

NORME INTERNATIONALE

ISO
9308-1

Première édition
1990-10-01

**Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement
des organismes coliformes, des organismes
coliformes thermotolérants et des *Escherichia
coli* présumés**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

Partie 1:
Méthode de filtration sur membrane

ISO 9308-1:1990

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0e1287c-d72e-4f91-868d->

[a3a06d3743db/iso-9308-1-1990](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0e1287c-d72e-4f91-868d-a3a06d3743db/iso-9308-1-1990)
*Water quality — Detection and enumeration of coliform organisms,
thermotolerant coliform organisms and presumptive Escherichia coli —
Part 1: Membrane filtration method*

INTERNATIONAL

ISO



Numéro de référence
ISO 9308-1:1990(F)

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 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.

La Norme internationale ISO 9308-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

L'ISO 9308 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des organismes coliformes, des organismes coliformes thermotolérants et des Escherichia coli présumés*:

- *Partie 1: Méthode de filtration sur membrane*
- *Partie 2: Méthode du nombre le plus probable*

Les annexes A et B de la présente partie de l'ISO 9308 sont données uniquement à titre d'information.

© ISO 1990

Droits de reproduction réservés. 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'éditeur.

Organisation Internationale de normalisation
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

Introduction

La présence et l'importance de la pollution fécale est un facteur important de l'évaluation de la qualité d'une masse d'eau. L'examen d'échantillons d'eau pour la recherche de bactéries du groupe des organismes coliformes¹⁾, normalement présents dans les intestins de l'homme et des animaux homéothermes, fournit une indication sur ce type de pollution. L'aptitude de certains membres du groupe coliforme à vivre dans l'eau étant limitée, leur nombre peut également être utilisé pour estimer le degré de pollution fécale récente.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 9308-1:1990

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0e1287c-d72e-4f91-868d-a3a06d3743db/iso-9308-1-1990>

1) Voir annexe A pour de plus amples informations microbiologiques sur l'étude de l'eau à la recherche d'organismes du groupe coliforme.

Page blanche

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9308-1:1990

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0e1287c-d72e-4f91-868d-a3a06d3743db/iso-9308-1-1990>

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des organismes coliformes, des organismes coliformes thermotolérants et des *Escherichia coli* présumés —

Partie 1:

Méthode de filtration sur membrane

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 9308 prescrit une méthode de recherche et de dénombrement des organismes coliformes, des organismes coliformes thermotolérants et des *Escherichia coli* présumés (*E. coli* présumés) présents dans l'eau après filtration sur une membrane, suivie d'une culture sur un milieu lactosé sélectif (voir ISO 7704) et calcul de leur nombre dans l'échantillon.

Cette méthode peut être appliquée à tous les types d'eau, à moins que des particules en suspension n'interfèrent avec la filtration ou que d'autres organismes en trop grand nombre n'interfèrent avec la croissance.

Le choix des essais utilisés pour la recherche et la confirmation des organismes du groupe coliforme, y compris *E. coli*, peut être considéré comme faisant partie d'une séquence continue. L'importance de la confirmation pour un échantillon donné dépend en partie de la nature de l'eau, de son usage, et en partie des raisons ayant conduit à cet examen. Dans la pratique, la recherche d'*E. coli* présumés dans l'eau comme indiqué en 3.3 fournit généralement une indication sur une pollution fécale récente.

2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente partie de l'ISO 9308. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente partie

de l'ISO 9308 sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

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

ISO 5667-1:1980, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1: Guide général pour l'établissement des programmes d'échantillonnage*.

ISO 5667-2:1982, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage*.

ISO 5667-3:1985, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3: Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons*.

ISO 6887:1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique*.

ISO 7704:1985, *Qualité de l'eau — Évaluation des membranes filtrantes utilisées pour des analyses microbiologiques*.

ISO 8199:1988, *Qualité de l'eau — Guide général pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture*.

3 Définitions

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 9308, les définitions suivantes s'appliquent.

3.1 organismes coliformes: Organismes capables de former des colonies en aérobiose à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ou à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ sur un milieu lactosé sélectif et différentiel, avec production d'acide (et d'aldéhyde) dans les 24 h.

3.2 organismes coliformes thermotolérants: Organismes coliformes répondant à la définition donnée en 3.1, présentant les mêmes propriétés de fermentation dans les 24 h, à $44\text{ °C} \pm 0,25\text{ °C}$ ou à $44,5\text{ °C} \pm 0,25\text{ °C}$.

