 convenues.

Étaler, incorporer ou filtrer sur membrane l'orga-  
 nisme cible stressé, puis faire incubé sur un milieu  
 nutritif non sélectif à la température appropriée et  
 pendant le temps requis, qui peut être plus long que  
 pour les organismes non mis en état de choc. Ex-

poser une seconde fois la culture de l'organisme en état de choc à une température comprise entre 2 °C et 4 °C.

Immédiatement après l'incubation, procéder au comptage des colonies d'organismes cibles et non cibles et déterminer la dilution appropriée pour les études comparatives sur cultures pures ou pour l'addition à des échantillons d'eau.

Dès que la densité convenable d'organisme cible a été établie, prélever le volume approprié de culture et procéder aux essais sur culture pures et/ou cultures mélangées.

## 6 Mode opératoire

### 6.1 Généralités

Les méthodes d'étalement décrites sont fondées sur l'utilisation de 0,5 ml d'inoculum liquide et de boîtes de gélose préséchées. Les boîtes de gélose utilisées pour les dénombrements sur membrane ne sont pas préséchées, mais il convient d'éviter la présence d'eau libre sur la gélose, qui risque d'entraîner une croissance confluyente.

Pour sécher les boîtes destinées aux essais par étalement, fermer les boîtes de Petri fraîchement préparées avec leur couvercle, les retourner et les placer à l'obscurité (pour les milieux sensibles à la lumière) pendant 15 h à 18 h à température comprise entre 30 °C et 35 °C.

### 6.2 Méthode par étalement, culture pure en état de choc

Après dilution de la culture pure de l'organisme cible stressé de façon à obtenir des suspensions contenant, dans 0,5 ml, de 50 à 200 organismes, étaler de façon aléatoire 0,5 ml de ces suspensions sur chacun des milieux à comparer, et sur un milieu nutritif non sélectif. Il convient de réaliser cinq répétitions sur chacun des milieux ainsi que sur le milieu non sélectif, et d'étaler suffisamment de suspensions pour obtenir un nombre de colonies approprié.

Pour répartir uniformément l'inoculum sur la gélose préséchée, utiliser une tige en verre courbée, avec ou sans plaque bactériologique tournante.

Refermer les boîtes de Petri et attendre que la prise d'essai étalée soit complètement absorbée avant de les retourner. Une fois l'inoculum absorbé, il convient de mettre toutes les boîtes à incuber aussi rapidement que possible, à la température appropriée et pendant le temps requis selon la nature de l'organisme cible utilisé.

### 6.3 Méthode par étalement, organisme cible stressé plus échantillon

Effectuer des dilutions appropriées de l'échantillon pour obtenir des suspensions contenant, dans 0,5 ml, de 400 à 500 organismes (suspension A) et de 4000 à 5000 organismes (suspension B).

Ajouter à ces suspensions un volume de la culture de l'organisme cible tel que 0,5 ml de l'échantillon complété contienne également environ 50 à 200 organismes cibles stressés.

Étaler de façon aléatoire 0,5 ml de l'une ou l'autre des suspensions (A et B) sur chacun des milieux à comparer, et étaler en même temps sur un milieu nutritif non sélectif la culture de l'organisme cible diluée de façon à fournir 50 à 200 colonies, afin de déterminer la ligne de base. On compare au total cinq répétitions pour chacun des milieux et pour le milieu non sélectif. Il convient d'étaler suffisamment de suspensions pour obtenir un nombre de colonies approprié.

Se reporter au deuxième et au troisième alinéas de 6.2 pour achever cette méthode.

### 6.4 Méthode par incorporation

Pour appliquer la méthode par incorporation, on peut procéder comme pour la méthode par étalement (6.2 et 6.3), en utilisant une culture pure stressée avec ou sans addition d'échantillon. Cette technique ne nécessite pas de préséchage des boîtes, et le volume d'échantillon pur ou dilué à incorporé est normalement de 1,0 ml.

### 6.5 Méthode par filtration sur membrane, organisme cible stressé

Après dilution de la culture pure de l'organisme cible stressé de façon à obtenir des suspensions contenant, dans 1,0 ml plus 30 ml de diluant et après filtration sur membrane, environ 50 à 200 unités génératrices de colonies de l'organisme cible, procéder à la filtration sur membrane en utilisant une méthode et des membranes normalisées et répartir de façon aléatoire les membranes ensemencées sur les milieux à comparer ainsi que sur un milieu nutritif non sélectif destiné au comptage du fond. Il est également recommandé d'étaler sur un milieu nutritif non sélectif 0,5 ml d'une dilution de la culture de l'organisme cible stressé (25 à 100 colonies), pour évaluer le stress dû à la membrane. On compare au total cinq répétitions au moins pour chacun des milieux. Il convient de filtrer suffisamment de suspensions pour obtenir un nombre de colonies approprié.

Aussitôt après avoir préparé les échantillons, retourner les boîtes de Petri et les faire incuber à la température et pendant le temps appropriés.

