
**Qualité de l'eau — Dénombrement
des *Escherichia coli* et des bactéries
coliformes —**

**Partie 1:
Méthode par filtration sur membrane
pour les eaux à faible teneur en
bactéries**

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

*Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform
bacteria — ISO 9308-1:2014*

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/619c6728-9364-42e9-b093-716310abf5c0/iso-9308-1-2014>
*Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial
background flora*



iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9308-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2014

Droits de reproduction réservés. Sauf indication contraire, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20
Tel. + 41 22 749 01 11
Fax + 41 22 749 09 47
E-mail copyright@iso.org
Web www.iso.org

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
5 Appareillage et verrerie	2
6 Milieux de culture et réactifs	3
7 Échantillonnage	3
8 Mode opératoire	3
8.1 Préparation de l'échantillon.....	3
8.2 Filtration.....	3
8.3 Incubation et différenciation.....	3
9 Expression des résultats	4
10 Rapport d'essai	4
11 Assurance qualité	4
11.1 Généralités.....	4
11.2 Essais de performance de la gélose chromogène pour bactéries coliformes (CCA).....	4
11.3 Essais de performance de l'essai de recherche de l'oxydase.....	5
Annexe A (informative) Informations microbiologiques complémentaires sur les bactéries coliformes	6
Annexe B (normative) Composition et préparation des milieux de culture et réactifs	7
Annexe C (informative) Caractéristiques de performance	9
Bibliographie	10

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est appelée sur le fait que certains des éléments du présent document 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'OMC concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: Avant-propos — Informations supplémentaires. <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b095-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014>

Le comité chargé de l'élaboration du présent document est l'ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

Cette troisième édition annule et remplace la deuxième édition (ISO 9308-1:2000), qui a fait l'objet d'une révision technique.

Elle comprend également le rectificatif ISO 9308-1:2000/Cor.1:2007.

L'ISO 9308 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Dénombrement des Escherichia coli et des bactéries coliformes*:

- *Partie 1: Méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries*
- *Partie 2: Méthode du nombre le plus probable*
- *Partie 3: Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour la recherche et le dénombrement des E. coli dans les eaux de surface et les eaux résiduaires*

Introduction

La présence et l'étendue de la pollution fécale est un facteur important dans l'évaluation de la qualité de l'eau ainsi que du risque infectieux représenté pour la santé humaine. L'examen d'échantillons d'eau pour y rechercher des *Escherichia coli* (*E. coli*), normalement présents dans les intestins de l'homme et des animaux homéothermes, fournit une indication sur ce type de pollution. Les résultats de l'examen des bactéries coliformes peuvent s'avérer plus difficiles à interpréter en raison du fait que certains coliformes vivent également dans le sol et dans les eaux douces de surface, et ne sont donc pas toujours d'origine intestinale. La présence de bactéries coliformes peut donc, bien que ce ne soit pas la preuve d'une contamination d'origine fécale, indiquer une défaillance du traitement, du stockage ou de la distribution de l'eau.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 9308-1:2014](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 9308-1:2014

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014>

Qualité de l'eau — Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes —

Partie 1: Méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur du présent document connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter de tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

IMPORTANT — Il est indispensable que les essais menés selon le présent document soient effectués par un personnel adéquatement qualifié.

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 9308 spécifie une méthode de dénombrement des *Escherichia coli* (*E. coli*) et des bactéries coliformes. La méthode consiste en une filtration sur membrane, suivie d'une mise en culture dans une gélose chromogène et d'un calcul du nombre des organismes cibles présents dans l'échantillon. La gélose de différenciation étant peu sélective, la flore bactérienne générale peut perturber la fiabilité du dénombrement des *E. coli* et des bactéries coliformes, par exemple, dans certaines eaux de surface ou certaines eaux de puits peu profonds. Cette méthode ne convient pas à ces types d'eau.

La présente partie de l'ISO 9308 est particulièrement adaptée aux eaux à faible teneur en bactéries qui produiront moins de 100 colonies totales sur de la gélose chromogène pour le dénombrement des bactéries coliformes. Ces eaux peuvent être l'eau potable, l'eau de piscine désinfectée ou l'eau propre sortant de stations de production d'eau potable.

Certaines souches d'*E. coli* négatives à la β -D-glucuronidase, telles qu'*Escherichia coli* O157, ne sont pas détectées en tant qu'*E. coli*. Comme elles sont positives à la β -D-galactosidase, elles sont considérées comme des bactéries coliformes sur la gélose chromogène pour bactéries coliformes (CCA).

2 Références normatives

Les documents ci-après, dans leur intégralité ou non, sont des références normatives indispensables à l'application du présent document. Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique (y compris les éventuels amendements).

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

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

ISO 8199, *Qualité de l'eau — Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

ISO 19458, *Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les définitions suivantes et celles données dans l'ISO/IEC Guide 2 s'appliquent.

3.1

bactéries coliformes

membres de la famille des Entérobactéries qui expriment la β -D-galactosidase

3.2

Escherichia coli

E. coli

membre de la famille des Entérobactéries qui exprime la β -D-galactosidase et la β -D-glucuronidase

4 Principe

Filtration d'une prise d'essai de l'échantillon sur une membrane filtrante, qui retient les organismes, et placement de la membrane filtrante dans une boîte de gélose chromogène coliforme.

