

---

---

**Qualité de l'eau — Exigences et  
lignes directrices générales pour les  
examens microbiologiques sur milieu  
de culture**

*Water quality — General requirements and guidance for  
microbiological examinations by culture*

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

[ISO 8199:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018>



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

ISO 8199:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018>



### DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, ou la diffusion sur l'internet ou sur un intranet, sans autorisation écrite préalable. Une autorisation peut être demandée à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 401 • Ch. de Blandonnet 8  
CH-1214 Vernier, Genève  
Tél.: +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)

Publié en Suisse

## Sommaire

Page

<b>Avant-propos</b> .....	<b>v</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>vii</b>
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>4</b>
<b>5</b> <b>Exigences générales concernant les mesurages</b> .....	<b>4</b>
5.1    Uniformité des températures.....	4
5.2    Durées d'incubation.....	5
5.3    Volumes et masses.....	5
<b>6</b> <b>Diluants et milieux de culture</b> .....	<b>5</b>
6.1    Généralités.....	5
6.2    Exigences de qualité des ingrédients.....	5
6.3    Diluants.....	5
<b>7</b> <b>Stérilisation et décontamination</b> .....	<b>6</b>
7.1    Stérilisation d'appareillage et de verrerie.....	6
7.2    Stérilisation des consommables.....	6
7.3    Décontamination de la verrerie et du matériel après utilisation.....	6
7.4    Gestion des déchets.....	7
<b>8</b> <b>Échantillons et manipulation des échantillons</b> .....	<b>7</b>
8.1    Échantillonnage.....	7
8.2    Préparation des échantillons.....	7
8.2.1    Eaux et autres matrices aqueuses.....	7
8.2.2    Écouvillons.....	8
<b>9</b> <b>Méthodes de dénombrement (quantitatives)</b> .....	<b>9</b>
9.1    Ensemencement des prises d'essai dans (ou sur) un milieu solide.....	9
9.1.1    Généralités.....	9
9.1.2    Technique par incorporation.....	9
9.1.3    Technique par étalement.....	10
9.1.4    Technique par filtration sur membrane.....	11
9.1.5    Incubation.....	13
9.1.6    Numération et confirmation sur milieux solides.....	14
9.1.7    Lignes directrices générales pour le calcul des résultats.....	15
9.1.8    Expression des résultats.....	16
9.2    Dénombrement utilisant un milieu liquide.....	26
9.2.1    Généralités.....	26
9.2.2    Mode opératoire.....	26
9.2.3    Choix d'un système d'ensemencement.....	27
9.2.4    Incubation.....	28
9.2.5    Interprétation des résultats.....	28
9.2.6    Incertitude des résultats d'essai.....	28
9.2.7    Détermination des indices NPP.....	29
<b>10</b> <b>Méthodes de détection (qualitatives)</b> .....	<b>32</b>
10.1    Généralités.....	32
10.2    Mode opératoire.....	32
10.3    Incertitude des résultats d'essai.....	33
<b>11</b> <b>Caractéristiques de performances des méthodes</b> .....	<b>33</b>
<b>12</b> <b>Contrôle qualité analytique</b> .....	<b>34</b>
12.1    Généralités.....	34

12.2	Contrôle qualité interne.....	34
12.2.1	Généralités.....	34
12.2.2	Contrôles de procédé.....	34
12.3	Évaluation de qualité externe.....	36
<b>Annexe A</b>	<b>(informative) Critères de choix de la technique.....</b>	<b>37</b>
<b>Annexe B</b>	<b>(informative) Intervalles de confiance pour la technique de numération de colonies et choix de la méthode de calcul dans des cas particuliers.....</b>	<b>42</b>
<b>Annexe C</b>	<b>(normative) Numération et calculs avec deux boîtes de Petri par dilution.....</b>	<b>46</b>
<b>Annexe D</b>	<b>(normative) Composition, préparation et essai de performances des diluants.....</b>	<b>53</b>
<b>Bibliographie</b>	.....	<b>57</b>

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

[ISO 8199:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018>

## 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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir [www.iso.org/directives](http://www.iso.org/directives)).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir [www.iso.org/brevets](http://www.iso.org/brevets)).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [www.iso.org/avant-propos](http://www.iso.org/avant-propos).

