
**Qualité de l'eau — Échantillonnage
pour analyse microbiologique**

Water quality — Sampling for microbiological analysis

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 19458:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-ea5837c66fb3/iso-19458-2006)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-
ea5837c66fb3/iso-19458-2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-ea5837c66fb3/iso-19458-2006)



PDF – Exonération de responsabilité

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19458:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-ea5837c66fb3/iso-19458-2006>

© ISO 2006

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, aucune partie de cette publication ne peut être reproduite ni utilisée sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé, électronique ou mécanique, y compris la photocopie et les microfilms, sans l'accord écrit de l'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax. + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Point de prélèvement	1
4 Technique de prélèvement	2
5 Transport et conservation	11
Annexe A (informative) Détermination a priori du nombre d'échantillons à analyser pour déterminer la concentration moyenne de microbes présents dans l'eau avec une confiance donnée, en cas de dénombrement de micro-organismes par culture	13
Annexe B (informative) Valeurs recommandées (R) et acceptables (A) pour la durée maximale de conservation d'échantillon incluant le temps de transport et les températures, sauf spécification contraire dans des normes spécifiques	16
Bibliographie	17

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19458:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-ea5837c66fb3/iso-19458-2006>

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 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

L'ISO 19458 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 19458:2006
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-ea5837c66fb3/iso-19458-2006>

Introduction

Un échantillonnage approprié est essentiel pour fournir des échantillons représentatifs au laboratoire d'analyse. Les modalités de l'échantillonnage dépendront de l'objectif de celui-ci, mais aussi de la nature des échantillons. Les micro-organismes sont des organismes vivants. De plus, lors de leur introduction dans l'eau, ils ne forment pas une solution parfaite mais une suspension ayant son propre degré d'hétérogénéité.

Les objectifs d'échantillonnage peuvent être multiples et ceux-ci sont décrits dans la série de normes ISO 5667 (l'ISO 5667-1, l'ISO 5667-2 et l'ISO 5667-3):

- a) déterminer la conformité d'une eau à une spécification réglementaire de qualité;
- b) caractériser toute contamination, son niveau (moyen) et ses variations:
 - 1) quelle est sa variation aléatoire?
 - 2) existe-t-il une tendance?
 - 3) existe-t-il des cycles?
- c) identifier les sources de pollution.

Le nombre ou la fréquence des échantillons variera en fonction de l'objectif du prélèvement.

Le nombre minimal d'échantillons sera faible si la concentration moyenne diffère considérablement de la spécification (très inférieure ou très supérieure), et le nombre minimal d'échantillons sera plus élevé si la concentration moyenne est proche de la spécification. Il en est de même dans le cas b) lorsqu'il s'agit d'une tendance: la fréquence de prélèvement est d'autant plus élevée que la tendance n'apparaît pas clairement (voir aussi l'Annexe A).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 19458:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-ea5837c66fb3/iso-19458-2006>

Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente norme n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente norme d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité, et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais réalisés conformément à la présente norme soient effectués par un personnel convenablement formé.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale fournit des conseils sur les régimes de planification du prélèvement d'eau, sur les modes opératoires de prélèvement en vue de l'analyse microbiologique et le transport, et sur la manipulation et la conservation des échantillons avant le début de l'analyse. Elle porte sur les prélèvements pour recherches microbiologiques.

Des informations générales sur l'échantillonnage à partir de différentes masses d'eau sont données dans les parties respectives de l'ISO 5667.

[ISO 19458:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-ea5837c66fb3/iso-19458-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5-ea5837c66fb3/iso-19458-2006>

2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les amendements).

ISO 5667-1, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1: Lignes directrices pour la conception des programmes et techniques 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: Lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d'eau*

3 Point de prélèvement

Le site de prélèvement doit présenter des caractéristiques représentatives et rendre compte de toute variation verticale, horizontale et temporelle. Il doit être identifié avec précision, selon les recommandations générales fournies dans l'ISO 5667-1 et l'ISO 5667-2, en tenant compte des aspects supplémentaires spécifiques à la microbiologie.

Il convient d'éviter les points de prélèvement pour lesquels les conditions ne sont pas stables. L'hétérogénéité du système hydraulique doit être prise en considération. Dans le cadre d'études portant sur l'efficacité de la désinfection, le point de prélèvement doit être choisi de sorte à garantir que la réaction soit complète.

EXEMPLE Des exemples de l'influence de l'hétérogénéité du système sur les résultats sont donnés ci-dessous.

