
**Qualité de l'eau — Dénombrement
des micro-organismes revivifiants —
Comptage des colonies par
ensemencement dans un milieu de culture
nutritif gélosé**

iTeh STANDARD PREVIEW
*Water quality — Enumeration of culturable micro-organisms — Colony count
by inoculation in a nutrient agar culture medium*
(standards.iteh.ai)

[ISO 6222:1999](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/580ac7b8-e968-47ab-bf5f-72d8b0be2630/iso-6222-1999>



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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 3.

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.

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments de la présente Norme internationale peuvent faire l'objet de droits de propriété intellectuelle ou de droits analogues. L'ISO ne saurait être tenue pour responsable de ne pas avoir identifié de tels droits de propriété et averti de leur existence.

La Norme internationale ISO 6222 a été élaborée par le Comité européen de normalisation (CEN) en collaboration avec le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*, conformément à l'Accord de coopération technique entre l'ISO et le CEN (Accord de Vienne).

Tout au long du texte de la présente norme, lire «...la présente norme européenne...» avec le sens de «...la présente Norme internationale...».

Cette deuxième édition annule et remplace la première édition (ISO 6222:1988), dont elle constitue une révision technique.

© ISO 1999

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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
Internet iso@iso.ch

Imprimé en Suisse

Avant-propos

Le texte du EN ISO 6222:1999 a été élaboré par le Comité Technique CEN/TC 230 "Analyse de l'eau" dont le secrétariat est tenu par le DIN, en collaboration avec le Comité Technique ISO/TC 147 "Qualité de l'eau".

Cette norme européenne devra recevoir le statut de norme nationale, soit par publication d'un texte identique, soit par entérinement, au plus tard en novembre 1999, et toutes les normes nationales en contradiction devront être retirées au plus tard en novembre 1999.

Selon le Règlement Intérieur du CEN/CENELEC, les instituts de normalisation nationaux des pays suivants sont tenus de mettre cette norme européenne en application: Allemagne, Autriche, Belgique, Danemark, Espagne, Finlande, France, Grèce, Irlande, Islande, Italie, Luxembourg, Norvège, Pays-Bas, Portugal, République Tchèque, Royaume-Uni, Suède et Suisse.

Introduction

Les eaux, quelle que soit leur nature, contiennent une multitude de micro-organismes de sources diverses telles que le sol et la végétation, dont l'estimation globale fournit une information utile pour l'évaluation et la surveillance de la qualité de l'eau. Des comptages séparés sont généralement effectués sur les micro-organismes qui sont capables de croître et de former des colonies sur des milieux de culture nutritifs gélosés à des températures de 36 °C et 22 °C.

Les comptages de colonies sont utiles pour l'évaluation de l'intégrité des ressources d'eaux souterraines et de l'efficacité des procédés de traitement de l'eau tels que la coagulation, la filtration et la désinfection; ils fournissent une indication sur la propreté et l'intégrité des systèmes de distribution. Ils peuvent également être utilisés pour évaluer l'aptitude à l'emploi de sources d'alimentation en eau pour la préparation d'aliments et de boissons qui ne devraient contenir que peu de micro-organismes afin d'éviter une contamination du produit par des germes contaminants.

Le principal intérêt du comptage de colonies réside dans la possibilité de détecter les variations par rapport aux nombres attendus grâce à une surveillance fréquente et à long terme. Toute augmentation soudaine du nombre obtenu peut en effet constituer un premier avertissement d'une pollution sérieuse et appeler à des investigations immédiates.

[ISO 6222:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/580ac7b8-e968-47ab-bf5f-72d8b0be2630/iso-6222-1999)

1 Domaine d'application

La présente norme européenne spécifie une méthode de dénombrement des micro-organismes revivifiables présents dans l'eau par comptage des colonies se formant dans un milieu de culture nutritif gélosé après incubation en aérobiose à 36 °C et 22 °C.

