

---

Norme internationale



6461 / 1

---

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

---

**Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) —  
Partie 1 : Méthode par enrichissement dans un milieu liquide**

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

*Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) — Part 1: Method by enrichment in a liquid medium*

[ISO 6461-1:1986](#)

Première édition — 1986-02-01

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd79ecc1-b175-453e-86bc-57b83440bb26/iso-6461-1-1986>

---

CDU 543.39 : 579.852.13

Réf. n° : ISO 6461/1-1986 (F)

Descripteurs : eau, qualité, essai, analyse microbiologique, détermination, microorganisme, bactérie sulfito-réductrice.

## 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 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.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour approbation, avant leur acceptation comme Normes internationales par le Conseil de l'ISO. Les Normes internationales sont approuvées conformément aux procédures de l'ISO qui requièrent l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

(standards.iteh.ai)

La Norme internationale ISO 6461/1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

[ISO 6461-1:1986](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd79ecc1-b175-453e-86bc-34694f062029/iso-6461-1>

L'attention des utilisateurs est attirée sur le fait que toutes les Normes internationales sont de temps en temps soumises à révision et que toute référence faite à une autre Norme internationale dans le présent document implique qu'il s'agit, sauf indication contraire, de la dernière édition.

# Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) —

## Partie 1 : Méthode par enrichissement dans un milieu liquide

### 0 Introduction

Les spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) sont largement répandues dans l'environnement. Elles sont présentes dans les matières fécales humaines et animales, ainsi que dans les eaux usées et le sol. À la différence des *Escherichia coli* et des autres organismes coliformes, les spores survivent dans l'eau pendant longtemps, car elles sont plus résistantes que les formes végétatives à l'action des facteurs chimiques et physiques. Elles peuvent ainsi fournir des indications sur une pollution éloignée ou intermittente. Elles peuvent même être résistantes à la chloration dans les proportions habituellement utilisées pour le traitement des eaux, et sont donc ainsi utiles pour les besoins des contrôles.

ISO 6461 comprend les parties suivantes :

Partie 1 : Méthode par enrichissement dans un milieu liquide.

Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane.

### 1 Objet

La présente partie de l'ISO 6461 spécifie une méthode pour la recherche et le dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) par enrichissement dans un milieu liquide.

### 2 Domaine d'application

Le principe de la méthode est applicable à tous les types d'eau, y compris les eaux troubles.

### 3 Références

ISO 3696, *Eau à usage de laboratoire — Spécifications*.

ISO 5667, *Qualité de l'eau — Échantillonnage —*

*Partie 2 : Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

*Partie 3 : Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.*

ISO 8199, *Qualité de l'eau — Directives générales pour l'analyse microbiologique par dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.*<sup>1)</sup>

### 4 Définition

Dans le cadre de la présente partie de l'ISO 6461, la définition suivante est applicable.

**clostridia** : Micro-organismes anaérobies formant des spores et sulfito-réducteurs, appartenant à la famille des Bacillacées et au genre *Clostridium*.

### 5 Principe

La recherche des spores d'organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) dans un échantillon d'eau de volume déterminé, passe par les étapes suivantes.

#### 5.1 Sélection des spores

Sélection des spores dans l'échantillon, par chauffage pendant une période de temps suffisante pour que les bactéries végétaives soient détruites.

#### 5.2 Culture par enrichissement

Recherche et énumération des spores des organismes anaérobies sulfito-réducteurs par inoculation de volumes de l'échantillon dans les milieux liquides d'enrichissement, suivie de l'incubation à  $37 \pm 1$  °C pendant  $44 \pm 4$  h dans des conditions anaérobies.

### 6 Milieux de culture et réactifs

#### 6.1 Principaux matériaux

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des diluants et des milieux de culture, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. De la même façon, des préparations commerciales de réactifs peuvent être utilisées. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

1) Actuellement au stade de projet.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture et des réactifs doivent être de qualité analytique reconnue.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai (voir ISO 3696).

Les mesures du pH doivent être effectuées au pH-mètre, et rapportées à la température de 25 °C.

Si les milieux de culture préparés ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent, sauf spécification contraire, être conservés à l'obscurité à environ 4 °C pendant 1 mois au maximum.

## 6.2 Milieux de culture et diluant

### 6.2.1 Diluant

Utiliser un des diluants indiqués dans l'ISO 8199.