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 8199:2005), qui a fait l'objet d'une révision technique. Les principales modifications par rapport à l'édition précédente sont les suivantes.

- Des articles ont été ajoutés concernant les termes et définitions, les méthodes de détection (qualitatives), les caractéristiques de performance et le contrôle qualité analytique (AQC).
- Les articles faisant référence à la préparation et au Contrôle Qualité (QC) des milieux de culture et des diluants ont été révisés à des fins d'harmonisation avec l'ISO 11133 et ont été inclus dans une nouvelle [Annexe D](#).
- Le paragraphe portant sur les lignes directrices générales de calcul des résultats pour les techniques sur milieu solide a été mis à jour afin de tenir compte des changements apportés à l'ISO 7218:2007/Amd.1:2013<sup>[2]</sup>, sur laquelle se fondaient les articles et paragraphes correspondants de la deuxième édition. Toutefois, les modifications ont été faites de sorte à prendre en considération les techniques de microbiologie de l'eau (telles que la filtration sur membrane) et à permettre des dilutions autres que des dilutions décimales.
- L'[Annexe B](#) a été ajoutée pour donner des lignes directrices sur les intervalles de confiance lors du calcul de cas spéciaux, en relation avec la mise à jour du paragraphe sur les lignes directrices générales de calcul des résultats pour les techniques sur milieu solide.
- L'[Annexe C](#) a été ajoutée pour décrire les calculs en cas d'utilisation de boîtes en duplicat par dilution, en relation avec la mise à jour du paragraphe sur les lignes directrices générales de calcul des résultats pour les techniques sur milieu solide.

- Le paragraphe concernant le dénombrement utilisant un milieu liquide a été complété et inclut des lignes directrices supplémentaires relatives à l'utilisation des calculateurs NPP. L'ancienne [Annexe B](#) contenant les tables NPP a été supprimée.
- Le titre du présent document a été modifié pour prendre en compte ces changements.

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse [www.iso.org/fr/members.html](http://www.iso.org/fr/members.html).

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

ISO 8199:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018>

## Introduction

Les techniques de détection et de dénombrement des micro-organismes, basées sur leur capacité à se multiplier sur ou dans des milieux de culture spécifiques, sont un moyen important et largement utilisé pour évaluer la qualité microbiologique de l'eau. Le but du présent document est de réunir en un seul document les informations communes aux diverses techniques afin d'éviter la répétition des détails techniques dans chaque norme et de faciliter le choix de la technique la plus adaptée à une situation donnée. D'autres lignes directrices ont été incluses, concernant des aspects généraux importants en lien avec ces techniques, tels que le contrôle qualité analytique, les caractéristiques de performance des méthodes et l'incertitude des résultats d'essai.

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

[ISO 8199:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018>

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

ISO 8199:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018>

# Qualité de l'eau — Exigences et lignes directrices générales pour les examens microbiologiques sur milieu de culture

**AVERTISSEMENT** — Il convient que l'utilisateur du présent document connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document 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 d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité.

**IMPORTANT** — Il est absolument indispensable que les essais menés conformément au présent document le soient par du personnel dûment formé.

## 1 Domaine d'application

Le présent document établit les exigences et fournit les lignes directrices sur les manipulations communes à chaque technique de culture pour l'examen microbiologique de l'eau, en particulier la préparation des échantillons, les milieux de culture ainsi que l'appareillage général et la verrerie, sauf autre exigence dans la norme spécifique. Il décrit également les diverses techniques disponibles pour la détection et le dénombrement sur milieu de culture et les critères permettant de déterminer la technique appropriée.

