

## **E-IV-3V1 – DÉNOMBREMENT DES MICRO-ORGANISMES REVIVIFIABLES À 22 °C ET/OU 36 °C. INCORPORATION EN GELOSE.**

### **1. Objet**

Cette procédure a pour objet de décrire une méthode visant à dénombrer non spécifiquement les micro-organismes revivifiables présents dans un échantillon d'eau.

### **2. Domaine d'application**

Cette procédure s'applique à tous les types d'eau (y compris les eaux de piscine).

### **3. Définitions et abréviations**

**Microorganismes revivifiables** : totalité des bactéries, levures et moisissures capables de former des colonies dans un milieu de culture spécifié dans les conditions d'essai décrites.  
(Source : ISO 6222:1999)

### **4. Principe**

Ensemencement en profondeur d'une gélose nutritive non sélective dans des boîtes de Petri, par incorporation d'un ml d'échantillon initial ou de dilutions de celui-ci  
Après incubation à 36 °C pendant 44 h et/ou à 22 °C pendant 68 h, dénombrement de toutes les colonies.

### **5. Conditionnement et conservation de l'échantillon**

Les échantillons d'eau doivent être prélevés dans des bouteilles ou des flacons stériles à usage unique (avec inhibiteur de désinfectant si nécessaire)  
Les flacons contenant les échantillons destinés aux analyses microbiologiques ne sont pas remplis entièrement.

Les échantillons sont conservés jusqu'au moment de l'analyse entre 2° et 5 °C.

L'échantillon doit être analysé de préférence dans les 8 heures qui suivent le prélèvement, sinon impérativement dans les 24 h.



## **6. Appareillages et matériels utilisés**

### 6.1 Appareillage

- Hotte à flux laminaire
- Incubateur à  $22 \pm 2^\circ\text{C}$
- Incubateur à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$
- Colony counter
- Sonde PT100 vérifiée annuellement.
- Bain-marie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$

### 6.2 Petit matériel

- Bouteille en verre : préparation du milieu de culture.
- Petit matériel stérile à usage unique : pipettes individuelles stériles en plastique de 2 ml, boîtes de pétri de 90 mm de diamètre, pots de 50 ml ou tubes de 12 ml en plastique pour les éventuelles dilutions.

## **7. Réactifs utilisés**

- Gélose à l'extrait de levure
- Solution Ringer  $\frac{1}{4}$  (diluant).

## **8. Mode opératoire**

### 8.1 Prise d'essai

La prise d'essai, ou d'une dilution de l'échantillon est généralement de 1 ml mais peut augmenter jusqu'à 5 ml en adaptant la quantité et la concentration du milieu utilisé.

La dilution doit être si possible choisie de telle sorte que le nombre présumé de colonies formées sur les boîtes de 90 mm de diamètre soit compris entre 15 et 300.

### 8.2 Ensemencement

L'incorporation des échantillons et/ou de leurs dilutions à la gélose s'effectue dans des conditions d'asepsie sous hotte à flux laminaire ou près d'une flamme de bec Bunsen.

- Maintenir la gélose en fusion dans un bain marie jusqu'à stabilisation de sa température à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , pendant un maximum de 4 h avant utilisation.
- Après mélange vigoureux de l'échantillon, répartir les prises d'essai dans les boîtes de Pétri à l'aide une pipette à usage unique stérile.
- Verser la gélose liquide de manière à obtenir une couche d'un minimum de 3 à 4 mm d'épaisseur. (Cette opération doit se faire dans les dix minutes qui suivent l'inoculation de la boîte).

- Homogénéiser ce mélange par des mouvements circulaires (3 à gauche et 3 à droite) et linéaires (3 avant - arrière et 3 gauche - droite) en évitant la formation de bulles et sans mouiller les bords supérieurs de la boîte.
- Laisser à refroidir les boîtes sur une surface plane.

### 8.3 Incubation

- Après solidification de la gélose, retourner les boîtes et les placer dans l'incubateur
- Laisser incuber dans l'enceinte réglée à  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant  $68 \pm 4$  heures ou à  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant  $44 \pm 4$  heures.

### 8.4 Lecture.

- Examiner les boîtes dès la fin de l'incubation sinon les conserver à environ  $4^\circ\text{C}$  pendant 24 heures au maximum.
- Lorsque plusieurs dilutions sont effectuées, dénombrer les colonies sur la gélose présentant entre 15 et 300 colonies.
- Comptabiliser toutes les colonies présentes à l'aide d'un colony counter.
- Ecarter les boîtes qui ne présentent pas de colonies bien séparées sur au moins la moitié de la surface.

## 9. Paramètres qualité

Le contrôle de qualité des essais sera réalisé par :

- Le contrôle des conditions d'essais : délais entre le prélèvement et l'analyse, condition de conservation des échantillons, qualité des milieux de culture, surveillance des températures d'incubation,...
- La vérification de l'asepsie de l'environnement : témoin (géloseensemencée avec 1ml de diluant et incubée parallèlement aux échantillons)
- Le contrôle externe par la participation à des exercices interlaboratoires

## 10. Calcul et expression de résultats

Le calcul des résultats s'effectue par la moyenne des dénombrements réalisés sur les répliques de la dilution retenue.

Le résultat s'exprime en nombre de germes dans le volume de référence (généralement 1 ml).

Lorsque aucune colonie n'apparaît dans la gélose inoculée avec le volume d'essai de l'échantillon non dilué, le résultat est exprimé sous la forme de « non détecté dans 1 ml ».

En présence de plus de 300 colonies sur les boîtes inoculées avec la plus haute dilution inoculée, les résultats sont exprimés qu'approximativement.



## **11. Sécurité**

Sans objet dans cette procédure.

## **12. Rapport d'essai**

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne et éventuellement à la méthode normalisée
- l'identification complète de l'échantillon
- la date de prélèvement ; ceci qu'il ait été réalisé par le laboratoire ou par le client
- la date d'analyse
- les résultats du dénombrement conformément au point 10
- les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

## **13. Références**

**EN ISO 6222 : 1999** : Qualité de l'eau - Dénombrement des microorganismes revivifiants - comptage des colonies par ensemencement dans un milieu de culture nutritif gélosé

**ISO 8199 : 2005** – Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture