SESSION 2016
Métropole

BREVET DE TECHNICIEN SUPERIEUR AGRICOLE
EPREUVE E7-1
ANALYSES ET CONTROLES

Option : ANABIOTEC

Durée : 180 minutes

Matériel(s) et document(s) autorisé(s) : **Calculatrice**

Le sujet comporte 16 pages

PARTIE 1 : RECHERCHE DES PCB …… **11 points**

PARTIE 2 : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE …… **9 points**

SUJET

LES LACS SENTINELLES

Née de la rencontre des gestionnaires d'espaces protégés et des scientifiques, l'initiative « Lacs sentinelles » a pour ambition de coordonner les recherches sur les lacs d'altitude. L'objectif de ces rencontres est de réaliser un point sur les études en cours et les problématiques émergentes liées aux systèmes lacustres d'altitude.

Leur localisation en tête de bassin versant, à distance des sources de pollutions humaines, leur confère un rôle de vigilance vis-à-vis de l'évolution des changements environnementaux tels que l'érosion de la biodiversité, le changement climatique et la dispersion de contaminants. Les lacs enregistrent des informations qui permettent même de reconstituer les conditions environnementales du passé à partir de carottes de sédiments, véritables archives naturelles. L'analyse de l'eau des lacs et de leurs sédiments permet aussi de suivre et de reconstituer les retombées de polluants atmosphériques (PCB, métaux lourds …) à l'échelle de l'arc alpin. Une analyse des eaux avec recherche de pollution microbiologique et chimique est envisagée pour une période de 4 mois.
Vous êtes technicien dans un laboratoire L.D.A. spécialisé dans l'analyse d'eaux. Un laboratoire de recherche vous a confié des prélèvements d'eau du lac « Blanc », un des lacs sentinelles.
Les prélèvements ont lieu de juin à septembre lorsque le lac est accessible. Au 1er Juin, un prélèvement sur 10 sites répartis autour du lac est réalisé.
Dans un premier temps, vous allez avoir à choisir entre deux méthodes d'extraction des PCB et à les doser par CPG. Dans un deuxième temps, vous allez estimer la qualité microbiologique des eaux de surface

PARTIE 1 : RECHERCHE DE PCB (Polychlorobiphényles)

Le lac « Blanc » est un cas d'étude pour la compréhension du devenir des PCB atmosphériques dans les lacs d'altitude. (**document 1**).

Les teneurs extrêmement faibles des eaux en PCB imposent une étape d'extraction et de concentration avant la détermination analytique. Ce traitement consiste à extraire les molécules à analyser de leur matrice aqueuse, pour les concentrer dans un solvant organique. La méthode d'extraction la plus employée est l'extraction liquide-liquide (imposée par la norme NF EN ISO 64 68 : **document 2**).

11) Identifier les 4 grandes étapes de ce dosage en précisant leurs rôles (**document 2**).

12) Expliquer les précautions que vous allez prendre pour réaliser l'extraction en respectant les règles de sécurité.**(document 3).**

13) Justifier la répétition pour l'extraction par agitation (**document 2**).

Après extraction, le résidu obtenu est analysé en CPG selon la norme NF EN ISO 6468.

14) Argumenter le choix de la CPG pour le dosage des PCB.

15) Les prélèvements d'eau sont analysés en C.P.G.
On a obtenu pour un des prélèvements :
Masse du flacon de prélèvement d'eau : 1 152 g
Masse du flacon vide : 226 g
Masse volumique de l'eau : $1 g.cm^{-3}$
Rendement de l'extraction : 80 %
Volume de l'extrait obtenu : 1 mL
Volume injecté en CPG : 0,5 µL

Le bulletin d'analyse donne les résultats suivants :

Temps de rétention (min)	Surface du pic (Unité d'Aire)
0,50	87 970 521
10,45	12 123
11,80	9 450
13,00	17 180
15,00	554

Le **document 3** est le bulletin d'analyse d'un mélange de PCB standard. Le composé témoin recherché dans l'eau du lac correspond au pic n°3, temps de rétention de 10,45 min dont l'aire est 15 154 Unité d'Aire. Conclure sur la concentration massique de ce composé dans le prélèvement d'eau analysée.

Le résultat de ce prélèvement sera archivé afin de faire un suivi dans le temps.

Une nouvelle méthode de pré-traitement est proposée : la SPE : Solid Phase Extraction. **(document 4)**

Votre laboratoire vous demande de faire des essais comparatifs entre les 2 méthodes d'analyse : la méthode d'extraction liquide-liquide de la norme NF EN ISO 6468, et la nouvelle méthode SPE, afin de déterminer si les deux méthodes donnent les mêmes résultats.

