

---

---

**Qualité de l'eau — Lignes directrices  
générales pour le dénombrement des  
micro-organismes sur milieu de culture**

*Water quality — General guidance on the enumeration of  
micro-organisms by culture*

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

[ISO 8199:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005>



**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 8199:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2005

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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Version française parue en 2007

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction .....	vi
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Principe</b> .....	1
4 <b>Généralités</b> .....	2
5 <b>Diluants et milieux de culture</b> .....	2
6 <b>Stérilisation des appareils et de la verrerie</b> .....	5
7 <b>Échantillons</b> .....	5
8 <b>Dénombrement après ensemencement des prises d'essai de l'échantillon sur (ou dans) un milieu solide</b> .....	6
9 <b>Dénombrement par ensemencement en milieu liquide</b> .....	16
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Critères de choix d'une technique de dénombrement</b> .....	24
<b>Annexe B</b> (informative) <b>Tables NPP</b> .....	29
<b>Bibliographie</b> .....	37

[ISO 8199:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005>

## 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 8199 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 8199:1988) qui a fait l'objet d'une révision technique.

Cette version corrigée de l'ISO 8199:2005 intègre les principales modifications suivantes:

- |   |   |
|---|---|
| — 5.2.5 [point b), 4 <sup>e</sup> alinéa] | déplacement de la deuxième phrase «Si la solution...» à l'alinéa «Préparation»; |
| — 8.4.2 (Exemple 1)                       | remplacement de «et si $V_s$ est 1 ml» par «et si $V_s$ est égal à 1 ml»;       |
| — 8.4.2 (Exemple 2)                       | remplacement de «et si $V_s$ est 1 ml» par «et si $V_s$ est égal à 100 ml»;     |
| — 8.4.3 (exemple)                         | remplacement de «et si $V_s$ est 1 ml» par «et si $V_s$ est égal à 1 ml» et     |
| — Bibliographie                           | correction des Références [14], [16], [17] et [19].                             |

Les équations en 8.4.2 et en 9.5.2.1 ont été numérotées, ce qui conduit aux modifications suivantes:

- 8.4.2 (équations non numérotées) numérotation en Équation (3) et Équation (4);
- 8.4.3 (équation) renumérotation en Équation (5);
- 8.4.4.1 (équation) renumérotation en Équation (6);
- 9.5.2.1 (équation non numérotée) numérotation en Équation (7);
- 9.5.2.2 (équation) renumérotation en Équation (8);
- 9.6.2 (équation) renumérotation en Équation (9); et
- 9.6.3 (équation) renumérotation en Équation (10).

Plusieurs corrections mineures ont été apportées, notamment:

- 8.2.3.2 (alinéa 3) remplacement de «fondu» par «maintenu en surfusion»;
- 8.4.2 [sous l'Équation (2)] dans l'explication des symboles « $d_1, d_2, \dots, d_i$ », suppression du mot «prise d'essai»;
- 9.3.3 (dernier alinéa, 7<sup>e</sup> ligne) ajout du mot «puits» après « $12 \times 5$  ml» et « $24 \times 3$  ml»;
- 9.5.3.2 (exemple) dans l'équation à la fin de l'exemple, remplacement de « $1,61(5 \text{ ml}) \times 100 \text{ ml}$ » par « $(1,61/5 \text{ ml}) \times 100 \text{ ml}$ »;
- 9.5.3.3 (alinéa 2, 5<sup>e</sup> ligne) ajout de parenthèses à «3 ou 5» et
- A.2.3.1 remplacement de «une valeur de référence acceptée» par «la valeur de référence acceptée».

## Introduction

Les techniques d'isolement et de dénombrement des micro-organismes, basées sur la capacité de ces derniers à se multiplier sur des milieux de culture spécifiques, 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 8199:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005>

# Qualité de l'eau — Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture

**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 indispensable que les essais menés conformément à la présente Norme Internationale le soient par du personnel dûment formé.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale présente des lignes directrices 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 techniques de dénombrement possibles et les critères de choix d'une technique particulière. La présente Norme internationale concerne principalement les bactéries, les levures et les champignons. Certains aspects peuvent aussi s'appliquer aux virus et aux parasites.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005>

## 2 Références normatives

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005>

Les documents de référence suivants sont indispensables pour 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 (y compris les éventuels amendements) s'applique.

