NORME INTERNATIONALE

ISO 9308-2

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 2: Méthode du nombre le plus probable

ISO 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdf73bf7-10c2-4962-956d-e0b80c94be71/iso-9308-2-1990

Water quality — Detection and enumeration of coliform organisms, thermotolerant coliform organisms and presumptive Escherichia coli *— Part 2: Multiple tube (most probable number) method*

Numéro de référence
ISO 9308-2:1990(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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

La Norme internationale ISO 9308-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

ISO 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/edf73bf7-10c2-4962-956d-e0b80c04be71/iso-9308-2-1990

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 coliformes[1], 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 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdf73bf7-10c2-4962-956d-e0b80c94be71/iso-9308-2-1990

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 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdf73bf7-10c2-4962-956d-e0b80c94be71/iso-9308-2-1990

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

Partie 2:
Méthode du nombre le plus probable

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) par culture dans un milieu liquide dans des tubes multiples et calcul de leur nombre le plus probable dans l'échantillon.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdf73b7-10c2-49b2-958d-e0b80c94be71/iso-9308-2-1990

Cette méthode peut être appliquée à tous les types d'eau, même ceux contenant une quantité appréciable de particules en suspension.

Le choix des essais utilisés pour la recherche et la confirmation des organismes du groupe coliforme, y compris l'*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 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 la 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 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 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °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 °C ± 0,25 °C ou à 44,5 °C ± 0,25 °C.

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 °C ± 0,25 °C, soit à 44,5 °C ± 0,25 °C.

4 Principe

Ensemencement d'une série de tubes à essai contenant un milieu de culture sélectif lactosé avec des prises d'essai de l'échantillon dilué ou non.

Examen des tubes à essai après une incubation de 24 h et de 48 h à 35 °C ou 37 °C; repiquage à partir de chaque tube à essai montrant une turbidité avec une production de gaz dans un milieu de confirmation plus sélectif et, si l'on recherche les *E. coli* présumés, sur un milieu sur lequel peut être prouvée la formation d'indole.

Incubation de ces milieux de confirmation pendant 48 h au plus à 35 °C ou à 37 °C pour la recherche d'organismes coliformes, et à 44 °C pendant 24 h au plus pour les organismes coliformes thermotolérants et les *E. coli* présumés.

Au moyen de tables statistiques, calcul du nombre le plus probable (NPP) d'organismes coliformes, d'organismes coliformes thermotolérants et de *E. coli* présumés, susceptibles d'être présents dans 100 ml de l'échantillon, à partir du nombre de tubes donnant des résultats de confirmation positifs.

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. Les instructions pour la préparation sont données dans l'annexe B.

5.3.1 Bouillon lactosé

5.3.2 Bouillon de MacConkey

5.3.3 Milieu lactosé amélioré au glutamate et au formiate[2)]

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

5.3.4 Bouillon au lauryltryptose (lactose)

ISO 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd f73bf7-10c2-4962-956d-e0b80c94be71/iso-9308-2-1990

5.4 Milieux de confirmation

Utiliser un ou plusieurs des milieux suivants.

5.4.1 Milieux pour la production de gaz

5.4.1.1 Bouillon (bilié) lactosé au vert brillant

5.4.1.2 Milieu EC

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.

5.5 Réactifs

5.5.1 Réactif de Kovacs pour la recherche de l'indole

2) Disponible dans le commerce sous forme déshydratée, sous l'appellation «Minerals modified glutamate medium». 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 du produit ainsi désigné.

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 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °C.

6.3 Incubateur ou **bain d'eau**, réglable à 44 °C ± 0,25 °C ou à 44,5 °C ± 0,25 °C.

6.4 pH-mètre.

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.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdf73bf7-10c2-4962-956d-e0b80c94be71/iso-9308-2-1990

8 Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon et ensemencement des milieux

Pour la préparation de l'échantillon et des dilutions et l'ensemencement des milieux d'isolement avec les prises d'essai, suivre les instructions données dans l'ISO 8199. Ensemencer des tubes à essai contenant un milieu d'isolement double concentration avec des prises d'essai de 5 ml ou plus.

8.2 Incubation des tubes

Faire incuber les tubes ensemencés à 35 °C ± 0,5 °C ou à 37 °C ± 0,5 °C pendant 48 h.

8.3 Examen des tubes à essai

Examiner les cultures en tubes à essai après incubation pendant 18 h à 24 h et considérer comme réactions positives les tubes présentant une turbidité due à une croissance bactérienne et à la formation de gaz dans les cloches de Durham, ainsi qu'une production d'acide si le milieu d'isolement contient un indicateur de pH. Faire incuber à nouveau les tubes à essai qui ne présentent aucun de ces changements et les examiner à nouveau après 48 h pour rechercher une réaction positive.

8.4 Essais de confirmation

Il convient de noter que les réactions positives dans les tubes à essai contenant un milieu d'isolement n'indiquent que la présence d'organismes coliformes présumés. Il est donc important de procéder à des essais de confirmation.