### 6.6 Méthode par filtration sur membrane, organisme cible stressé plus échantillon

Concentrer ou diluer l'échantillon d'eau de façon à obtenir des suspensions contenant, dans 1,0 ml, de 400 à 500 organismes (A) et 4 000 à 5 000 organismes (B).

Ajouter à ces suspensions (A ou B) diluées ou concentrées des volumes de la culture de l'organisme cible tels que 1,0 ml de l'échantillon d'eau contienne environ 50 à 200 organismes cibles stressés.

Ajouter 1,0 ml du mélange échantillon/organisme stressé à 30 ml de diluant, et procéder à une filtration sur membrane selon les méthodes de laboratoire courantes. Répéter cette opération autant de fois que nécessaire, et répartir de façon aléatoire les membranes filtrantes sur les milieux à comparer. Dans la même expérience et en utilisant le même plan de répartition aléatoire, filtrer le volume approprié de la culture de l'organisme cible stressé à la concentration adéquate pour obtenir 50 à 200 organismes par millilitre. Placer les membranes sur un milieu nutritif non sélectif.

On compare au total cinq répétitions au moins pour chacun des milieux.

Se reporter au dernier alinéa de 6.5 pour la dernière étape de cette méthode.

### 6.7 Méthode par étalement, échantillon

Étaler de façon aléatoire sur chacun des milieux préséchés à comparer 0,5 ml d'échantillon pur ou dilué de façon à contenir, par millilitre, 50 à 200 organismes capables de croître sur le milieu témoin non sélectif. On compare au total cinq répétitions pour chacun des milieux.

Se reporter au deuxième et au troisième alinéas de 6.2 pour achever cette méthode.

### 6.8 Méthode par incorporation, échantillon

Pour évaluer la croissance du fond par la méthode par incorporation, on peut procéder comme pour la méthode par étalement (voir 6.4 et 6.7).

### 6.9 Méthode par filtration sur membrane, échantillon

Une fois déterminé le volume d'échantillon, pur ou dilué, nécessaire pour obtenir 50 à 200 colonies après filtration sur membrane et incubation sur un milieu nutritif non sélectif, ajouter ce volume à 30 ml maximum de diluant pour essayer les milieux

à comparer. Le volume total soumis à l'essai ne doit pas être inférieur à 10 ml.

Filtrer un nombre suffisant d'échantillons et répartir les membranes de façon aléatoire sur les milieux d'essai choisis.

Si la dilution d'un échantillon est nécessaire, étaler 0,5 ml d'échantillon dilué de façon à produire 50 à 200 colonies sur les boîtes de gélose utilisées dans les essais comparatifs. Il convient de répartir les échantillons sur des boîtes choisies de façon aléatoire et de les inclure à la série étudiée par filtration sur membrane.

Se reporter à 6.5 pour achever cette méthode.

## 7 Expression des résultats

7.1 Après incubation pendant le temps requis, compter les colonies typiques et atypiques qui se sont développées sur chacun des milieux essayés et des milieux témoins, à l'aide d'un microscope stéréoscopique (grossissement  $\times 10$ ) ou d'un autre instrument, et noter la valeur obtenue.

7.2 Présenter sous forme de tableau les nombres de colonies typiques observées, et se reporter à l'annexe A pour appliquer les méthodes d'analyse statistique appropriées. Les nombres de colonies atypiques sont indicatifs de la sélectivité du milieu.

7.3 Convertir les résultats en logarithmes (si la valeur zéro a été obtenue, majorer toutes les valeurs de 1 ou 0,5 avant conversion).

7.4 Calculer la moyenne et l'écart-type des nombres de colonies obtenus sur chaque milieu.

7.5 Si les écarts-types obtenus sont approximativement égaux (écart inférieur à quatre fois l'écart-type), l'expérience est sous contrôle. Des écarts-types différents peuvent refléter des différences dans les milieux.

7.6 Comme décrit dans l'annexe A, effectuer une analyse de variance unidimensionnelle si l'essai a porté sur un seul échantillon, pour comparer les différences entre les moyennes obtenues pour chaque milieu, et une analyse de variance bidimensionnelle si l'essai a porté sur plusieurs échantillons. Dans le second cas, l'existence ou non d'une interaction significative déterminera la façon dont l'analyse sera poursuivie pour évaluer les différences entre milieux (voir annexe A).

7.7 Si le test  $F$  met en évidence une différence significative lors de l'analyse de variance unidimensionnelle, il convient d'effectuer une analyse plus détaillée.

**7.8** S'il a été décidé *a priori* d'essayer tous les milieux nouveaux par rapport à un milieu de référence, cette comparaison peut être effectuée au moyen d'un test *t* pour les comparaisons par paires ou en formant les contrastes appropriés dans l'analyse de variance.

**7.9** Si la seule décision prise a été de rechercher l'existence éventuelle de différences entre les milieux, il convient d'appliquer *a posteriori* un test de Student-Newman-Keuls pour analyser les différences dans le détail.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

ISO 9998:1991

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e9b02cd8-6648-40e6-a922-bf63eb0ce0bc/iso-9998-1991>