La méthode vise à mesurer l'efficacité de fonctionnement du procédé de traitement des alimentations publiques en eau potable et, plus généralement de tous les types d'eau. Elle est plus particulièrement applicable à l'analyse des eaux destinées à la consommation humaine, y compris des eaux en récipients fermés et des eaux minérales naturelles.

2 Références normatives

Cette norme européenne comporte par référence datée ou non datée des dispositions d'autres publications. Ces références normatives sont citées aux endroits appropriés dans le texte et les publications sont énumérées ci-après. Pour les références datées, les amendements ou révisions ultérieurs de l'une quelconque de ces publications ne s'appliquent à cette norme que s'ils y ont été incorporés par amendement ou révision. Pour les références non datées, la dernière édition de la publication à laquelle il est fait référence s'applique.

EN ISO 3696

Eau pour laboratoire à usage analytique – Spécification et méthodes d'essai (ISO 3696:1987)

EN ISO 5667-3

Qualité de l'eau – Echantillonnage – Partie 3: Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons (ISO 5667-3:1994)

EN 25667-2

Qualité de l'eau – Echantillonnage – Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage (ISO 5667-2:1991)

ISO 6887

Microbiologie – Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique

ISO 8199

Qualité de l'eau – Guide général pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture

3 Définitions

Pour les besoins de la présente norme européenne, la définition suivante s'applique:

micro-organismes revivifiables: Toute bactérie aérobie, levure ou moisissure, capable de former des colonies dans le milieu spécifié et dans les conditions d'essai décrites ci-dessous.

4 Principe

Ensemencement, par mélange dans un milieu de culture spécifié coulé dans des boîtes de Petri, de volumes mesurés d'un échantillon ou de ses dilutions. Incubation d'un jeu de boîtes à 36°C pendant 44 h et d'un autre jeu à 22°C pendant 68 h.

Calcul du nombre d'unités formant colonie (UFC) par millilitre (ml) d'échantillon à partir du nombre de colonies formées dans le milieu.

5 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment :

5.1 Appareillage pour la stérilisation en chaleur humide (autoclave)

ISO 6222:1999
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/580ac7b8-e968-47ab-bf5f-72d8b0be2630/iso-6222-1999>

5.2 **Etuve** capable de maintenir une température de (36 ± 2) °C ;

5.3 **Etuve** capable de maintenir une température de (22 ± 2) °C ;

5.4 **Boîtes de Petri en verre ou en matière de plastique** de diamètre 90 mm ou 100 mm ;

5.5 **Bain d'eau** ou équipement similaire, capable de maintenir une température de (45 ± 1) °C ;

5.6 **Appareil pour le comptage des colonies** muni d'un système d'éclairage sur fond noir.

6 Echantillonnage

Prélever les échantillons d'eau conformément aux instructions d'échantillonnage, de manipulation et de conservation indiquées dans l'EN 25667-2 et l'EN ISO 5667-3.

Analyser l'eau fournie en récipients fermés, y compris les eaux minérales naturelles, dans les 12 h suivant l'embouteillage, et les maintenir à une température de (5 ± 3) °C durant cette période.

7 Milieux de culture et diluants

7.1 Composants de base

Pour la préparation du milieu, utiliser des composants de qualité uniforme et des produits chimiques de qualité analytique, ou bien utiliser un milieu de culture équivalent complet déshydraté et suivre les instructions du fabricant.

Pour préparer le milieu, utiliser de l'eau distillée dans un appareil en verre ou de l'eau déionisée conforme à la qualité 3 de l'EN ISO 3696 et exempt de substances pouvant inhiber la croissance dans les conditions de l'essai.

NOTE: L'utilisation de produits chimiques d'autres qualités est permise, sous réserve de démontrer qu'ils ont une performance égale pour l'essai.

7.2 Diluant

Pour les dilutions, utiliser le diluant à base de peptone indiqué dans l'ISO 8199.