NOTE 1 La production de gaz n'étant pas décelable sur les membranes, les organismes obtenus par filtration sur membrane ne sont pas forcément les mêmes que ceux décelés par la méthode des tubes multiples [nombre le plus probable (NPP)].

3.3 *Escherichia coli* présumés (*E. coli* présumés): Organismes coliformes thermotolérants répondant à la définition donnée en 3.2 qui produisent, en plus, du gaz à partir du lactose (et du mannitol) ainsi que de l'indole à partir du tryptophane dans les 24 h, soit à $44\text{ °C} \pm 0,25\text{ °C}$, soit à $44,5\text{ °C} \pm 0,25\text{ °C}$.

4 Principe

Filtration d'une prise d'essai de l'échantillon homogénéisé sur une membrane stérile qui retient les organismes; transfert de la membrane soit sur un milieu de culture sélectif de gélose lactosée, soit sur un tampon absorbant saturé d'un milieu liquide sélectif contenant du lactose.

Incubation de la membrane pendant 24 h soit à 35 °C ou 37 °C pour la recherche d'organismes coliformes, soit à 44 °C pour la recherche d'organismes coliformes thermotolérants.

Comptage direct des colonies caractéristiques formées sur la membrane; culture de certaines de ces colonies pour essais de confirmation pour la production de gaz et d'indole. Calcul du nombre d'organismes coliformes, d'organismes coliformes thermotolérants et d'*Escherichia coli* présumés susceptibles de se trouver dans 100 ml d'échantillon.

5 Diluants, milieux de culture et réactifs

5.1 Produits de base

Pour la préparation des milieux de culture et des réactifs, utiliser des ingrédients de qualité homogène et des produits chimiques de qualité analytique; suivre les instructions données dans l'annexe B. Pour des informations sur la conservation, voir ISO 8199. Il est possible également

d'utiliser des milieux complets déshydratés, suivre alors à la lettre les instructions du fabricant.

Pour la préparation des milieux, utiliser de l'eau distillée ou de l'eau désionisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance bactérienne dans les conditions de l'essai et conforme à l'ISO 3696.

5.2 Diluant

Pour préparer les dilutions de l'échantillon, utiliser l'un des diluants recommandés dans l'annexe B. Préparer le diluant conformément aux instructions données dans l'annexe B.

5.3 Milieux d'isolement

Utiliser un ou plusieurs des milieux de culture suivants soit sous forme solide avec de la gélose, soit sous forme bouillon pour tampons absorbants saturés. Les instructions pour la préparation des milieux sont données dans l'annexe B.

5.3.1 Gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7²⁾

5.3.2 Gélose lactosée au Tergitol 7²⁾

5.3.3 Bouillon enrichi au Teepol²⁾

5.3.4 Bouillon au laurylsulfate

5.3.5 Milieu endo

5.3.6 Gélose endo LES

5.3.7 Milieu mFC

5.4 Milieux de confirmation

Utiliser un ou plusieurs des milieux suivants.

5.4.1 Milieu pour la production de gaz

Eau peptonée lactosée.

5.4.2 Milieu pour la production d'indole

Eau tryptonée.

5.4.3 Milieu pour tube à essai unique pour production de gaz et d'indole

Bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane.

2) Tergitol 7 et Teepol sont des exemples de produits appropriés disponibles sur le marché. Cette information est donnée à l'intention des utilisateurs de la présente partie de l'ISO 9308 et ne signifie nullement que l'ISO approuve ou recommande l'emploi exclusif des produits ainsi désignés.

5.5 Réactifs

5.5.1 Réactif de Kovacs pour la recherche de l'indole

5.5.2 Réactif à l'oxydase pour la recherche de l'oxydase

6 Appareillage

Matériel courant de laboratoire microbiologique, y compris

6.1 Four à air chaud pour stérilisation en chaleur sèche et autoclave.

Outre l'appareillage livré stérile, la verrerie et tout autre matériel doivent être stérilisés conformément aux instructions données dans l'ISO 8199.

6.2 Incubateur ou bain d'eau, réglable à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ou à $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

6.3 Incubateur ou bain d'eau, réglable à $44\text{ °C} \pm 0,25\text{ °C}$ ou à $44,5\text{ °C} \pm 0,25\text{ °C}$.

6.4 pH-mètre.