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

ISO 19458, *Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique*

## 3 Principe

Le principe général de ces techniques consiste à ensemencer un volume connu d'échantillon d'eau sur ou dans un milieu de culture (solide ou liquide). Il est supposé qu'au cours de l'incubation, chaque micro-organisme présent se multiplie pour donner soit une colonie visible directement sur milieu solide, soit des changements d'aspect 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 Généralités

*Uniformité des températures et des durées (d'incubation):* Les amplitudes acceptées de température et de durée suivantes sont appliquées pendant l'incubation et la conservation, dans la mesure où elles conviennent à l'organisme cible prévu et sauf autre indication dans la norme spécifique.

Températures de conservation:  $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$ ,  $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ ,  $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ ;

Températures d'incubation:  $(22 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ,  $(36 \pm 2) ^\circ\text{C}$ ;

Températures de stérilisation:  $(115 \pm 3) ^\circ\text{C}$ ,  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$ ,  $(170 \pm 10) ^\circ\text{C}$ ;

Durées d'incubation:  $(21 \pm 3) \text{ h}$ ,  $(44 \pm 4) \text{ h}$ ,  $(68 \pm 4) \text{ h}$ .

Le cas échéant, d'autres durées et d'autres températures peuvent être spécifiées pour des méthodes données.

Les limites supérieures de la température d'incubation sont très strictes (elles peuvent avoir une grande influence sur la croissance). Les limites inférieures de température peuvent être dépassées pendant de courtes périodes, par exemple lors de l'ouverture de la porte de l'incubateur, mais elles doivent rapidement être rétablies.

*Tolérances sur les volumes et les masses:* Sauf indication contraire, l'amplitude de toute valeur mesurée est de: valeur citée  $\pm 5\%$ .

## iTeh STANDARD PREVIEW

## 5 Diluants et milieux de culture (standards.iteh.ai)

### 5.1 Généralités

ISO 8199:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005>

#### 5.1.1 Exigences de qualité

Les composants entrant dans la préparation des milieux de culture doivent être de qualité constante et les produits chimiques de qualité analytique reconnue. Des produits chimiques de qualité différente peuvent être utilisés à condition de pouvoir prouver qu'ils donnent les mêmes résultats. Il est également possible d'utiliser des milieux complets ou des diluants déshydratés. Les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée sur verre ou déminéralisée, 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 3696:1987, qualité 3.

Sauf indication contraire, les ingrédients sont ajoutés au volume d'eau au lieu de venir compléter un certain volume, conformément à la pratique en microbiologie pour la préparation des milieux de culture.

Vérifier la qualité des milieux de culture, des diluants et des filtres avant utilisation, par exemple en suivant le mode opératoire décrit dans l'ISO 7704, l'ISO/TS 11133-1 ou l'ISO/TS 11133-2.

#### 5.1.2 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  $(121 \pm 3) ^\circ\text{C}$  durant 15 min est appropriée. Toutefois, une durée et une température différentes peuvent parfois s'avérer nécessaires et les indications sont alors données dans chaque norme.

La stérilisation par filtration est également possible pour les substances thermolabiles, avec un filtre de diamètre moyen de pores de  $0,2 \mu\text{m}$ , spécifié comme adapté à la stérilisation par le fabricant.

## 5.2 Diluants

Les diluants indiqués dans ce paragraphe sont d'usage courant en microbiologie de l'eau. Toutefois, la liste n'est pas exhaustive et il est possible d'utiliser d'autres diluants adaptés.