Ces essais comparatifs seront appliqués sur la détermination de la concentration en PCB, et sur des échantillons d'eau, prélevés à différents points à la surface du lac, un jour donné.

Vous avez effectué 10 prélèvements d'eau, et vous avez ensuite déterminé la concentration en PCB, exprimé en ng/L, par les 2 méthodes. Vous avez obtenu les résultats suivants :

	Concentration en PCB ng/L	
Prélèvement n°	Méthode NF EN ISO 6468	Méthode SPE
1	5	6
2	4	5
3	3	3
4	10	9
5	8	7
6	5	7
7	8	5
8	2	3
9	9	10
10	7	5

16) Présenter une démarche statistique argumentée, permettant de comparer les résultats des deux méthodes d'analyses. Le seuil de risque est fixé à 5 % **(Documents 5 et 6).** Mettre en œuvre le test choisi et conclure.

17) A partir des résultats statistiques obtenus à la question précédente et des informations du **document 4**, comparer ces deux méthodes au niveau de la faisabilité. Au final, justifier le choix de la méthode que vous allez utiliser.

PARTIE 2 : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

Le lac « Blanc » situé à très haute altitude est alimenté par des sources. Ces eaux de source alimentent aussi les refuges et les troupeaux qui pâturent l'été.

Les scientifiques s'intéressent à la présence des micro-organismes vivants du lac pour pouvoir identifier des pollutions possibles.

Les 10 prélèvements sont regroupés en un échantillon, qui va être analysé pour déterminer la qualité de l'eau du lac.

21) Préciser les conditions dans lesquelles les prélèvements ont dû être réalisés.

22) Justifier le choix de regrouper les 10 points de prélèvement en un unique échantillon pour l'analyse.

23) Justifier le choix d'une technique de filtration pour réaliser les analyses microbiologiques.

24) A partir du **document 7**, justifier la recherche des 3 groupes bactériens cités.

25) A l'aide des extraits des deux normes présentées dans **les documents 8 et 9,** établir un logigramme pour la recherche des coliformes, *E coli* et entérocoques, sachant que l'analyse se fait à partir de 100 mL d'eau.

26) Expliquer le rôle des différents composés du milieu de Slanetz et Bartley.

27) Interpréter les résultats obtenus pour le prélèvement du 1/06 (ci-dessous) et conclure.

Slanetz et Bartley	1 colonie rouge brique
BEA	Pas de croissance

TTC	Confirmation	
4 colonies lactose +	3 colonies indole -, oxydase -	1 colonie indole +, oxydase -

28) L'évolution des populations bactériennes sur la période de 4 mois est présente dans le tableau ci-dessous. Proposer des hypothèses pour expliquer ces résultats

	1/06	15/06	1/07	15/07	1/08	16/08	1/09	15/09
Coliformes (ufc/100 mL)		3	4	80	210	95	6	3
E. coli (ufc/100 mL)		1	2	37	153	51	2	0
Entérocoques (ufc/100 mL)		0	0	1	12	1	0	0

DOCUMENT 1

Les PCB

Les PCB sont des produits chimiques organiques chlorés utilisés pour leur grande stabilité thermique et leurs caractéristiques électriques. Ils sont notamment employés comme : isolants électriques pour les transformateurs et les condensateurs (pyralène), fluides caloporteurs pour le transfert de calories dans des installations industrielles diverses. Après leur apparition dans les années 50, ces produits se sont avérés rapidement nocifs pour l'environnement et pour l'homme. Ils sont insolubles dans l'eau mais solubles dans la plupart des solvants organiques et dans les huiles végétales, stables et peu ou faiblement biodégradables (classés dangereux pour l'environnement), cumulables dans la chaîne alimentaire (concentration dans les tissus vivants), dégradables à haute température en conduisant à la formation de furanes et de dioxines (toxiques et cancérogènes).

Source : www.Actu-environnement.com

DOCUMENT 2

Extrait de la norme NF EN ISO 6468
Dosage de certains insecticides organochlorés, des polychlorobiphényles et des chlorobenzènes

7 - Mode opératoire

7.1 - Prétraitement de l'échantillon

En général, un prétraitement de l'échantillon n'est pas nécessaire.
Si le récipient d'échantillonnage est complètement rempli, agiter et déverser 30 mL à 100 mL d'échantillon afin d'obtenir un volume libre suffisant pour l'ajout du solvant par la suite.
Mesurer le volume d'eau à extraire en pesant le flacon avant l'extraction et après l'avoir vidé.

7.2 - Extraction et séparation

…
Il est recommandé d'effectuer l'extraction dans un récipient d'échantillonnage. En général, un volume d'échantillon de 1 litre est utilisé.