- Il n'est pas équivalent de prélever un échantillon de subsurface ou de surface, ou un échantillon de subsurface «contaminé» lors de la remontée à travers le film superficiel. Dans certains cas (par exemple lacs, piscines), la concentration dans le film superficiel peut être 1 000 fois supérieure à celle en subsurface.
- Tous les points d'un réseau ne sont pas équivalents car il peut exister des culs-de-sac et des sections où le débit est réduit, notamment si le réseau est alimenté par deux sources.
- La qualité de l'eau à la sortie d'un réservoir bien mélangé est généralement la même qu'au sein de la masse d'eau mais elle peut varier considérablement par rapport à l'entrée du réservoir.

4 Technique de prélèvement

4.1 Personnel

La formation formelle, les dossiers de formation et la détermination des compétences doivent être décrits pour tout personnel en charge des prélèvements et cette information doit être correctement documentée.

4.2 Flacons de prélèvement

4.2.1 Généralités

Pour les prélèvements de routine (par exemple prélèvements à des robinets, dans les eaux pour activités de loisir, dans les eaux de piscine) utiliser des flacons propres et stériles. Il convient que le volume des flacons soit adapté à l'analyse de tous les paramètres demandés.

Pour le prélèvement par immersion dans des eaux propres, utiliser des flacons stériles à l'intérieur et à l'extérieur, protégés par du papier kraft (à maintenir au sec après le passage à l'autoclave), du papier d'aluminium ou d'un sachet extérieur en plastique.

Si ce sachet ne peut être passé à l'autoclave, la stérilisation devra se faire au moyen de rayons gamma ou à l'oxyde d'éthylène. Le sachet peut ensuite être ouvert juste avant le prélèvement et peut également servir de gant pour tenir le flacon et garantir des conditions d'asepsie maximales avant de le placer sur une perche ou autre appareil de prélèvement stérilisable.

Il est également possible de désinfecter la paroi extérieure des flacons de prélèvement immédiatement avant l'immersion au moyen d'un désinfectant approprié, tel que l'isopropanol (4.3.1.1) et de les laisser sécher avant utilisation. Ceci n'est pas adapté à l'analyse de bactéries sporulées.

Dans la plupart des cas, des flacons de 500 ml sont suffisants dans la mesure où moins de cinq catégories de micro-organismes sont mesurées, impliquant chacune l'ensemencement d'un volume maximal de 100 ml. Dans certains cas, des volumes plus importants sont nécessaires, par exemple:

- pour l'analyse d'eau embouteillée (250 ml par paramètre);
- pour les *Legionella* spp. ou *Salmonella* spp. (jusqu'à 1 l);
- pour les virus, les kystes de *Giardia*, les oocystes de *Cryptosporidium*, les amibes dans les eaux propres, de 10 à plusieurs centaines de litres ou plus sont examinés. En général, une étape de concentration est réalisée sur le site au moyen d'un filtre à cartouche qui est ensuite transporté au laboratoire.

Les flacons peuvent être en verre ou en différentes matières plastiques (polypropylène, polystyrène, polyéthylène, polycarbonate). Généralement, le verre est préféré en cas de réutilisation, et le polyéthylène est utilisé pour un usage unique.

L'adhérence aux surfaces peut diminuer la détection de micro-organismes, et la tension de surface tangentielle critique γ doit être pris en considération si un matériau non standard est utilisé [13].

Le dispositif de fermeture peut être un bouchon en verre dépoli ou en plastique pour les flacons en verre, une cape à pression en plastique pour les flacons ou bocaux en plastique, ou une capsule à vis métallique ou plastique pour l'un ou l'autre. Il convient que les ouvertures des flacons fermés par des bouchons en plastique ou en verre disposent aussi d'une autre protection contre la contamination, par exemple du papier d'aluminium.

Quand de grands volumes sont nécessaires pour la recherche, par exemple de virus, de *Salmonella* spp., d'amibes, d'oocystes de *Cryptosporidium*, de kystes de *Giardia*, il est parfois nécessaire d'analyser des dizaines de litres ou des centaines de litres. Pour pallier les difficultés de manipulation, de réfrigération et d'agitation de tels volumes, il est recommandé de procéder à une étape de concentration *in situ* (par floculation, centrifugation ou filtration). Des pompes péristaltiques peuvent être utilisées avec des tubulures stériles.

NOTE 1 Les capsules en métal, notamment celles en aluminium, peuvent libérer de la toxicité lorsqu'elles sont autoclavées. Ceci peut être évité si elles incorporent un revêtement étanche thermorésistant.

NOTE 2 Certains matériaux peuvent également entraîner la formation de sous-produits toxiques lorsqu'ils sont stérilisés à chaud, même au four, ou induire des variations de pH.

NOTE 3 Certaines marques de coton utilisées pour boucher la verrerie peuvent devenir toxiques si elles sont chauffées trop longtemps à des températures trop élevées.