Le présent document concerne principalement les examens portant sur les bactéries, les levures et les moisissures, mais certains aspects peuvent aussi s'appliquer aux bactériophages, aux virus et aux parasites. Sont exclues les techniques ne reposant pas sur la culture de micro-organismes, telles que les méthodes de réaction en chaîne par polymérase (PCR).

ISO 8199:2018

## 2 Références normatives

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018>

Les documents suivants cités dans le texte constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 éventuels amendements).

ISO 7704, *Qualité de l'eau — Évaluation des membranes filtrantes utilisées pour des analyses microbiologiques*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

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

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

**3.1**  
**exactitude**

étroitesse de l'accord entre un résultat d'essai et une valeur de référence acceptée

[SOURCE: ISO 6107-8:1993, 1, modifiée — La note a été supprimée.]

**3.2**  
**biais**

différence entre l'espérance mathématique des résultats d'essai et une valeur de référence acceptée

[SOURCE: ISO 5725-1:1994, 3.8, modifiée — La note 1 à l'article a été supprimée.]

**3.3**  
**numération confirmée**

*numération* (3.4) corrigée des *numérations présomptives* (3.9) non confirmées par des essais supplémentaires des objets présomptifs

**3.4**  
**numération**

<microbiologie> nombre observé d'objets, tels que les colonies ou les cellules, déterminé par numération directe ou par estimation du nombre le plus probable (NPP) en fonction du calcul statistique utilisant le nombre d'unités positives ou d'unités positives présomptives dans une série de dilutions d'un échantillon pour essai (3.16)

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 22, modifiée — «ou d'unités positives présomptives» a été ajouté.]

**3.5**  
**niveau de détection**

concentration minimale en organismes fournissant la preuve de la croissance avec une probabilité de  $p = 0,95$  lorsqu'ils sont inoculés dans un milieu de culture spécifié et incubés dans des conditions spécifiées

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)  
ISO 8199:2018  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36c99a6694b0/iso-8199-2018>

Note 1 à l'article: Le niveau théorique conforme à cette définition est une moyenne de trois cellules viables dans un volume d'inoculum.

[SOURCE: ISO 13843:2017, 3.10]

**3.6**  
**reproductibilité interlaboratoires**  
**fidélité intermédiaire**

étroitesse d'accord entre des résultats d'essai obtenus par la même méthode, sur des matériels d'essai identiques ou similaires, dans le même laboratoire, avec différents opérateurs utilisant des équipements différents

**3.7**  
**limite de détermination**

concentration d'analyte la plus faible par prise analytique lorsque l'incertitude-type relative prévue est égale à une valeur spécifiée

[SOURCE: ISO 13843:2017, 3.17]

**3.8**  
**fidélité**

étroitesse d'accord entre des résultats d'essai indépendants obtenus sous des conditions stipulées

[SOURCE: ISO 5725-1:1994, 3.12, modifiée — Les notes 1 à 3 à l'article ont été supprimées.]

**3.9****numération présomptive**

*numération* (3.4) de colonies ou estimation du nombre le plus probable (NPP) en fonction du nombre de colonies ou d'unités réactionnelles dont l'apparence extérieure est interprétée comme caractéristique d'un organisme cible

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 62, modifiée — «tubes de fermentation» a été remplacé par «unités réactionnelles».]

**3.10****écart-type relatif**

$u_{rel}$

estimation de l'écart-type d'une population d'un échantillon de  $n$  résultats divisé par la moyenne de cet échantillon

[SOURCE: ISO 13843:2017, 3.30]

**3.11****répétabilité****répétabilité de mesure**

*fidélité* (3.8) de mesure selon un ensemble de *conditions de répétabilité* (3.12)

[SOURCE: ISO 13843:2017, 3.32]

**3.12****conditions de répétabilité**

condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure de mesure, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps

ISO 8199:2018

[SOURCE: ISO 13843:2017, 3.33] [iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-36e3b50d8863/iso-8199-2018)

**3.13****reproductibilité****reproductibilité de mesure**

*fidélité* (3.8) de mesure selon un ensemble de *conditions de reproductibilité* (3.14)

Note 1 à l'article: Des termes statistiques pertinents sont donnés dans l'ISO 5725-1 et l'ISO 5725-2.