6.5 Appareillage pour filtration sur membrane.

6.6 Membranes filtrantes, généralement d'environ 47 mm ou 50 mm de diamètre, présentant des caractéristiques de filtration équivalentes à un diamètre nominal des pores de 0,45 μm . Si elles ne sont pas livrées stériles, elles doivent être stérilisées conformément aux instructions du fabricant.

6.7 Pinces, pour la manipulation des membranes.

7 Échantillonnage

Prélever les échantillons et les transmettre au laboratoire conformément à l'ISO 8199, l'ISO 5667-1, l'ISO 5667-2 et l'ISO 5667-3.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon, filtration et ensemencement des milieux

Pour la préparation de l'échantillon et des dilutions, la filtration et l'ensemencement des milieux d'isolement, suivre les instructions données dans l'ISO 8199 et l'ISO 6887.

8.1.1 Pour les organismes coliformes, filtrer le volume requis d'échantillon, ou une dilution de cet échantillon, sur une membrane. Placer la membrane sur le milieu choisi, en s'assurant que des bulles d'air ne soient pas emprisonnées sous la membrane.

8.1.2 Pour les organismes coliformes thermotolérants, filtrer le volume requis d'échantillon ou une dilution de cet échantillon, sur une membrane. Placer la membrane sur le milieu choisi en s'assurant que des bulles d'air ne soient pas emprisonnées sous la membrane.

NOTE 2 Le volume d'échantillon filtré devrait être le même qu'en 8.1.1.

8.2 Incubation des membranes

8.2.1 Pour les organismes coliformes, faire incubé la membrane pendant 18 h à 24 h à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ ou $37\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

8.2.2 Pour les organismes coliformes thermotolérants, faire incubé la membrane pendant 18 h à 24 h à $44\text{ °C} \pm 0,25\text{ °C}$ ou à $44,5\text{ °C} \pm 0,25\text{ °C}$.

NOTES

3 Le même milieu peut généralement être utilisé pour les organismes coliformes et pour les organismes coliformes thermotolérants, mais le milieu mFC devrait être utilisé uniquement à 44 °C , et les milieux Endo et Endo LES à 35 °C ou à 37 °C .

4 Une période préliminaire à une température plus basse telle que 30 °C pendant les 4 premières heures de l'incubation est recommandée pour revivifier les organismes choqués, en particulier pour l'examen d'eau potable.

8.3 Examen des membranes

8.3.1 Organismes coliformes

Examiner les membranes et considérer comme des organismes coliformes toutes les colonies, quelle que soit leur taille, si, après incubation à 35 °C ou à 37 °C , elles présentent les caractéristiques suivantes.

- Sur gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7 (5.3.1): une coloration jaune, orange ou rouge brique avec un halo central jaune sur le milieu situé sous la membrane.
- Sur gélose lactosée au Tergitol 7 (5.3.2): un halo central jaune sur le milieu situé sous la membrane.
- Sur le bouillon enrichi au Teepol (5.3.3): une couleur jaune s'étendant sur la membrane.

- Sur le bouillon au laurylsulfate (5.3.4): une coloration jaune s'étendant sur la membrane.
- Sur gélose ou bouillon endo (5.3.5): une coloration rouge foncée avec un éclat métallique vert/doré.
- Sur gélose endo LES (5.3.6): une coloration rouge foncée avec éclat métallique vert/doré.

8.3.2 Organismes coliformes thermotolérants

Considérer comme organismes coliformes thermotolérants présumés toutes les colonies qui, après incubation à 44 °C, présentent les mêmes caractéristiques que celles décrites en 8.3.1. Avec le milieu mFC (5.3.7), ces colonies ont une coloration bleue.

8.4 Essais de confirmation

Il est important de noter que les comptages de colonies sur membranes à 35 °C et à 44 °C n'indiquent que la présence d'organismes coliformes présumés. Dans la mesure où il n'est détecté de production de gaz, il existe une présomption supplémentaire pour que les organismes qui composent ces colonies produisent également du gaz provenant du lactose. Pour l'examen des eaux non traitées ou partiellement traitées, ceci peut être suffisant, mais pour les réserves d'eau potable et dans d'autres cas, il est important d'effectuer des essais de confirmation, de préférence sur des cultures pures.

8.4.1 Repliquage, incubation et examen

8.4.1.1 Organismes coliformes

Pour confirmer les résultats des membranes, repliquer chaque colonies (8.3.1) ou un nombre représentatif de ces colonies dans des tubes à essai contenant de l'eau peptonée lactosée (5.4.1) et laisser incuber à 35 °C ou à 37 °C pendant 48 h: la production de gaz pendant cette période confirme la présence d'organismes coliformes.