7.2.1 - Extraction par agitation du flacon d'échantillonnage et séparation dans une ampoule à décanter

Ajouter 30 mL de solvant d'extraction à l'échantillon (voir 7.1), et agiter le mélange pendant au moins 10 min.
Transférer dans une ampoule à décanter de capacité appropriée et laisser les phases se séparer.
Reverser la phase inférieure aqueuse dans le récipient d'échantillonnage. Répéter l'extraction deux fois avec 20 mL à 30 mL de solvant d'extraction.
Sécher l'extrait en utilisant l'un des modes opératoires suivants.
Faire passer l'extrait sur une colonne de séchage garnie de sulfate de sodium anhydre, préalablement lavée avec le solvant et recueillir l'éluat dans le récipient d'évaporation.

NOTE 8

Il est recommandé, pour obtenir un meilleur rendement, de laver la colonne avec un volume supplémentaire de 10 mL à 20 mL de solvant. Recueillir ce solvant de lavage dans le récipient d'évaporation.
…

7.3 - Concentration de l'extrait

…

7.3.2 - Concentration à l'aide d'un évaporateur rotatif

Concentrer l'extrait dans un ballon, de préférence muni d'une extension en ampoule, sur un évaporateur rotatif jusqu'à obtention d'un volume minimal de 0,6 mL ....
Placer le récipient d'évaporation et l'extrait de solvant dans un bain d'eau non chauffée ou, pour les solvants d'extraction de point d'ébullition élevé, dans un bain d'eau n'excédant pas 50 °C. Lorsque la concentration est terminée, transférer quantitativement l'extrait dans une éprouvette graduée de 1 mL. Rincer soigneusement les parois du récipient d'évaporation avec un faible volume de solvant. Transférer ce volume dans l'éprouvette graduée et compléter au volume avec le solvant.

7.4 - Chromatographie en phase gazeuse

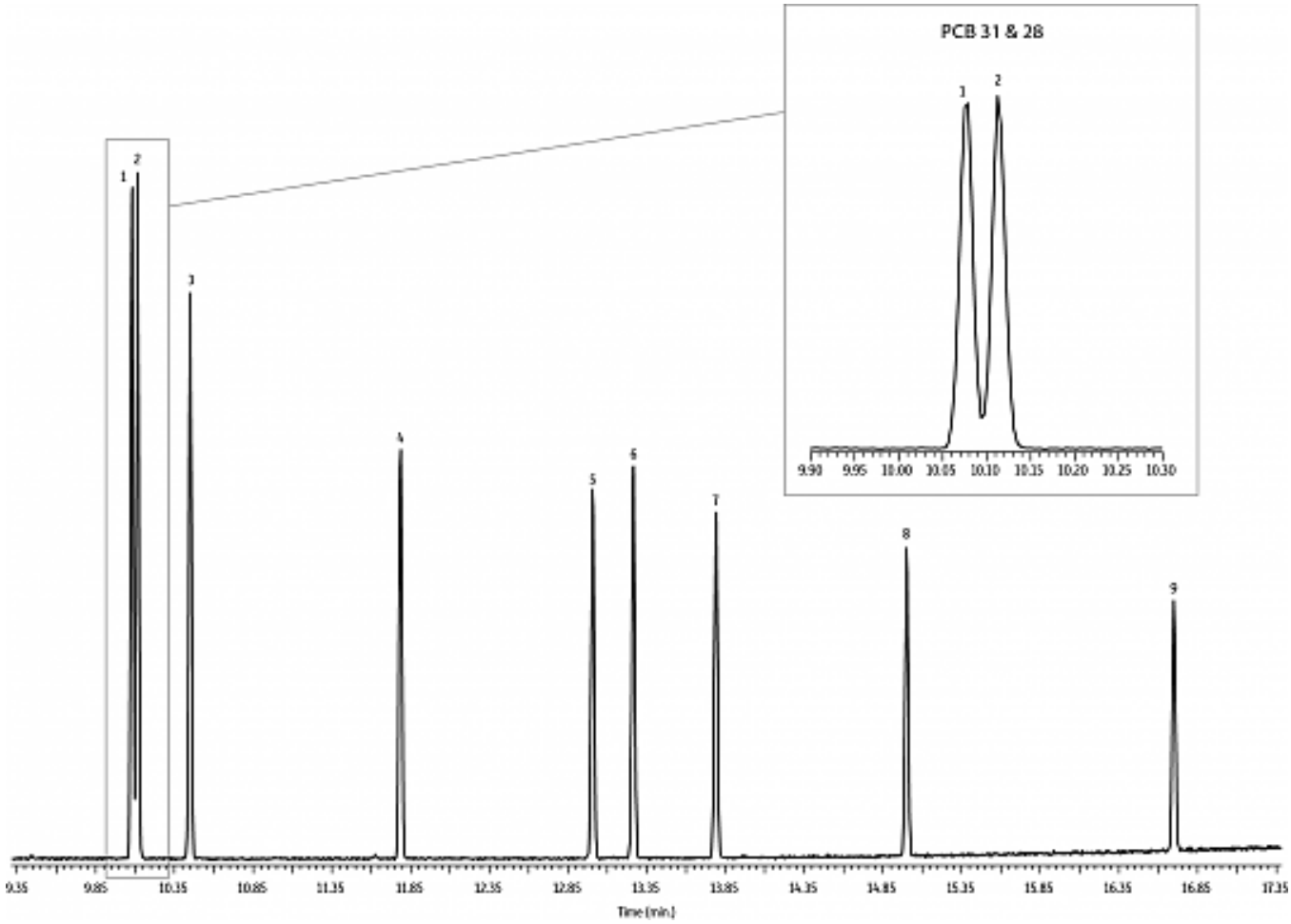
Pour des extraits d'échantillons d'eaux propres, effectuer l'analyse par chromatographie en phase gazeuse à ce stade sans purification supplémentaire.
…
Mettre le chromatographe en phase gazeuse, muni d'un détecteur à capture d'électrons et équipé d'une colonne appropriée en fonctionnement selon les indications du fabricant, et s'assurer que les conditions sont stables.
Injecter l'extrait (généralement entre 1 µL et 10 µL mais le même volume que celui utilisé pour l'étalonnage) dans le chromatographe puis effectuer un chromatogramme.
Comparer le chromatogramme obtenu à ceux des solutions étalons.