[SOURCE: ISO 13843:2017, 3.34]

**3.14****conditions de reproductibilité**

condition de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires

[SOURCE: ISO 13843:2017, 3.35]

**3.15****prise d'essai**

quantité spécifiée de l'échantillon prélevée pour analyse

EXEMPLE 0,1 ml, 1 ml, 100 ml d'échantillon.

### 3.16

#### échantillon pour essai

*prise d'essai* (3.15) non diluée, diluée ou préparée autrement d'un échantillon soumis à essai, après exécution de toutes les étapes de préparation, telles que la centrifugation, la filtration, l'homogénéisation, l'ajustement du pH et la détermination de la force ionique

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 92, modifiée — «portion» a été remplacé par «prise d'essai» et la note 1 à l'article a été supprimée.]

### 3.17

#### justesse

étroitesse de l'accord entre une valeur moyenne obtenue à partir de nombreux résultats d'essai et une valeur de référence acceptée

Note 1 à l'article: La mesure de la justesse s'exprime généralement en termes de *biais* (3.2).

[SOURCE: ISO 6107-8:1993, 63]

### 3.18

#### incertitude de numération

*écart-type relatif* (3.10) des résultats de la numération répétée des colonies ou des particules présentes sur la (les) même(s) plaque(s) ou le(s) même(s) champ(s) dans des conditions stipulées (même personne, personnes différentes dans un seul laboratoire ou dans différents laboratoires)

[SOURCE: ISO 6107-6:2004, 103, modifiée — Le domaine a été supprimé.]

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

## 4 Principe

Le principe général de ces techniques consiste à ensemencer une prise d'essai d'un échantillon d'eau, ou un échantillon pour essai résultant d'une filtration sur membrane ou centrifugation, sur ou dans un milieu de culture (solide ou liquide). Il est supposé qu'au cours de l'incubation, chaque micro-organisme cible présent se multiplie pour donner soit une colonie visible directement sur ou dans le milieu solide, soit des changements d'aspect du milieu liquide. Le choix de telle ou telle méthode de culture dépend non seulement de la nature et des nombres des micro-organismes recherchés, mais aussi de la nature de l'eau et des raisons à l'origine de l'examen.

## 5 Exigences générales concernant les mesurages

### 5.1 Uniformité des températures

Les gammes suivantes de températures acceptées, et leurs amplitudes d'incubation ou de conservation sont appliquées, dans la mesure où elles conviennent à l'organisme cible prévu et sauf autre exigence dans la norme spécifique.

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

Températures d'incubation:  $(22 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $(36 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $(44 \pm 0,5) \text{ }^\circ\text{C}$

Température de maintien des milieux en surfusion:  $44 \text{ }^\circ\text{C}$  à  $47 \text{ }^\circ\text{C}$

Les limites supérieures de la température d'incubation doivent être rigoureusement respectées pour garantir une croissance optimale. 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 il convient que la température de fonctionnement soit rapidement rétablie.

## 5.2 Durées d'incubation

Les gammes suivantes de durées d'incubation acceptées sont appliquées, dans la mesure où elles conviennent à l'organisme cible prévu et sauf autre exigence dans la norme spécifique.

Durées d'incubation:  $(21 \pm 3)$  h;  $(44 \pm 4)$  h;  $(68 \pm 4)$  h

## 5.3 Volumes et masses

L'équipement de mesure doit être adapté à l'exactitude et à la fidélité requises. La gamme acceptée de toute valeur mesurée est de  $\pm 2\%$ , lorsque la valeur indiquée est critique pour les performances de la méthode et les résultats d'essai, et de  $\pm 5\%$  lorsqu'il a été montré que la valeur indiquée n'est pas critique. Des exemples de valeurs critiques ayant un effet direct sur les résultats d'essai sont les volumes d'inoculum et de diluant. Pour les tolérances concernant la masse des ingrédients utilisés pour préparer les milieux de culture, se reporter à l'ISO 11133.

