
**Qualité de l'eau — Recherche
et dénombrement des *Escherichia coli*
et des bactéries coliformes dans les eaux
de surface et résiduaires —**

Partie 3:

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

ISO 9308-3:1998

<https://standards.iteh.ai/standards/ISO-9308-3-1998> Water quality — Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water —

Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium



Sommaire	Page
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
5 Appareillage	2
6 Échantillonnage	3
7 Milieu de culture et diluant	3
8 Mode opératoire	4
9 Expression des résultats	6
10 Rapport d'essai	7
11 Données de performance	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	12
Annexe C (informative) Sel de mer synthétique	14
Annexe D (informative) Caractéristiques de performance de la méthode	16
Annexe E (normative) Critères de qualité pour la fabrication du milieu en microplaques	17
Annexe F (normative) Procédure de préparation de microplaques d'étalonnage	18
Bibliographie	21

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9308-3:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0e7cf0c-e788-461a-97e0-d7e167580b35/iso-9308-3-1998>

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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

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 9308-3 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

L'ISO 9308 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes dans les eaux de surface et résiduaires*:

- *Partie 1: Méthode par filtration sur membrane*
- *Partie 2: Méthode par enrichissement en milieu liquide*
- *Partie 3: Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) par ensemencement en milieu liquide*

Les annexes E et F font partie intégrante de la présente partie de l'ISO 9308. Les annexes A à D sont données uniquement à titre d'information.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9308-3:1998

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0e7cf0c-e788-461a-97e0-d7e167580b35/iso-9308-3-1998>

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux de surface et résiduaires —

Partie 3:

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

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 9308 spécifie une méthode miniaturisée pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* (*E. coli*) 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.

ISO 9308-3:1998

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.

La présente méthode ne convient pas à la recherche et au dénombrement de bactéries coliformes autres que les *E. coli*.

2 Références normatives

Les documents normatifs suivants contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui y est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 9308. Pour les références datées, les amendements ultérieurs ou les révisions de ces publications ne s'appliquent pas. Toutefois, les parties prenantes aux accords fondés sur la présente partie de l'ISO 9308 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des documents normatifs indiqués ci-après. Pour les références non datées, la dernière édition du document normatif en référence s'applique. Les membres de l'ISO et de la CEI possèdent le registre des Normes internationales en vigueur.

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

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

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

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

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

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

3 Termes et définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 9308, les termes et définitions donnés dans le Guide 2 ISO/CEI ainsi que le terme et la définition suivants s'appliquent.

3.1

Escherichia coli

E. coli

micro-organisme qui est β -D-glucuronidase positif à une température d'incubation de 44 °C dans le milieu liquide spécifié contenant du 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide (MUG)

4 Principe

L'échantillon dilué estensemencé 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'*E. coli* est indiquée par une fluorescence bleue résultant de l'hydrolyse du MUG. 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.

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 **fioles 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 µm, 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 $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ 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

7.2.1 Diluant Spécial (DS)

Sel marin synthétique ¹⁾	22,5 g
Solution de bleu de bromophénol (optionnel)	10 ml
Eau déminéralisée ou distillée (7.2.2)	1 000 ml

Stériliser à l'autoclave (5.1) à $121 ^\circ\text{C} \pm 3 ^\circ\text{C}$ 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 $121 ^\circ\text{C} \pm 3 ^\circ\text{C}$ 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. D'autres diluants, tels que l'eau distillée, peuvent être utilisés pour le dénombrement d'*E. coli*, sauf si des entérocoques intestinaux doivent être dénombrés à partir des mêmes tubes de dilution.

7.3 Milieu de culture: milieu MUG/EC

Composition:

Tryptone	40 g
Salicine	1 g
Triton X 100®	1 g
MUG (4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide)	100 mg
Eau déminéralisée ou distillée (7.2.2)	1 000 ml

Ajouter à 1 litre d'eau successivement la tryptone, la salicine et le Triton²⁾, tout en maintenant un chauffage doux et une agitation magnétique, puis porter à ébullition jusqu'à dissolution complète. Laisser refroidir et ajouter la solution de MUG, dissous dans 2 ml de *N,N*-diméthylformamide.

AVERTISSEMENT — Le *N,N*-diméthylformamide est toxique et peut provoquer le cancer. Il est dangereux de l'inhaler, de le mettre en contact avec la peau, de l'avalier. Utiliser impérativement sous une hotte d'aspiration de vapeurs chimiques.

Ajuster le pH à $6,9 \pm 0,2$.

Stériliser par filtration sur membrane de porosité moyenne de $0,2 \mu\text{m}$ (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.

8 Mode opératoire

ISO 9308-3:1998
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0e7cf0c-e788-461a-97e0-d7e167580b35/iso-9308-3-1998>

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 montre 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 $3,5 \times 10^4$
Eaux douces superficielles	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 $6,7 \times 10^8$

2) Le Triton X 100 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 9308 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif du produit ainsi désigné. Des produits équivalents peuvent être utilisés s'il est démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

8.2 Préparation des dilutions

NOTE Il est recommandé d'utiliser ces 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 (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 90 mm.

À l'aide de la pipette multicanaux (5.8) munie de huit cônes stériles (5.9), répartir 200 μ l 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 μ l 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 $44\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ 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	ISO 9308-3:1998
1/20	5 (+) sur 32	https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/c0e7cf0c-e788-461a-97e0-d7e167580b35/iso-9308-3-1998

Consigner 32/5 comme étant le nombre caractéristique.

EXEMPLE 2: Eau superficielle

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 volumesensemencés. 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'*E. coli* 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 *E. coli* 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 *E. coli* 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 *E. coli* 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.