DOCUMENT 3

Chromatogramme d'un mélange standard

Conditions de l'analyse :

Colonne	Rxi®-XLB, 30 m, 0.25 mm ID, 0.25 µm (cat.# 13723)
Echantillon	Mélange standard de PCB
Solvant:	Dichloromethane
Concentration de chaque composé:	3,5 µg.L^{-1}
Inj. Vol.:	0,5 µL splitless
Inj. Temp.:	300°C
Température du four :	40 °C (palier de 2 min) puis montée à 240 °C à 30 °C/min (palier de 2 min) puis montée à 340 °C à 10 °C/min (palier 5 min)
Gaz vecteur	He, constant flow
Débit du gaz vecteur:	1 mL/min
Detecteur	MS
Instrument	PE Clarus 500 GC & Clarus 500 MS



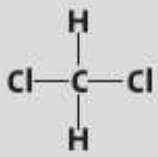
DOCUMENT 3 (suite)

Mise à jour 2014

FICHE TOXICOLOGIQUE **FT 34**

Dichlorométhane

Auteurs : N. Bonnard, M.-T. Brondeau, M. Falcy, D. Jargot, F. Marc, S. Miraval, F. Pillière, S. Robert, O. Schneider



CH_2Cl_2

Numéro CAS
75-09-2

Numéro CE
200-838-9

Numéro Index
602-004-00-3

Synonyme
Chlorure de méthylène

CARACTÉRISTIQUES

UTILISATIONS [1 à 3]

- Solvant d'extraction et de processus dans l'industrie pharmaceutique, solvant d'extraction dans l'industrie agroalimentaire et les cosmétiques.
- Constituant de décapants de peintures et vernis.
- Agent de nettoyage et de dégraissage des métaux.
- Composant de colles et adhésifs.
- Formulation d'aérosols.
- Agent d'expansion des mousses polyuréthanes, solvant de polymérisation (polycarbonates, etc.).
- Intermédiaire de synthèse.
- Autres utilisations : fabrication de fibres cellulosiques, formulation de peintures, industrie pétrolière, industrie du cuir, détachant textile, laboratoires d'analyses chimiques, etc.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES [1, 3 à 5]

Le dichlorométhane est un liquide incolore, très volatil, d'odeur éthérée généralement détectable vers 200-300 ppm (dès 25 ppm ou seulement vers 600 ppm selon certaines sources).

Il est peu soluble dans l'eau (13 à 20 g/l à 20 °C), mais miscible avec la plupart des solvants organiques. En outre, le dichlorométhane dissout de nombreux produits tels que graisses, huiles, résines, etc.

Depuis le 1er décembre 2010, l'étiquette doit être conforme au règlement (CE) n° 1272/2008 dit « règlement CLP ».

DICHLOROMÉTHANE

ATTENTION

H 351 – Susceptible de provoquer le cancer.