7.3 Gélose à l'extrait de levure

Tryptone (Peptone de caséine, pancr.)	6,0 g
Extrait de levure déshydraté	3,0 g
Gélose, en poudre ou en paillettes	10 g à 20 g (en fonction du pouvoir gélifiant)
Eau	1 000 ml

Ajouter les composants ou le milieu complet déshydraté, à l'eau et dissoudre par chauffage. Ajuster le pH si nécessaire de façon qu'après stérilisation il soit de $7,2 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu par volumes de 15 ml à 20 ml dans des tubes, flacons ou autres récipients. Pour conserver des volumes plus importants, utiliser des récipients de capacité allant jusqu'à 500 ml. Stériliser à l'autoclave (5.1) à $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ pendant (15 ± 1) min.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/580ac7b8-e968-47ab-bf5f-72d8b0be2630/iso-6222-1999>

Pour l'emploi, faire fondre le milieu, le laisser refroidir et le maintenir à $(45 \pm 1)^{\circ}\text{C}$ au moyen du bain d'eau (5.5). Il est recommandé de ne pas garder le milieu plus de 4 h à 45°C , après quoi le milieu doit être rejeté.

8 Mode opératoire

8.1 Préparation et ensemencement

Préparer l'échantillon, procéder aux dilutions et ensemercer les milieux de cultures selon l'ISO 8199, l'EN ISO 5667-3 et l'ISO 6887.

Utiliser la méthode par incorporation (ISO 8199). Placer un volume de la prise d'essai (ou de ses dilutions) n'excédant pas 2 ml dans la boîte de Petri, ajouter 15 ml à 20 ml de milieu fondu (7.3) et mélanger avec précaution par rotation lente. Laisser le milieu se solidifier. Le temps entre l'addition de la prise d'essai (ou ses dilutions) et l'addition du milieu fondu ne doit pas excéder 15 min. Ensemercer au moins une boîte par température d'incubation.

8.2 Incubation et examen

Retourner les boîtes et incuber un jeu à $(36 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ pendant (44 ± 4) h. Incuber l'autre jeu à $(22 \pm 2)^{\circ}\text{C}$ pendant (68 ± 4) h. Examiner les boîtes aussitôt qu'elles sont retirées des étuves. Si cela n'est pas possible, les conserver à $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ et les examiner dans les 48 h. Rejeter toute boîte présentant une croissance confluyente.

8.3 Comptage des colonies

Pour chaque température d'incubation, et selon les procédures décrites dans l'ISO 8199, compter les colonies présentes dans chaque boîte et calculer le nombre estimé d'unités formant colonies présentes dans 1 ml d'échantillon.

9 Expression des résultats

Exprimer les résultats sous la forme du nombre d'unités formant colonies par millilitre (UFC/ml) d'échantillon pour chaque température d'incubation.

En l'absence de colonie dans les boîtesensemencées avec les volumes d'essai de l'échantillon non dilué, exprimer le résultat comme étant non détecté dans un millilitre. Si les boîtesensemencées avec les plus fortes dilutions utilisées contiennent plus de 300 colonies, exprimer les résultats sous la forme > 300 ou uniquement en tant que valeurs approximatives.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit faire référence à la présente norme européenne et donner toutes les informations pertinentes et notamment :

- a) tous les détails nécessaires à une identification complète de l'échantillon ;
- b) la technique (incorporation) et le milieu utilisés ;
- c) la durée et la température d'incubation ;
- d) les résultats de comptage exprimés conformément à l'article 9 ;
- e) tout incident particulier observé en cours de l'analyse et tout autre fait pertinent concernant le mode opératoire suivi.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 6222:1999](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/580ac7b8-e968-47ab-bf5f-72d8b0be2630/iso-6222-1999)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/580ac7b8-e968-47ab-bf5f-72d8b0be2630/iso-6222-1999>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6222:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/580ac7b8-e968-47ab-bf5f-72d8b0be2630/iso-6222-1999>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 6222:1999

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/580ac7b8-e968-47ab-bf5f-72d8b0be2630/iso-6222-1999>