NOTE Les tolérances critiques ont été fixées à  $2\%$  afin de réduire au minimum l'incertitude des résultats d'essai.

## 6 Diluants et milieux de culture

### 6.1 Généralités

Les exigences générales relatives à la préparation, la production, la stérilisation, la conservation et les performances des milieux de culture sont spécifiées dans l'ISO 11133.

Pour la préparation des milieux de culture microbiologique, sauf indication contraire, ajouter les ingrédients au volume d'eau, plutôt que de compléter les ingrédients à un certain volume.

Vérifier la qualité des milieux de culture, des diluants, des membranes filtrantes et des réactifs avant utilisation, conformément aux modes opératoires décrits dans les normes ISO 11133 et ISO 7704 ou suivant les indications de la norme spécifique.

Des informations sur la conservation des milieux de culture sont spécifiées dans l'ISO 11133.

### 6.2 Exigences de qualité des ingrédients

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 des résultats équivalents. Il est également permis d'utiliser des milieux complets ou des diluants déshydratés. Suivre scrupuleusement les instructions du fabricant.

Se reporter à l'ISO 11133 et à l'ISO 3696[2] pour plus d'informations sur la qualité des ingrédients et la qualité de l'eau qu'il convient d'utiliser pour la préparation des milieux.

### 6.3 Diluants

Les diluants suivants sont d'usage courant en microbiologie de l'eau. Toutefois, il est permis d'utiliser d'autres diluants adaptés et cette liste n'est pas exhaustive:

- solution saline;
- eau peptonée;
- solution peptonée saline [diluant à récupération maximale (MRD)];
- solution de Ringer quart de concentration;

— solution tampon de phosphate.

Respecter les formulations et les instructions de préparation, de stockage et d'essai de performance données dans l'[Annexe D](#) pour ces diluants.

## 7 Stérilisation et décontamination

### 7.1 Stérilisation d'appareillage et de verrerie

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

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

Certains articles instables à la chaleur peuvent nécessiter une stérilisation par d'autres moyens (par exemple, lumière ultraviolette ou irradiation), mais ces méthodes ne sont pas employées en routine.

### 7.2 Stérilisation des consommables

Équipement et matériels jetables stériles peuvent être utilisés à la place des articles réutilisables (verrerie, boîtes de Petri, pipettes, flacons, tubes, anses, ensemenciers, etc.) si les spécifications sont similaires.

Si les membranes filtrantes ne sont pas fournies stériles, elles sont généralement stérilisées à la chaleur humide conformément au procédé b) décrit en 7.1, ou selon les instructions du fabricant.

### 7.3 Décontamination de la verrerie et du matériel après utilisation

Il convient de placer le matériel destiné à être décontaminé et éliminé dans des récipients appropriés, par exemple des poches en plastique pouvant passer à l'autoclave. L'autoclavage est la méthode préférée pour tous les procédés de décontamination (au moins 30 min à 121 °C). Il convient de charger l'autoclave de manière à favoriser la pénétration de chaleur dans la charge (par exemple, ne pas remplir le dispositif de manière excessive). Veiller à desserrer les bouchons/couvercles et à ouvrir les poches afin d'éviter une pressurisation dangereuse du récipient, qui pourrait conduire à sa casse, par exemple à l'explosion des flacons en verre.

Certains autoclaves modernes peuvent ne pas nécessiter de desserrage des bouchons, mais suivre scrupuleusement les instructions du fabricant afin d'éviter une pressurisation dangereuse des récipients.

Il est admis d'utiliser d'autres méthodes que l'autoclavage.

Autoclaver l'ensemble de l'équipement ayant été en contact avec des cultures microbiologiques (milieux de culture solides ou liquides), y compris les récipients réutilisables, avant lavage.