Nota : Les conseils de prudence P sont sélectionnés selon les critères de l'annexe 1 du règlement CE n° 1272/2008.

200-838-9

Selon l'annexe VI du règlement CLP.

Xn - Nocif

DICHLOROMÉTHANE

R 40 – Effet cancérogène suspecté – preuves insuffisantes.

S 23 – Ne pas respirer les gaz/fumées, vapeurs, aérosols [terme(s) approprié(s) à indiquer par le fabricant].

S 24/25 – Éviter le contact avec la peau et les yeux.

S 36/37 – Porter un vêtement de protection et des gants appropriés.

200-838-9 – Étiquetage CE.

Selon l'annexe I de la directive 67/548/CEE.

DOCUMENT 3 (suite et fin)

Ses principales caractéristiques physiques sont les suivantes.

Masse molaire	84,93 $g.mol^{-1}$
Point de solidification	– 97 °C
Point d'ébullition	39,8 °C
Densité (D_4^{20})	1,325
Densité de vapeur (air = 1)	2,93
Pression de vapeur	19,6 kPa à 0 °C 46,5 kPa à 20 °C 68,1 kPa à 30 °C
Viscosité	0,43 mPa.s à 20 °C
Température d'auto-inflammation	556 à 662 °C
Limites d'explosivité dans l'air (% en volume) : *limite inférieure* *limite supérieure*	 13 % 23- 25 %
Coefficient de partage octanol/eau ; log Pow	1,25

DOCUMENT 4

La méthode SPE : Solid Phase extraction

La méthode SPE Solid Phase extraction repose sur une extraction liquide-solide et non plus liquide-liquide. Dans ce cas, l'échantillon à analyser percole à travers une poudre compacte adsorbante (cartouche) qui fixe les polluants. Ces derniers sont ensuite désorbés et concentrés par élution d'un petit volume de solvant. Cette méthode, qui se développe depuis quelques années, est moins polluante car elle nécessite moins de solvant : rejets dans l'atmosphère divisés par sept. De plus, elle permet de limiter les pertes en PCB et en solvant (surtout lorsqu'ils sont très volatils) car elle demande moins de transvasements. Son rendement d'extraction est donc plus important pour certains composés (plus de 60 à 80 %).

Source : www.eau-seine-normandie.fr

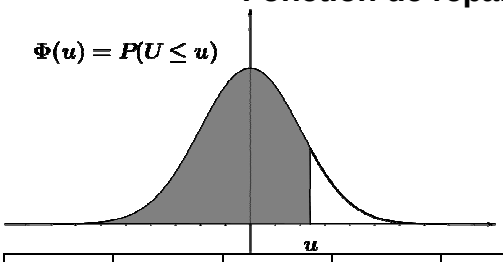
DOCUMENT 5

Tests de comparaison de 2 moyennes de 2 populations (Echantillons de petites tailles)

Echantillons appariés	Normalité	$T = \frac{\bar{D}}{\frac{s_D}{\sqrt{n-1}}}$ T suit la loi de Student à $n - 1$ ddl
	Non normalité	X: variable aléatoire qui associe le nombre de différence positive ou négative X suit la loi binomiale B(n ; $\frac{1}{2}$) p(X= k) = $C_n^k \left(\frac{1}{2}\right)^n = \binom{n}{k}\left(\frac{1}{2}\right)^n$
Echantillons indépendants	Variances des populations connues	$U = \frac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{n_1} + \frac{\sigma_2^2}{n_2}}}$ U suit la loi normale centrée réduite N (0 ; 1)
	Variances des populations inconnues mais supposées égales	$T = \frac{\overline{X_1} - \overline{X_2}}{s\sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$ avec $S^2 = \frac{n_1 S_1^2 + n_2 S_2^2}{n_1 + n_2 - 2}$ T suit la loi de Student à $n_1 + n_2 - 2$ ddl
	Variances des populations inconnues mais supposées différentes	Test de Mann-Whitney