Incubation de la membrane filtrante à (36 ± 2) °C pendant (21 ± 3) h.

Comptage des colonies positives pour la β -D-galactosidase (couleur rose à rouge) en tant que bactéries coliformes présomptives qui ne sont pas des *E. coli*. Pour éviter les résultats faux-positifs, provoqués par les bactéries positives à l'oxydase, par exemple *Aeromonas* spp, les colonies présomptives doivent être confirmées par une réaction négative à l'oxydase.

Comptage des colonies positives pour la β -D-galactosidase et la β -D-glucuronidase (couleur bleu foncé à violet) en tant qu'*E. coli*.

Les bactéries coliformes totales sont la somme des colonies négatives à l'oxydase de couleur rose à rouge et de toutes les colonies de couleur bleu foncé à violet.

5 Appareillage et verrerie

Matériel de laboratoire de microbiologie habituel, et en particulier:

5.1 Appareil adapté pour la stérilisation à la vapeur (autoclave), conformément aux instructions de l'ISO 8199.

5.2 Incubateur, contrôlé par thermostat à (36 ± 2) °C.

5.3 pH-mètre, avec une exactitude de $\pm 0,1$ unité entre 20 °C et 25 °C.

5.4 Appareil de filtration sur membrane.

5.5 Membranes filtrantes, composées d'esters de cellulose ou d'autres matériaux appropriés, généralement d'environ 47 mm ou 50 mm de diamètre, présentant des caractéristiques de filtration équivalentes à une porosité nominale de 0,45 μ m, munies, de préférence, avec un quadrillage.

Les membranes filtres doivent être exemptes de propriétés susceptibles d'inhiber ou au contraire de favoriser la croissance bactérienne, et l'encre avec laquelle la grille est imprimée ne doit pas affecter la flore bactérienne. Si elles ne sont pas livrées stériles, elles doivent être stérilisées conformément aux instructions du fabricant. Chaque lot de membranes filtrantes doit être soumis à essai conformément à l'ISO 7704 quant à son aptitude à l'essai, étant donné que l'utilisation de différentes marques de membranes filtrantes peut entraîner des différences de récupération et de développement de la coloration.

5.6 Pincés désinfectées, pour la manipulation des membranes filtrantes.

6 Milieux de culture et réactifs

Pour la préparation des milieux de culture et des réactifs, voir l'ISO 8199 et l'ISO 11133. Utiliser des ingrédients de qualité homogène et des produits chimiques de qualité analytique reconnue (voir la Note); suivre les instructions données dans l'Annexe B. Il est également possible d'utiliser des milieux et réactifs disponibles dans le commerce, respectant les compositions données dans l'Annexe B; dans ce cas, suivre scrupuleusement les instructions du fabricant.

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

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

7 Échantillonnage

Prélever les échantillons et les livrer au laboratoire conformément à l'ISO 19458.

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. Les échantillons doivent être transportés et conservés à (5 ± 3) °C conformément à l'ISO 19458. Dans certaines circonstances exceptionnelles, les échantillons peuvent être conservés à (5 ± 3) °C pendant une durée maximale de 24 h avant d'être examinés. Dans ce cas, la durée de conservation doit être indiquée dans le rapport d'essai.

ISO 9308-1:2014

8.2 Filtration <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014>

Filtrer 100 ml (ou d'autres volumes, par exemple 250 ml pour l'eau embouteillée) de l'échantillon à analyser sur une membrane filtrante (5.5). Le volume de filtration minimal est de 10 ml d'échantillon ou de dilutions correspondantes pour garantir une distribution homogène des bactéries sur la membrane filtrante.

8.3 Incubation et différenciation

Après filtration (8.2), placer la membrane filtrante sur la gélose chromogène pour bactéries coliformes (CCA) (B.1) en veillant à ce qu'il n'y ait pas d'air piégé en-dessous, retourner la boîte de Pétri et incubé à (36 ± 2) °C pendant (21 ± 3) h.

Examiner les membranes filtrantes et compter toutes les colonies présentant une réaction β -D-galactosidase positive (couleur rose à rouge) en tant que bactéries coliformes présomptives qui ne sont pas des *E. coli*.

Compter toutes les colonies présentant une réaction β -D-galactosidase positive et une réaction β -D-glucuronidase positive (couleur bleu foncé à violet) en tant qu'*E. coli*.

Pour confirmer les bactéries coliformes présomptives qui ne sont pas des *E. coli*, un essai de recherche de l'oxydase doit être effectué. Réaliser de préférence cet essai sur la totalité ou sur au moins 10 colonies de couleur rose à rouge choisies conformément à l'ISO 8199. Pour cette étape de confirmation, des essais de recherche de l'oxydase¹⁾ appropriés, disponibles dans le commerce, peuvent être utilisés.

1) Pour évaluer les caractéristiques de performance de la gélose chromogène pour bactéries coliformes décrites à l'Annexe C, l'essai de recherche de l'oxydase Bactident® a été utilisé. Bactident® est un exemple de produit approprié disponible dans le commerce. Cette information est donnée par souci de commodité à l'intention des utilisateurs de la présente Norme internationale et ne saurait constituer un engagement de l'ISO à l'égard de ce produit.