



# PROJET DE NORME INTERNATIONALE ISO/DIS 9308-1

ISO/TC 147/SC 4

Secrétariat: DIN

Début de vote  
2012-11-22

Vote clos le  
2013-04-22

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION • МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ • ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION

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

Partie 1:

### Méthode par filtration sur membrane dans des eaux contenant peu de flore bactérienne de fond

*Water quality — Enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria —*

*Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora*

[Révision de la première édition (ISO 9308-1:2000) et de l'ISO 9308-1:2000/Cor.1:2007]

ICS 07.100.20

#### TRAITEMENT PARALLÈLE ISO/CEN

Le présent projet a été élaboré dans le cadre de l'Organisation internationale de normalisation (ISO) et soumis selon le mode de collaboration **sous la direction de l'ISO**, tel que défini dans l'Accord de Vienne.

Le projet est par conséquent soumis en parallèle aux comités membres de l'ISO et aux comités membres du CEN pour enquête de cinq mois.

En cas d'acceptation de ce projet, un projet final, établi sur la base des observations reçues, sera soumis en parallèle à un vote d'approbation de deux mois au sein de l'ISO et à un vote formel au sein du CEN.

**Pour accélérer la distribution, le présent document est distribué tel qu'il est parvenu du secrétariat du comité. Le travail de rédaction et de composition de texte sera effectué au Secrétariat central de l'ISO au stade de publication.**

**To expedite distribution, this document is circulated as received from the committee secretariat. ISO Central Secretariat work of editing and text composition will be undertaken at publication stage.**

CE DOCUMENT EST UN PROJET DIFFUSÉ POUR OBSERVATIONS ET APPROBATION. IL EST DONC SUSCEPTIBLE DE MODIFICATION ET NE PEUT ÊTRE CITE COMME NORME INTERNATIONALE AVANT SA PUBLICATION EN TANT QUE TELLE.

OUTRE LE FAIT D'ÊTRE EXAMINÉS POUR ÉTABLIR S'ILS SONT ACCEPTABLES À DES FINS INDUSTRIELLES, TECHNOLOGIQUES ET COMMERCIALES, AINSI QUE DU POINT DE VUE DES UTILISATEURS, LES PROJETS DE NORMES INTERNATIONALES DOIVENT PARFOIS ÊTRE CONSIDÉRÉS DU POINT DE VUE DE LEUR POSSIBILITÉ DE DEVENIR DES NORMES POUVANT SERVIR DE RÉFÉRENCE DANS LA RÉGLEMENTATION NATIONALE.

LES DESTINATAIRES DU PRÉSENT PROJET SONT INVITÉS À PRÉSENTER, AVEC LEURS OBSERVATIONS, NOTIFICATION DES DROITS DE PROPRIÉTÉ DONT ILS AURAIENT ÉVENTUELLEMENT CONNAISSANCE ET À FOURNIR UNE DOCUMENTATION EXPLICATIVE.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)  
Full standard:  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/649c6728-9364-42e9-b093-7163d0abf5c0/iso-9308-1-2014>

### Notice de droit d'auteur

Ce document de l'ISO est un projet de Norme internationale qui est protégé par les droits d'auteur de l'ISO. Sauf autorisé par les lois en matière de droits d'auteur du pays utilisateur, aucune partie de ce projet ISO ne peut être reproduite, enregistrée dans un système d'extraction ou transmise sous quelque forme que ce soit et par aucun procédé électronique ou mécanique, y compris la photocopie, les enregistrements ou autres, sans autorisation écrite préalable.

Les demandes d'autorisation de reproduction doivent être envoyées 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](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Toute reproduction est soumise au paiement de droits ou à un contrat de licence.

Les contrevenants pourront être poursuivis.