DOCUMENT 6

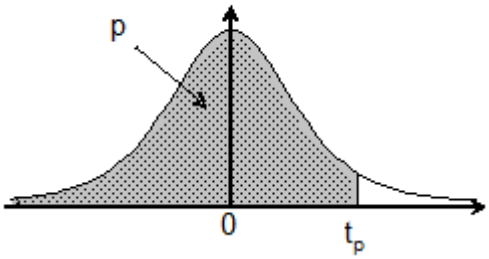
Fonction de répartition de la variable normale centrée réduite



u	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...
1,5	0,9332	0,9345	0,9357	0,9370	0,9382	0,9394	0,9406	0,9418	0,9429	0,9441
1,6	0,9452	0,9463	0,9474	0,9484	0,9495	0,9505	0,9515	0,9525	0,9535	0,9545
1,7	0,9554	0,9564	0,9573	0,9582	0,9591	0,9599	0,9608	0,9616	0,9625	0,9633
1,8	0,9641	0,9649	0,9656	0,9664	0,9671	0,9678	0,9686	0,9693	0,9699	0,9706
1,9	0,9713	0,9719	0,9726	0,9732	0,9738	0,9744	0,9750	0,9756	0,9761	0,9767
2,0	0,9772	0,9778	0,9783	0,9788	0,9793	0,9798	0,9803	0,9808	0,9812	0,9817
2,1	0,9821	0,9826	0,9830	0,9834	0,9838	0,9842	0,9846	0,9850	0,9854	0,9857
2,2	0,9861	0,9864	0,9868	0,9871	0,9875	0,9878	0,9881	0,9884	0,9887	0,9890
2,3	0,9893	0,9896	0,9898	0,9901	0,9904	0,9906	0,9909	0,9911	0,9913	0,9916

Fonction de répartition d'une variable de Student à k degrés de liberté

Valeurs t_p **telles que** $Prob(T \leq t_p) = p$



k \ p	0,90	0,95	0,975	0,99	0,995	0,999	0,9995
1	3,08	6,31	12,71	31,82	63,66	318,31	636,62
2	1,89	2,92	4,30	6,96	9,92	22,33	31,60
3	1,64	2,35	3,18	4,54	5,84	10,21	12,92
4	1,53	2,13	2,78	3,75	4,60	7,17	8,61
5	1,48	2,02	2,57	3,36	4,03	5,89	6,87
6	1,44	1,94	2,45	3,14	3,71	5,21	5,96
7	1,41	1,89	2,36	3,00	3,50	4,79	5,41
8	1,40	1,86	2,31	2,90	3,36	4,50	5,04
9	1,38	1,83	2,26	2,82	3,25	4,30	4,78
10	1,37	1,81	2,23	2,76	3,17	4,14	4,59
11	1,36	1,80	2,20	2,72	3,11	4,02	4,44
12	1,36	1,78	2,18	2,68	3,05	3,93	4,32

DOCUMENT 7

Extrait du SEQ-eau

Des principes simples : paramètres, altérations, biologie et usages, qualité de l'eau.

L'évaluation de la qualité de l'eau d'un échantillon est réalisée aux moyens de plus de 150 paramètres analysables possibles. Cette évaluation peut être réalisée sur différentes périodes en prenant en compte les prélèvements mensuels, annuels ou même inter-annuels (cf. fréquence et répartition des prélèvements).

Les différents paramètres analysés sont regroupés en 16 indicateurs qui permettent d'identifier un type de pollution précis (matière organique et oxydable, matières phosphorées, nitrates…) afin de pouvoir suivre son évolution dans le temps. Elles regroupent entre eux des paramètres de même nature ou ayant des effets comparables sur le milieu aquatique ou lors des différents usages de l'eau (cf. Tableau 1).

L'évaluation de ces indicateurs permet de classer l'eau en différentes catégories qui définissent l'utilisation potentielle de cette eau : eau de consommation humaine, eau pouvant après traitement être utilisée pour la consommation humaine, eau de baignade, eau de pèche, utilisable en abreuvoir ….

Tableau 1 (extrait)

Indicateur	Paramètres	Conséquences sur l'eau
Microorganismes	Coliformes thermotolérants + totaux, Escherichia coli, Entérocoques	Gêne la production d'eau potable et la baignade
Poly-chloro-biphénylés (PCB)	12 PCB	Toxique pour les organismes vivants

DOCUMENT 8

Extrait de la norme NF EN ISO 7899-2 – Recherche des entérocoques par méthode de filtration

4 - Principe

4.1 - Filtration, incubation et dénombrement

Le dénombrement des entérocoques intestinaux est fondé sur la filtration d'un volume spécifié d'un échantillon d'eau à travers une membrane filtrante ayant une grandeur de pore (0,45 µm) suffisante pour retenir les bactéries. Le filtre est placé sur un milieu sélectif solide contenant de l'azoture de sodium (pour supprimer la croissance des bactéries Gram-négatives) et du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium, un colorant incolore qui est réduit en formazan rouge par les entérocoques intestinaux.
Les colonies typiques sont bombées, avec une couleur rouge, marron ou rose, soit au centre soit sur l'ensemble de la colonie.