8.4.1.2 Organismes coliformes thermotolérants et *E. coli* présumés

Pour les organismes coliformes thermotolérants et les *E. coli* présumés, incubés à 44 °C ou à 35 °C ou à 37 °C, repliquer chaque colonie (8.3.2) ou un nombre représentatif de ces colonies, dans des tubes contenant de l'eau peptonée lactosée et de l'eau tryptonée et faire incuber à 44 °C pendant 24 h. La production de gaz dans l'eau peptonée lactosée confirme la présence d'organismes coliformes thermotolérants et l'apparition d'une coloration rouge à la surface de la culture à l'eau tryptonée après addition de 0,2 ml à 0,3 ml de réactif de

Kovacs (5.5.1) confirme la présence *E. coli* présumés.

NOTES

5 L'utilisation d'un bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane permet de prouver à la fois la production de gaz et d'indole dans un seul tube à essai.

6 La recherche d'*E. coli* présumés est considérée comme une indication suffisante de pollution fécale. Toutefois, d'autres essais de confirmation d'*E. coli* peuvent être effectués si on le juge nécessaire (voir 8.5).

7 Lorsqu'on procède à des repiquages de colonies sur membranes dans des tubes de milieu de confirmation, il est préférable de repiquer également sur boîte de milieu nutritif gélosé pour l'essai à l'oxydase.

8.5 Essai à l'oxydase

Certaines bactéries présentes dans l'eau peuvent, à de nombreux égards, être conformes à la définition des organismes coliformes, mais elles ne peuvent produire de gaz à partir du lactose qu'à des températures inférieures à 37 °C. Elles donnent donc des résultats négatifs lors des essais de confirmation normalisés pour les organismes coliformes et leur présence dans l'eau n'est donc pas considérée comme significative. Les espèces aéromones, qui se présentent naturellement dans l'eau, ont une température de croissance optimale de l'ordre de 30 °C à 35 °C, mais peuvent néanmoins produire des acides et des gaz à partir du lactose à 37 °C. Elles se distinguent du groupe coliforme par une réaction à l'oxydase positive.

8.5.1 Effectuer l'essai à l'oxydase avec des cultures pures d'organismes en faisant fermenter le lactose, cultivées sur un milieu nutritif à la gélose, comme suit:

- placer 2 à 3 gouttes de réactif à l'oxydase nouvellement préparé (5.5.2) sur un papier filtre dans une boîte de Petri;
- avec une tige de verre, un coton-tige ou une boucle en platine (et non en nickel-chrome), étaler une partie de la culture sur le papier filtre préparé (voir note 7);
- considérer l'apparition d'une coloration bleu/violet foncé dans les 10 s comme une réaction positive.

NOTE 8 Chaque fois qu'est employé le réactif à l'oxydase, effectuer des essais de contrôle avec des cultures d'organismes connues pour donner une réaction positive (*Pseudomonas aeruginosa*) ainsi qu'une culture donnant une réaction négative (*E. coli*).

9 Expression des résultats

À partir du nombre de colonies dénombrées sur les membranes et en tenant compte des résultats d'essais de confirmation effectués, calculer le nombre d'organismes coliformes, d'organismes coliformes thermotolérants et d'*Escherichia coli* présumés présents dans 100 ml d'échantillon conformément à l'ISO 8199 (8.4) à partir de l'équation suivante:

$$C = \frac{A \times N \times V_s \times F}{B \times V_t}$$

où

- C* est le nombre de colonies confirmées par 100 ml;
- A* est le nombre de colonies réellement confirmées;
- B* est le nombre de colonies cultivées pour confirmation;
- N* est le nombre de colonies caractéristiques sur la membrane (8.3.1 et 8.3.2);
- V_t* est le volume d'essai de l'échantillon d'eau filtré (8.1.1 et 8.1.2);

V_s est le volume de référence pour l'expression des résultats (100 ml);

F est le facteur de dilution.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

- la référence à la présente partie de l'ISO 9308;
- tous les détails nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- la technique et le milieu d'isolement utilisé;
- les milieux de confirmation et les essais utilisés;
- la durée, la température et les conditions d'incubation;
- les résultats exprimés conformément à l'article 9;
- toute autre information appropriée concernant la méthode.

iTech STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9308-1:1990
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/e0e1287c-d72e-4f91-868d-a3a06d3743db/iso-9308-1-1990>