Pendant l'examen, la décontamination par immersion dans le désinfectant fraîchement préparé, à la dilution appropriée, peut être utilisée pour les équipements de petite taille et résistant à la corrosion (par exemple, les pipettes).

Les pipettes Pasteur peuvent être difficiles à nettoyer et sont généralement jetées après une seule utilisation.

La plupart des désinfectants ont des effets toxiques. Il convient de porter des gants et des lunettes de protection lors de la manipulation des désinfectants, et de suivre les instructions du fabricant.

## 7.4 Gestion des déchets

L'élimination correcte des matières contaminées n'a pas d'incidence directe sur la qualité de l'analyse des échantillons, mais elle fait partie de la bonne gestion du laboratoire. Il est recommandé d'établir un système d'identification et de séparation des déchets et de leurs récipients pour:

- les déchets non contaminés (par exemple, les échantillons d'eau non mis en culture) pouvant être éliminés via les circuits généraux de traitement des déchets;
- les scalpels, les aiguilles, les couteaux et le verre cassé;
- les matières contaminées pour l'autoclavage et le recyclage;
- les matières contaminées pour l'autoclavage et l'élimination, ou l'élimination uniquement s'il est prévu d'incinérer la matière.

Les matières contaminées par des micro-organismes de catégorie de risque 3 et leurs récipients doivent être autoclavés avant d'être incinérés.

## 8 Échantillons et manipulation des échantillons

### 8.1 Échantillonnage

Effectuer l'échantillonnage selon l'ISO 19458. Recueillir les échantillons d'eau désinfectés dans des flacons d'échantillons contenant un agent neutralisant adapté et en quantité suffisante.

### 8.2 Préparation des échantillons

#### 8.2.1 Eaux et autres matrices aqueuses

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/ed9f84a0-63d0-41c6-85b5-50355a692605/iso-8199-2018>

Il convient de séparer les eaux propres et sales et de les traiter en utilisant un équipement distinct dans des zones distinctes, afin de réduire le risque de contamination croisée dans la mesure du possible. Les lots d'eaux propres peuvent également être traités avant les eaux sales.

Avant l'examen, homogénéiser l'échantillon en agitant pour obtenir une répartition uniforme des micro-organismes et des autres particules. Cette homogénéisation peut être obtenue par inversion de l'échantillon ou par un mouvement de va-et-vient. 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, une dilution décimale est généralement utilisée. Dans le cas de la filtration sur membrane (surface plus réduite), il est recommandé d'appliquer des facteurs de dilution moindres. Pour de nombreuses techniques du nombre le plus probable (NPP), les dilutions font partie intégrante du mode opératoire. Se reporter à [9.2.3](#) pour des lignes directrices sur les dilutions dans les techniques NPP. Pour des lignes directrices générales sur la préparation des dilutions en série, se reporter à l'ISO 6887-1[7].

Pour les dilutions décimales, mesurer de manière aseptique neuf volumes du diluant et un volume de l'échantillon d'eau dans des flacons ou des tubes de dilution stériles. Il est également possible d'utiliser des volumes de diluant préalablement stérilisé dans des flacons à bouchon à vis et de vérifier les volumes après l'autoclavage. Une ou plusieurs dilutions décimales sont réalisées par transfert d'un volume d'échantillon d'eau à neuf volumes de diluant. À l'aide d'une autre pipette ou par un moyen mécanique, homogénéiser soigneusement et prélever un volume de cette dilution pour l'ajouter à un nouveau tube contenant neuf volumes de diluant. Répéter ces étapes autant de fois que nécessaire. Préparer un volume suffisant de chaque dilution pour tous les essais à effectuer avec chaque échantillon d'eau.

Pour les dilutions d'un autre facteur, ajuster le volume de diluant en fonction du volume d'échantillon. Par exemple, des dilutions d'ordre 4 peuvent être effectuées en suivant la méthode décrite plus haut pour les dilutions décimales, mais en mélangeant dans ce cas un volume d'échantillon d'eau avec trois