4.2 - Confirmation

Dans le cas où des colonies typiques sont observées, une étape de confirmation est nécessaire, par transfert de la membrane, avec toutes les colonies, sur une gélose à la bile, à l'esculine et à l'azoture, préchauffée à 44 °C. Les entérocoques intestinaux hydrolysent l'esculine sur ce milieu en 2 h. Le produit de la réaction, la 6,7-dihydroxycoumarine, se combine aux ions ferriques pour donner un composé brun à noir qui diffuse dans le milieu….

...

6 - Milieux de culture et réactifs

6.1 Composants de base

AVERTISSEMENT - Les milieux sélectifs décrits dans la présente partie de l'ISO 7899 contiennent de l'azoture de sodium. Étant donné que cette substance est très toxique et mutagène, des précautions doivent être prises pour en éviter le contact, spécialement par inhalation de fine poussière pendant la préparation de milieux complets disponibles dans le commerce sous forme déshydratée. Les milieux contenant de l'azoture ne doivent pas être mis au contact d'acides minéraux forts, parce que de l'acide azothydrique (HN_3) peut être produit. Les solutions contenant de l'azoture sont également susceptibles de former des composés explosifs au contact de tuyauteries métalliques, par exemple celles des éviers.
Les azotures peuvent être décomposés en sécurité par addition en excès d'une solution saturée de nitrites.
Pour l'uniformité des résultats, utiliser pour la préparation des milieux soit un milieu complet déshydraté, soit des composants de qualité homogène et des produits chimiques de qualité analytique reconnue. L'azoture de sodium se détériore avec le temps, aussi les milieux de culture ont-ils une durée de vie limitée.

> NOTE : Il est également possible d'utiliser des produits chimiques d'une qualité autre, à condition de démontrer qu'ils permettent d'obtenir des performances équivalentes dans le cadre du présent test.

6.2 Eau distillée, ou eau de pureté équivalente conformément à l'ISO 3696.

6.3 Milieux de culture

6.3.1 :

Milieu de Slanetz et Bartley

6.3.1.1 :

Milieu de base

- Tryptose 20,0 g
- Extrait de levure 5,0 g
- Glucose 2,0 g
- Hydrogénophosphate dipotassique (K_2HPO_4) 4,0 g
- Azoture de sodium (NaN_3) 0,4 g
- Agar-agar 8 g à 18 g
- Eau 1 000 mL

Dissoudre les ingrédients dans l'eau bouillante.
Quand la dissolution est achevée, chauffer encore 5 min.
Laisser refroidir jusqu'à une température de 50 °C à 60 °C.

…

8 - Mode opératoire

8.1 - Préparation des échantillons

Pour la préparation de l'échantillon, la filtration et l'ensemencement sur milieux sélectifs, suivre les instructions de l'ISO 8199 et de l'ISO 6887-1. Commencer l'examen de préférence immédiatement après la prise des échantillons. Si les échantillons sont conservés à température ambiante, l'examen doit être commencé dans les 6 h qui suivent l'échantillonnage. Dans des circonstances exceptionnelles, les échantillons peuvent être gardés à 5 °C ± 3°C jusqu'à 24 h avant l'examen.
S'il est nécessaire de diluer l'échantillon, préparer les dilutions conformément à l'ISO 8199.

8.2 - Filtration et incubation

Pour une description générale de la technique de filtration sur membrane, voir l'ISO 8199.
Filtrer un volume d'eau approprié au type d'eau examinée.
Placer la membrane filtrante sur le milieu de Slanetz et Bartley (6.3.1).
Faire incuber les boîtes à 36 °C ± 2 °C pendant 44 h ± 4h.

8.3 - Confirmation et dénombrement

Après incubation, considérer comme typiques toutes les colonies bombées montrant une couleur rouge, marron ou rose, soit au centre soit sur l'ensemble de la colonie.
S'il y a des colonies typiques, transférer la membrane et les colonies, au moyen de pinces stériles, sans retournement, sur une boîte de gélose bile-esculine-azoture qui a été préchauffée à 44 °C.
Faire incuber à 44 °C ± 0,5 °C pendant 2 h.
Lire la boîte sans délai.
Considérer toutes les colonies typiques montrant une couleur brune à noire dans le milieu environnant comme donnant une réaction positive, et les compter comme entérocoques intestinaux.

> NOTE : Une distribution inégale des colonies ou la présence de nombreux germes banaux peuvent interférer avec la différenciation des colonies positives, par suite de la diffusion de la couleur aux colonies adjacentes.