8.4.1 Repiquage, incubation et examen

Faire un repiquage à partir de chaque tube de milieu d'isolement présentant un résultat positif dans un ou plusieurs tubes contenant des milieux de confirmation (5.4) pour la production de gaz et d'indole.

NOTE 1 Si l'on utilise le bouillon lactosé le moins inhibiteur pour l'isolement, il est recommandé de repiquer sur l'un des deux milieux de confirmation les plus sélectifs [bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant ou bouillon EC] pour confirmation.

8.4.1.1 Organismes coliformes

Pour confirmer la présence d'organismes coliformes, faire incuber un tube à essai de bouillon (bilié) lactosé au vert-brillant (5.4.1) à 35 °C ou à 37 °C et rechercher la production de gaz dans les 48 h.

8.4.1.2 Organismes coliformes thermotolérants et *E. coli* présumés

Pour confirmer la présence d'organismes coliformes thermotolérants, faire incuber un autre tube à essai de milieu EC (5.4.1) à 44 °C pendant 24 h et rechercher la production de gaz.

Pour confirmer la présence d'*E. coli* présumés, faire incuber un tube à essai d'eau tryptonée (8.4.1) pour la recherche d'indole à 44 °C pendant 24 h. Puis ajouter 0,2 ml à 0,3 ml de réactif de Kovacs (5.5.1) dans le tube contenant de l'eau tryptonée: l'apparition d'une coloration rouge après l'avoir mélangé avec précaution indique la présence d'indole.

NOTES

2 L'utilisation d'un bouillon tryptosé au mannitol, au laurylsulfate et au tryptophane permet de montrer la production de gaz et d'indole par les *E. coli*.

3 La détection d'*E. coli* présumés est considérée comme une preuve suffisante de pollution fécale. Toutefois, des essais complémentaires des *E. coli* peuvent être effectués si nécessaire (voir 8.5).

4 Lorsqu'on procède à des repiquages de colonies sur membranes dans des tubes de milieux 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. Parce que les espèces d'aéromones qui se présentent naturellement dans l'eau interfèrent seulement à une température de 37 °C et en dessous, il est seulement nécessaire d'effectuer l'essai à l'oxydase en déterminant des coliformes.

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

— placer 2 ou 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 (non en nickel-chrome), étaler une partie de la culture sur le papier filtre préparé (voir note 4);

— considérer l'apparition d'une coloration bleu/violet foncé dans les 10 s comme une réaction positive.

NOTE 5 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'avec une culture donnant une réaction négative (*E. coli*).

9 Expression des résultats

À partir du nombre de tubes de milieu d'isolement ayant donné des réactions positives aux essais confirmatifs, calculer, par référence aux tables statistiques de l'ISO 8199, le nombre le plus probable d'organismes coliformes, d'organismes coliformes thermotolérants et d'*Escherichia coli* présumés présents dans 100 ml d'échantillon.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les informations suivantes:

a) la référence à la présente partie de l'ISO 9308;

b) tous les détails nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;

c) la technique et le milieu d'isolement utilisé;

d) les milieux de confirmation et les essais utilisés;

e) la durée, la température et les conditions d'incubation;

f) les résultats exprimés conformément à l'article 9;

g) toute autre information appropriée concernant la méthode.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd17c617-10c2-4962-956d-e0b80c94be71/iso-9308-2-1990

Annexe A
(informative)

Informations microbiologiques complémentaires liées à l'examen de l'eau à la recherche d'organismes du groupe coliforme

Pour l'examen de routine de l'eau, le groupe coliforme peut être décrit généralement en termes microbiologiques quoique non taxonomiques comme suit.

Les organismes coliformes sont des bactéries en forme de bâtonnets, Gram négatif, ne formant pas de spores, présentant une réaction négative à l'oxydase, pouvant croître en aérobiose, et éventuellement en anaérobiose en présence de sels biliés (ou autre dérivé tensio-actif présentant des propriétés d'inhibition de croissance similaires), et également capables de faire fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide, de gaz et d'aldéhyde dans les 48 h lorsqu'on les fait incuber à une température comprise entre 35 °C et 37 °C.

Les organismes coliformes thermotolérants sont des organismes coliformes qui présentent les mêmes propriétés biologiques et de fermentation lorsqu'on les fait incuber à une température de 44 °C à 44,5 °C.

Les *E. coli* présumés sont des organismes coliformes thermotolérants qui sont également capables de produire de l'indole à partir du tryptophane.

On peut considérer comme un *E. coli* présumé, un *E. coli* qui donne également un résultat positif lors de l'essai au rouge de méthyle et peut décarboxyler de l'acide L-glutamique, mais qui n'est pas capable de produire de l'acétylméthylcarbinol, d'utiliser le citrate comme seule source de carbone ou de croître dans un bouillon au cyanure de potassium (KCN).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
ISO 9308-2:1990
https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cdf73bf7-10c2-4962-956d-e0b80c94be71/iso-9308-2-1990