## Sommaire

Page

Avant-propos .....	iv
Introduction.....	v
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Termes et définitions</b> .....	2
4 <b>Principe</b> .....	2
5 <b>Appareillage et verrerie</b> .....	2
6 <b>Milieux de culture et réactifs</b> .....	3
7 <b>Échantillonnage</b> .....	3
8 <b>Mode opératoire</b> .....	3
9 <b>Expression des résultats</b> .....	4
10 <b>Rapport d'essai</b> .....	4
11 <b>Assurance qualité</b> .....	5
<b>Annexe A</b> (informative) <b>Informations microbiologiques complémentaires sur les bactéries coliformes</b> .....	6
<b>Annexe B</b> (normative) <b>Milieux de culture et réactifs</b> .....	7
<b>Annexe C</b> (informative) <b>Caractéristiques de performance</b> .....	9
<b>Bibliographie</b> .....	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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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 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.

L'ISO 9308-1 a été élaborée par le comité technique 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, ainsi que le corrigendum technique 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 ensemencement en milieu liquide*

## Introduction

La présence et l'étendue de la pollution fécale est un facteur important dans l'évaluation de la qualité d'une masse d'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 certaines bactéries 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 ou de la distribution de l'eau.

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
(standards.iteh.ai)

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

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
**(standards.iteh.ai)**

Full standard:  
<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 de la présente partie de l'ISO 9308 connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente norme 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 de la présente norme 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 la présente partie de l'ISO 9308 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* 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 bactéries coliformes et des *E. coli*, 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 80 colonies totales sur le milieu chromogène pour le dénombrement des bactéries coliformes. Ces eaux peuvent être l'eau potable, l'eau de piscine désinfectée ou l'eau propre sortant des usines de traitement.

## 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 5667-1, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1 : Lignes directrices pour la conception des programmes et des techniques d'échantillonnage*

ISO 5667-3, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3 : Lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d'eau*

ISO 7704, *Qualité de l'eau — Validation des membranes filtrantes pour l'analyse microbiologique*

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/CEI Guide 2 s'appliquent.

#### 3.1

##### **bactéries coliformes**

membres de la famille des Entérobactéries qui expriment la  $\beta$ -galactosidase

#### 3.2

##### ***Escherichia coli***

membre de la famille des Entérobactéries qui exprime la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -glucuronidase

### 4 Principe

Filtration d'une prise d'essai de l'échantillon sur une membrane constituée d'esters de cellulose ou équivalents, qui retient les organismes ; placement de la membrane dans une boîte de gélose chromogène.

Incubation de la membrane pendant  $(21 \pm 3)$  h à  $(36 \pm 2)$  °C.

Comptage des colonies positives pour la  $\beta$ -galactosidase (couleur saumon 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, telles qu'*Aeromonas spp.*, les colonies présomptives doivent être confirmées par une réaction négative à l'oxydase.

Comptage des colonies positives pour la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -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 saumon 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 de stérilisation à la vapeur (autoclave).

Tout appareil ou toute verrerie fourni(e) non stérile doit être stérilisé(e) conformément aux instructions de l'ISO 8199.

#### 5.2 Incubateur, contrôlé par thermostat à $(36 \pm 2)$ °C.

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

#### 5.4 Appareil de filtration sur membrane, comme spécifié dans l'ISO 8199.



**5.5 Membranes filtrantes**, composées d'esters de cellulose, généralement d'environ 47 mm ou 50 mm de diamètre, présentant des caractéristiques de filtration équivalentes à une porosité nominale de 0,45 µm, munies, de préférence, d'une grille-repère.

Les filtres doivent être exempts 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 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 filtre peut entraîner des différences de récupération et de développement de la coloration.

**5.6 Pincettes à bouts arrondis pour la manipulation des membranes.**

## 6 Milieux de culture et réactifs

Pour la préparation des milieux de culture et des réactifs, 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.

Sauf spécification contraire, les milieux préparés sont stables pendant au moins un mois, à condition qu'ils soient conservés à l'abri de la lumière à  $(5 \pm 3)$  °C et protégés contre l'évaporation.

## 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  $(5 \pm 3)$  °C conformément à l'ISO 19458. Dans certaines circonstances exceptionnelles, les échantillons peuvent être conservés à  $(5 \pm 3)$  °C pendant une durée maximale de 24 h avant d'être examinés.

### 8.2 Filtration

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).