DOCUMENT 9

Extrait de la norme NF EN ISO 9308 – 1 Recherche des coliformes et *E. coli* par méthode de Filtration

8 - Mode opératoire

8.1 - Préparation de l'échantillon

Pour la préparation de l'échantillon, la filtration et l'ensemencement des milieux d'isolement, suivre les instructions données dans l'ISO 8199 et l'ISO 6887-1. Commencer l'examen des échantillons de préférence immédiatement après les avoir prélevés. Si les échantillons sont conservés à température ambiante (à l'abri de la lumière, ne dépassant pas 25 °C), leur examen doit commencer dans les 6 h suivant leur prélèvement. Dans certaines circonstances exceptionnelles, les échantillons peuvent être conservés à (5 ± 3) °C pendant une durée maximale de 24 h avant d'être examinés.

8.2 - Filtration

Filtrer 100 mL (ou plus, par exemple 250 mL pour l'eau embouteillée) de l'échantillon à analyser sur une membrane filtrante . Placer la membrane sur le milieu gélosé choisi (8.3 et 8.4), en veillant à ne pas emprisonner de bulles d'air dessous.

8.3 - Incubation et différenciation, essai standard

Après filtration (8.2), placer la membrane sur la boîte de Petri contenant la gélose lactosée au TTC et incuber à (36 ± 2) °C pendant (21 ± 3) h.

> NOTE 1 Une extension de la durée d'incubation jusqu'à (44 ± 4) h peut augmenter la sensibilité de l'essai et peut être particulièrement utile pour les boîtes ne présentant pas de colonies typiques après (21 ± 3) h.
> NOTE 2 L'utilisation d'une membrane filtrante supplémentaire pour incubation à 44 °C peut permettre d'éviter le problème de la flore interférente.

Examiner les membranes et considérer comme bactéries lactose-positives toutes les colonies typiques, quelle que soit leur taille, si le milieu sous la membrane présente une coloration jaune. Pour les essais de l'oxydase et de l'indole, repiquer de préférence toutes les colonies typiques obtenues ou un nombre représentatif (au moins 10), respectivement sur gélose non sélective et dans un bouillon au tryptophane .

Incuber la gélose non sélective à (36 ± 2) °C pendant (21 ± 2) h et effectuer l'essai à l'oxydase comme suit.

- Verser sur un papier-filtre 2 à 3 gouttes du réactif à l'oxydase préparé extemporanément.
- À l'aide d'une tige en verre ou en bois, ou d'une anse en platine (et non en nickel-chrome) ou en plastique, étaler une partie de la culture sur le papier-filtre préparé.
- Considérer la réaction comme positive si, dans les 30 s, apparaît une coloration bleu/violet foncé.

Incuber le tube contenant le bouillon au tryptophane à (44 ± 0,5) °C pendant (21 ± 3) h et contrôler la production d'indole en ajoutant 0,2 mL à 0,3 mL de réactif de Kovacs . L'apparition d'une coloration rouge à la surface du bouillon confirme la production d'indole.

Considérer toutes les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase comme étant des **bactéries coliformes**.

Considérer toutes les colonies ayant une réaction négative à l'oxydase, mais positive à l'indole, comme étant des ***E. coli*** .

> NOTE 3 : Dans certains cas particuliers, l'identification des bactéries coliformes peut être nécessaire, pour faire la différence, par exemple, entre les souches d'origine fécale et celles d'origine aquatique ou tellurique.

DOCUMENT 9 (suite et fin)

8.4 - Incubation et différenciation, essai rapide

Après filtration (8.2), placer la membrane sur le milieu TSA et incuber à (36 ± 2) °C pendant 4 h à 5h. Placer ensuite la membrane sur le milieu TBA et incuber à (44 ± 0,5) °C pendant 19 h à 20 h.

S'il est souhaité, les deux milieux gélosés peuvent être combinés dans une même boîte de Petri à deux couches. Dans ce cas, il convient de placer la membrane sur une boîte de Petri préparée extemporanément avec une double couche de TSA et de TBA et d'incuber à (36 ± 2) °C pendant 4 h à 5 h, puis à (44 ± 0,5) °C, pendant 19 h à 20 h.

Après la période d'incubation, placer la membrane sur un disque en papier-filtre imbibé à saturation de réactif pour la recherche d'indole et l'irradier sous une lampe à ultraviolets pendant 10 min à 30 min en fonction de l'apparition d'une coloration. Compter toutes les colonies rouges sur la membrane comme étant des ***E. coli*** .

NOTE 1 : Des réactifs vendus dans le commerce dans une base aqueuse peuvent permettre d'obtenir rapidement des résultats plus clairs sans qu'il soit nécessaire d'avoir recours aux rayons UV.

NOTE 2 : Une répartition inégale des colonies ou la présence d'une flore importante peut interférer avec la différenciation des colonies indole-positives en raison de la diffusion de la couleur aux colonies adjacentes.