NOTE 4 Les capes à pression en plastique fixées aux flacons ou bocaux présentent plusieurs avantages compte tenu du fait qu'elles sont aussi étanches que les capsules à vis, et que les capes peuvent rester ouvertes, ce qui facilite le remplissage et le pipetage. Lorsque la cape est ouverte, elle reste attachée au flacon de sorte que les flacons et les dispositifs de fermeture sont maintenus ensemble et la cape est également protégée contre la contamination.

4.2.2 Stérilisation des flacons

ISO 19458:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/4ada84a7-687c-45c6-90e5->

En cas de réutilisation, nettoyer les flacons en verre et leur dispositif de fermeture à l'aide d'un détergent non toxique, exempt de phosphore, puis les rincer soigneusement avec de l'eau déionisée ou distillée.

Passer les flacons à l'autoclave à (121 ± 3) °C pendant au moins 15 min. Laisser le dispositif de fermeture des flacons desserré pour permettre à la vapeur de remplacer la totalité de l'air contenu pendant la montée en température, et pour éviter que les flacons en plastique s'écrasent pendant le refroidissement. Serrer les capsules à vis après la stérilisation. Passer à l'autoclave les bouchons en verre séparément du flacon ou utiliser un séparateur en papier ou en aluminium pour éviter le coincement du bouchon lors du refroidissement.

Si besoin est, stériliser les flacons dans un four pendant au moins 1 h à (170 ± 10) °C. Placer une bande de papier ou un bout de ficelle entre le bouchon en verre dépoli et le goulot du flacon pour éviter qu'ils se coincent pendant le refroidissement. Pour les flacons, il convient qu'il y ait une traçabilité de la date de stérilisation.

Contrôler l'efficacité du procédé de stérilisation à l'aide d'indicateurs chimiques ou biologiques.

Lorsqu'aucune autre méthode de stérilisation n'est possible, désinfecter les flacons en les immergeant dans de l'eau bouillante pendant au moins 30 min. Immédiatement après l'ébullition, vider les flacons et les fermer avec des capsules bouillies emballées dans du papier propre.

NOTE 1 Les flacons en polyéthylène peuvent être stérilisés par exposition au gaz oxyde d'éthylène mais, en raison de sa toxicité, ce mode opératoire est réalisé dans des installations spécialisées et du temps est donné pour la désorption de l'oxyde d'éthylène. En conséquence, il n'est pas utilisé comme mode opératoire de routine dans les laboratoires.

NOTE 2 L'exposition aux rayons gamma produits par une source de ^{60}Co ou ^{137}Cs ou l'exposition aux électrons accélérés d'énergie suffisante (de 1×10^4 Gy à 2×10^4 Gy) sont des techniques de stérilisation très efficaces, disponibles dans des installations spécialisées. Toute activité antibactérienne résiduelle est éliminée, en revanche certains matériaux peuvent être altérés par polymérisation après une exposition répétée aux rayonnements.

4.2.3 Neutralisation des désinfectants

Pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau désinfectée par un oxydant (par exemple chlore, chloramines, brome ou ozone), l'action de l'oxydant doit être interrompue dès que l'échantillon est prélevé. Ajouter un agent réducteur, tel que le thiosulfate de sodium, dans les flacons de prélèvement.

La masse théorique du thiosulfate de sodium (anhydre) nécessaire pour neutraliser 1 mg de chlore est de 7,1 mg. En conséquence, on ajoute 0,1 ml d'une solution de thiosulfate de sodium pentahydraté (4.3.1.2) pour chaque 100 ml contenu dans le flacon. Ceci neutralisera au minimum 2 mg/l et jusqu'à 5 mg/l de chlore libre, en fonction des dynamiques de neutralisation, ce qui est suffisant pour la majorité des échantillons.

Dans certaines circonstances, telles que pédiluves dans les piscines, mesures de désinfection (par exemple éradication des *Legionella* dans les réseaux de distribution d'eau potable), les concentrations de chlore peuvent être supérieures, auquel cas un dosage proportionnellement plus élevé de thiosulfate de sodium sera nécessaire.

Le thiosulfate de sodium n'est pas détruit par le passage à l'autoclave ni par la chaleur sèche. Veiller à ce que le pH de la solution de thiosulfate de sodium soit presque neutre (un pH bas peut entraîner une décomposition).

Le thiosulfate de sodium n'a pas d'effet sur l'échantillon et peut également être utilisé pour les eaux non chlorées.

NOTE Il a été déclaré que les *Legionella* étaient sensibles au sodium et qu'il était préférable d'utiliser du thiosulfate de potassium. Toutefois, aucun effet néfaste du sodium n'a été détecté aux concentrations utilisées pour neutraliser des concentrations habituelles de chlore.

Pour d'autres désinfectants, des mesures de neutralisation correspondantes doivent être prises. Si la neutralisation n'est pas possible ou réalisable, ceci doit être consigné.

