

La norme NF EN ISO 9308-1 a été révisée en 2014, avec l'utilisation d'un milieu chromogène, le CCA (Chromocult® Coliform Agar), dont la lecture repose sur la couleur des colonies.

## Milieu CCA : principe, utilisation, retours d'expérience

### Description des versions 2000 et 2014 de la norme et utilisations

#### NF EN ISO 9308-1:2000

##### ➤ Recherche des coliformes

Milieu TTC

critère présomptif pour un coliforme : halo jaune (lactose +)

Confirmation après repiquage sur milieu non sélectif (ex : BCP)

par test oxydase ↓

oxydase - = coliforme ↑

##### ➤ Identification d'*E. coli* par test indole



- ✓ Bien que remplacée depuis 2014, 'norme d'application obligatoire' en France
  - ✓ Méthode de filtration sur membrane la plus appropriée pour la surveillance de la qualité microbiologique des eaux
- ⇒ à utiliser en France dans le cadre du contrôle sanitaire des eaux

#### NF EN ISO 9308-1:2014 / A1:2017

##### ➤ Recherche des coliformes et identification d'*E. coli*

Milieu CCA

caractéristique d'*E. coli* : colonie bleue ( $\beta$ gal+ et  $\beta$ glu+)

critère présomptif pour un coliforme autre qu'*E. coli* : colonie rose ( $\beta$ gal+ et  $\beta$ glu-)

Confirmation après repiquage sur milieu non sélectif (ex : BCP)

par test oxydase ↓

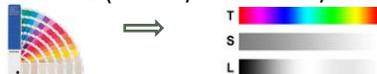
oxydase - = coliforme ↑

- ✓ Norme internationale de référence
- ✓ En France, peut être utilisée hors contrôle sanitaire
- ✓ Méthode recommandée uniquement pour les eaux très faiblement chargées

### Présentation d'une étude\* menée par AGLAE sur l'incertitude associée à la couleur des colonies observées sur milieu CCA

#### Expérimentation

- ✓ 25 souches différentes testées
- ✓ Lectures croisées des boîtes par 4 opérateurs
- ✓ Couleur de la colonie exprimée en référentiel Pantone et convertie en code TSL (Teinte / Saturation / Luminosité)



- ✓ Nuance perçue au centre de la colonie, sur son pourtour et au revers de la boîte
- ✓ Exploitation statistique par Analyse en Composantes Principales (ACP)

#### Observations

- ✓ Plusieurs souches testées présentent des réponses singulières
- ✓ Risque d'erreur de distinction des *Escherichia coli* avec les autres coliformes lié à la perception des couleurs
- ✓ La pigmentation du centre des colonies est un critère fiable, mais sur les petites colonies la pigmentation n'est pas suffisamment développée
- ✓ Nécessité de préciser le point de lecture de la couleur, à savoir le centre de la colonie

### Expertise métier en France sur l'utilisation du milieu CCA

La commission AFNOR T90D a émis des réserves quant au milieu CCA : pas assez sélectif et distinction des colonies cibles difficile rendant délicate l'interprétation des observations (réf. étude ANSES réalisée par le LHN et commanditée par la DGS - Saisine n° 2010-SA-0323; DGS n°100019)

#### Adaptation des essais interlaboratoires « Microbiologie de base » (M30) à la problématique « méthodes »

- ✓ *E. coli* et bactéries coliformes peuvent être analysées selon l'une ou l'autre des versions de la norme
- ✓ Examen des écarts entre méthodes systématiquement réalisé pour tous les paramètres analytiques, permettant d'obtenir un z-score fiable et prise en compte des éventuelles déviations méthodologiques dans l'évaluation des performances
- ✓ Possibilité d'effectuer des analyses additionnelles en parallèle, selon l'une des deux versions de la norme, en commandant des échantillons supplémentaires

\*Cette étude réalisée en 2015 est présentée dans la note technique AGLAE n°8 : [Recherche et dénombrement des coliformes et d'\*E. coli\* - Incertitude associée à la couleur des colonies observées sur milieu CCA](#)