Après la préparation, répartir chaque solution dans les bouteilles et stériliser, par exemple, en autoclave à  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 min. Il est aussi possible de répartir le diluant en observant la meilleure asepsie après sa stérilisation. Conserver à température ambiante ou au réfrigérateur à  $(5 \pm 3)$  °C durant 6 mois au plus. Si le diluant prend un aspect anormal, le mettre au rebut.

### 5.2.1 Solution saline

#### Composition

Chlorure de sodium (NaCl)	8,5 g
Eau (voir 5.1.1)	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ ] ou une solution d'acide chlorhydrique [ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ ] de sorte qu'après stérilisation (voir 5.1.2) le pH soit de  $7,0 \pm 0,5$  à 25 °C.

### 5.2.2 Eau peptonée

#### Composition

Hydrolysats enzymatique de caséine (peptone)	1,0 g
Eau (voir 5.1.1)	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ ] ou une solution d'acide chlorhydrique [ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ ] de sorte qu'après stérilisation (voir 5.1.2) le pH soit de  $7,0 \pm 0,5$  à 25 °C.

### 5.2.3 Solution peptonée saline

#### Composition

Hydrolysats enzymatique de caséine (peptone)	1,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	8,5 g
Eau (voir 5.1.1)	1 000 ml

#### Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ ] ou une solution d'acide chlorhydrique [ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ ] de sorte qu'après stérilisation (voir 5.1.2) le pH soit de  $7,0 \pm 0,5$  à 25 °C.

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

ISO 8199:2005

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005>

#### 5.2.4 Solution de Ringer, quart de concentration

*Composition*

Chlorure de sodium (NaCl)	2,25 g
Chlorure de potassium (KCl)	0,105 g
Chlorure de calcium (anhydre) (CaCl <sub>2</sub> )	0,12 g
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO <sub>3</sub> )	0,05 g
Eau (voir 5.1.1)	1 000 ml

*Préparation*

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant si nécessaire. Ajuster le pH en ajoutant une solution d'hydroxyde de sodium [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ ] ou une solution d'acide chlorhydrique [ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ ] de sorte qu'après stérilisation (voir 5.1.2) le pH soit de  $7,0 \pm 0,2$  à  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 5.2.5 Solution tampon de phosphate

a) Solution de phosphate

*Composition*

Dihydrogéo-orthophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	34 g
Eau (voir 5.1.1) (q.s.p.)	1 000 ml

*Préparation*

Dissoudre le dihydrogéo-orthophosphate de potassium dans 500 ml d'eau. Ajuster le pH à  $7,2 \pm 0,2$  avec une solution d'hydroxyde de sodium [ $c(\text{NaOH}) = 1 \text{ mol/l}$ ] ou une solution d'acide chlorhydrique [ $c(\text{HCl}) = 1 \text{ mol/l}$ ]. Compléter avec de l'eau à 1 000 ml. Si la solution doit être conservée, la stériliser (voir 5.1.2) auparavant.

b) Solution de chlorure de magnésium

*Composition*

Chlorure de magnésium (MgCl <sub>2</sub> )	38 g
Eau (voir 5.1.1)	1 000 ml

Il est aussi possible d'utiliser une masse équivalente (99 g) de sulfate de magnésium (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O).

*Préparation*

Dissoudre le chlorure de magnésium dans l'eau. Si la solution doit être conservée, la stériliser (voir 5.1.2) auparavant.

## c) Solution finale

*Composition*

Solution de phosphate (a)	1,25 ml
Solution de chlorure de magnésium (b)	5,0 ml
Eau (voir 5.1.1)	1 000 ml

*Préparation*

Ajouter la solution de phosphate (a) et la solution de chlorure de magnésium (b) à l'eau, répartir en volumes adéquats et stériliser (voir 5.1.2). Il convient que le pH final soit de  $7,0 \pm 0,2$  à 25 °C.

**5.3 Milieux de culture**

Lorsqu'un flacon de milieu de culture déshydraté (produit chimique) est ouvert, noter la date sur le récipient et y indiquer une durée de conservation maximale.