Des agents chélatants ont été recommandés pour protéger les bactéries contre l'action toxique de métaux lourds tels que le cuivre ou le zinc. L'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) ou le nitrilotriacétate de sodium (NTA) ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_6$) peuvent être utilisés en solution stérilisée par filtration à une concentration finale d'environ 50 mg/l mais il convient de ne l'ajouter qu'en cas de nécessité (par exemple eau traitée à l'argent ou au cuivre). L'argent peut également être neutralisé par du sulfure de sodium. Ajouter 1 ml d'une solution de sulfure de sodium (4.3.1.3) dans 1 l d'échantillon.

4.2.4 Contrôle de la qualité des flacons de prélèvement

4.2.4.1 Essais de stérilité

Le laboratoire doit s'assurer de la stérilité des flacons de prélèvement, qu'ils soient préparés en interne ou dans le commerce, qu'ils soient en verre ou en plastique. Il convient que les flacons préparés dans le commerce soient accompagnés d'un certificat de stérilisation, condition de leur acceptation. Il est également recommandé de réaliser des essais de stérilité sur le lot en usage. Ceci correspond au lot de flacons après étiquetage, ajout d'agents neutralisants le cas échéant et stockage.

La stérilité des flacons peut généralement être garantie par le contrôle du procédé de stérilisation. Dans le cas contraire, il convient de soumettre les flacons à des essais de stérilité.

EXEMPLE Des exemples de modes opératoires d'essai de stérilité sont fournis ci-dessous (généralement réalisés au taux de 1 pour 100 flacons):

a) Méthode du «flacon roulé»

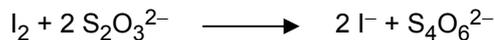
Cette méthode consiste à introduire 20 ml ou 50 ml de gélose nutritive en fusion (gélose pour dénombrement en boîte) dans le flacon d'essai et à recouvrir la paroi du flacon avec la gélose en le faisant tourner pendant la phase de refroidissement (sous un mince filet d'eau, si nécessaire). Il convient que l'incubation à $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$ pendant 5 j ne donne lieu à aucune croissance visible.

b) Méthode en bouillon liquide

Cette méthode consiste à placer entre 20 ml et 50 ml de bouillon au thioglycolate ou autre bouillon nutritif dans le flacon en le faisant tourner de façon à mouiller les parois et à incubé à (22 ± 2) °C pendant 5 j. Il convient qu'aucune turbidité n'apparaisse si le flacon est stérile.

4.2.4.2 Essai de présence d'agents neutralisants

La présence de thiosulfate peut être vérifiée par une méthode iodométrique:



Ajouter 10 ml d'eau distillée dans le flacon et titrer avec une solution d'iode (4.3.1.4), en utilisant de l'amidon ou du thiofène comme agent de titrage pour la détermination du point d'équivalence.

4.2.4.3 Essai de toxicité résiduelle dans les flacons de prélèvement

La toxicité résiduelle dans les flacons de prélèvement peut provenir du mode opératoire de nettoyage de la verrerie, du dégagement de composants ou d'additifs des flacons en plastique et également du procédé de stérilisation. Pour une utilisation courante de flacons en verre ou en polyéthylène, il n'est pas requis de vérifier régulièrement la toxicité mais, en cas de doute, procéder à l'essai conformément à Geldreich, 1975 [8] (par exemple).

4.3 Réactifs, appareillage et matériel**4.3.1 Réactifs**

4.3.1.1 Éthanol, fraction volumique φ (C₂H₅OH) = 70 %, isopropanol, fraction volumique φ [(CH₃)₂CHOH] = 70 % ou solution d'hypochlorite, ρ (ClO⁻) ≈ 1 g/l.

4.3.1.2 Solution de thiosulfate de sodium pentahydraté, ρ (Na₂S₂O₃, 5H₂O) = 18 mg/ml.

4.3.1.3 Solution de sulfure de sodium, ρ (Na₂S) = 0,1 mg/ml.

4.3.1.4 Solution d'iode, $c(I_2)$ = 0,05 mol/l.

4.3.2 Appareillage et matériels

Outre les flacons de prélèvement, les éléments suivants peuvent être nécessaires.

4.3.2.1 Savon et serviettes.

4.3.2.2 Chalumeau à gaz et recharge.

4.3.2.3 Bocaux ou béciers, chiffons désinfectants.

4.3.2.4 Briquet, allumettes.

4.3.2.5 Marqueurs, stylos, étiquettes.

4.3.2.6 Clés, pinces, tournevis, couteau.

4.3.2.7 Glacière, avec glace ou blocs réfrigérants, réfrigérateurs portables ou compartiments réfrigérants dans des véhicules.

4.3.2.8 Thermomètre ou enregistreur de température.