En général, après stérilisation en récipients hermétiques, la plupart des milieux de culture peuvent être conservés dans des conditions satisfaisantes pendant plusieurs mois à température ambiante, à condition d'être tenus à l'abri de la lumière et maintenus hermétiquement fermés. Les milieux répartis stérilement peuvent être conservés à  $(5 \pm 3)$  °C pendant 1 mois au maximum, ou plus si cela est autorisé. Avant utilisation, les examiner avec soin afin de détecter toute contamination, évaporation excessive ou tout autre signe de détérioration. La plupart des réactifs se conservent mieux à  $(5 \pm 3)$  °C. Les milieux de culture fournis préconditionnés doivent être utilisés selon les instructions du fabricant.

Prérefroidir le milieu de culture entre 45 °C et 50 °C, s'il est nécessaire d'y ajouter des substances thermosensibles après la stérilisation en autoclave.

[ISO 8199:2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005)

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005)

[09ced295b262/iso-8199-2005](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d2cb2284-a2c1-4cca-a42d-09ced295b262/iso-8199-2005)

**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:

- dans un four, à  $(170 \pm 10)$  °C durant 1 h au minimum (hormis la durée de préchauffage);
- dans un autoclave, à  $(121 \pm 3)$  °C durant 15 min au minimum.

Lorsque les membranes filtrantes ne sont pas stériles, les stériliser avant utilisation selon les instructions du fabricant.

**7 Échantillons****7.1 Échantillonnage**

Effectuer l'échantillonnage selon l'ISO 19458.

**7.2 Préparation de l'échantillon**

Avant l'examen, homogénéiser 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.

Dans le cas des numérations sur gélose, il est possible d'utiliser des dilutions décimales. Dans le cas de la filtration sur membrane (surface plus réduite), il est recommandé d'appliquer des facteurs de dilution moindres.

Pour les dilutions décimales, répartir 90 ml ou 9 ml de diluant et transvaser dans des flacons ou des tubes de dilution stériles. Il est également possible d'utiliser des quantités de diluant préalablement stérilisé dans des flacons à bouchon à vis. Procéder à une ou à plusieurs dilutions décimales en ajoutant un volume d'échantillon d'eau à neuf volumes de diluant. À l'aide d'une autre pipette ou par un moyen mécanique, homogénéiser et prélever un volume de cette dilution pour l'ajouter à un nouveau tube contenant neuf volumes de diluant. Répéter ces opérations autant de fois que 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, le volume de diluant doit être ajusté en fonction du volume d'échantillon. Plusieurs approches sont possibles, par exemple des séries de dilutions d'ordre 3 ou 4 ou des séries de dilutions décimales pour lesquelles sont filtrés des volumes de 10 ml et de 30 ml. Des dilutions d'ordre 4 peuvent être effectuées en suivant la méthode décrite plus haut pour les dilutions décimales, en mélangeant alors un volume d'échantillon d'eau avec trois volumes de diluant.

Si de hautes concentrations de l'organisme cible sont attendues, il est possible d'utiliser des facteurs de dilution d'ordre 100.

Pour les lignes directrices générales concernant la préparation des dilutions décimales, se reporter à l'ISO 6887-1.

## 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, ou une dilution, est ensemencée directement ou après concentration sur une membrane sur la surface d'un milieu de culture solide spécifique ou dans un milieu maintenu en surfusion de sorte qu'après incubation, les micro-organismes forment des colonies dans ou sur le milieu.

Pour des raisons pratiques, chaque colonie est considérée comme provenant d'un seul micro-organisme ou d'un agrégat de micro-organismes présents dans la prise d'essai au moment de l'ensemencement. En tenant compte du volume de la prise d'essai et du nombre de colonies formées, le résultat peut donc être exprimé comme le nombre d'unités formant colonies (ufc) ou de particules formant colonies (pfc) dans un volume donné de l'échantillon, par exemple 1 ml ou 100 ml.

### 8.2 Modes opératoires

#### 8.2.1 Généralités

Trois modes opératoires fondamentaux peuvent être utilisés pour l'ensemencement en milieu solide.

##### a) Technique par incorporation

La prise d'essai est mélangée 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) Technique par étalement

La prise d'essai est étalée 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) Technique par filtration sur membrane

La prise d'essai est filtrée à travers une membrane qui retient les micro-organismes recherchés. La membrane est alors placée sur un milieu gélosé ou sur un coussin en papier absorbant imprégné de milieu de culture liquide ou réhydraté. 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 vers le bas, 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, ainsi que de la nature des micro-organismes recherchés (voir Annexe A, Article A.3), de leur concentration probable, de la récupération effective des micro-organismes en état de stress ou abîmés de manière sublétales ainsi que de la fidélité et de la sensibilité requises pour l'essai. Les indications concernant les volumes d'échantillon d'eau qui peuvent être utilisés pour chaque technique sont données en 8.2.3.1, en 8.2.4.1 et en 8.2.5.1 et les limites de détection sont mentionnées dans l'Article A.2. De plus, l'exactitude des techniques est traitée dans l'Article A.2. Les exigences réglementaires peuvent également influencer sur le choix de la technique à utiliser en indiquant, par exemple, la fidélité souhaitée ou si la détermination de la présence ou de l'absence d'un organisme dans un volume donné est suffisante.

## 8.2.3 Technique par incorporation

### 8.2.3.1 Prise d'essai

Le volume de la prise d'essai de l'échantillon, ou d'une dilution de l'échantillon, peut varier de 0,1 ml à 5 ml selon la dimension de la boîte de Petri et le volume de milieu de culture utilisé. Il convient de choisir la dilution de sorte que le nombre présumé de colonies formées sur les boîtes de 90 mm à 100 mm de diamètre soit compris entre 10 et 150. Il convient que le nombre total de colonies (typiques et atypiques) dans la boîte soit inférieur à 300 (voir l'ISO 7218). Noter toutefois que le nombre total de colonies dénombrables dépend de la taille des colonies et qu'il peut être nécessaire de le réduire dans le cas de colonies de taille importante.

### 8.2.3.2 Ensemencement

Faire fondre la quantité de milieu nécessaire à l'eau bouillante ou par un autre procédé adapté [par exemple enceinte thermostatée (synonymes: étuve, incubateur), stérilisateur vapeur (autoclave) ou four à micro-ondes, à condition que la combinaison durée/température ait été validée pour la préparation du milieu concerné]. Éviter la surchauffe et retirer le milieu dès qu'il est fondu. Placer le milieu fondu dans un bain d'eau thermostaté à  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$  pendant un temps suffisant pour qu'il s'équilibre à cette température. Il est recommandé de ne pas maintenir un milieu en surfusion pendant plus de 4 h. Ne pas faire fondre les milieux gélosés plus d'une fois.

Préparer et marquer les boîtes de Petri requises. Effectuer toutes les dilutions nécessaires conformément à 7.2 et, après avoir vigoureusement mélangé, répartir les prises d'essai dans les boîtes.

Retirer l'un après l'autre du bain d'eau thermostaté les tubes ou les flacons de milieu maintenu en surfusion, sécher l'extérieur des tubes ou des flacons et flamber le col. Ajouter immédiatement le milieu dans chaque boîte de Petri, en évitant de le verser sur la prise d'essai afin de réduire le choc thermique et mélanger soigneusement afin d'obtenir une répartition homogène des micro-organismes. En règle générale, un volume de 15 ml de milieu est utilisé pour une prise d'essai de 1 ml ou de 2 ml. Pour des prises d'essai plus importantes, la concentration du milieu doit être ajustée en conséquence. Laisser refroidir les boîtes sur une surface horizontale pour laisser la gélose se solidifier. Dès que la gélose s'est solidifiée, incubé les boîtes conformément à 8.2.6.

**NOTE** Dans le cas de laboratoires analysant un grand nombre d'échantillons, des systèmes de préparation, de versement et d'empilement de la gélose peuvent se révéler utiles.