### 6.2.2 Milieu renforcé spécial pour les clostridia (DRCM)

#### 6.2.2.1 Milieu de base simple concentration

##### Composition

Viande digérée dans la peptone tryptique	10 g
Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	1,5 g
Amidon	1 g
Acétate de sodium hydraté	5 g
Glucose	1 g
Chlorhydrate de L-cystine	0,5 g
Eau	1 000 ml

##### Préparation

Mélanger la peptone, l'extrait de viande, l'acétate de sodium ainsi que l'extrait de levure à 800 ml d'eau.

Avec les 200 ml d'eau distillée qui restent, préparer une solution d'amidon comme suit: mélanger l'amidon avec un peu d'eau froide de manière à faire une pâte. Chauffer le reste de l'eau jusqu'à ce qu'elle commence à bouillir et l'introduire lentement dans la pâte, tout en agitant constamment.

Ajouter alors cette solution d'amidon au premier mélange et chauffer jusqu'à ce que le point d'ébullition soit atteint et que le mélange se dissolve.

À la fin, ajouter le glucose et le chlorhydrate de L-cystine; dissoudre.

Ajuster le pH en le faisant passer de 7,1 à 7,2 avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l.

Transvaser une aliquote de 25 ml du milieu dans des flacons avec bouchons à vis de 25 ml de capacité. Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 min.

### 6.2.2.2 Milieu de base double concentration

Préparer le milieu de base double concentration comme en 6.2.2.1, mais réduire le volume d'eau distillé de moitié.

Transvaser des aliquotes, respectivement, de 10 ml et de 50 ml du milieu, dans des flacons avec bouchons à vis, de capacités respectivement de 25 ml et 100 ml.

Stériliser à l'autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 min.

### 6.2.3 Sulfite de sodium (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), solution à 4 % (m/m).

Dissoudre 4 g de sulfite de sodium anhydre dans 100 ml d'eau. Stériliser par filtration.

Conserver entre 2 et 5 °C.

Il est conseillé de préparer une nouvelle solution tous les 14 jours.

### 6.2.4 Citrate de fer(III) (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>Fe), solution à 7 % (m/m).

Dissoudre 7 g de citrate de fer(III) dans 100 ml d'eau. Stériliser par filtration.

Conserver entre 2 et 5 °C.

Il est conseillé de préparer une nouvelle solution tous les 14 jours.

### 6.2.5 Milieu complet

6.2.5.1 Le jour de l'analyse, mélanger des volumes égaux des solutions de sulfite de sodium (6.2.3) et de citrate de fer(III) (6.2.4).

6.2.5.2 Ajouter 0,5 ml du mélange (6.2.5.1) dans chaque flacon de milieu de concentration simple (6.2.2.1) qui vient d'être chauffé et refroidi.

6.2.5.3 Ajouter 0,4 ml du mélange (6.2.5.1) à chaque volume de 10 ml et 2 ml du mélange à chaque volume de 50 ml du milieu double concentration, ces volumes étant traités de manière semblable.

## 7 Appareillage et verrerie de laboratoire

Verrerie et matériel de laboratoire couramment employés pour la bactériologie, et

7.1 Flacons ou fioles avec bouchons à vis, en verre ou borosilicaté, de capacités 200; 100 et 25 ml.

7.2 Pipettes volumétriques, de capacités 10 et 1 ml.

7.3 Bains d'eau, contrôlés thermiquement.

7.4 Tubes à essai, de 150 mm × 13 mm.

**7.5 Fil de fer.****7.6 Incubateurs, réglables à  $37 \pm 1$  °C.****8 Échantillonnage**

Se référer à l'ISO 5667/2 et à l'ISO 8199 en ce qui concerne les techniques d'échantillonnage.

**9 Mode opératoire****9.1 Traitement des échantillons**

Se référer à l'ISO 5667/3 et à l'ISO 8199 en ce qui concerne la méthode à suivre pour la conservation et le traitement des échantillons.

**9.2 Sélection des spores (technique)**

Avant qu'il soit procédé à l'essai, l'échantillon d'eau doit être chauffé dans un bain d'eau à  $75 \pm 5$  °C pendant 15 min à partir du moment où cette température a été atteinte. Un flacon similaire contenant le même volume d'eau que celui de l'échantillon pour essai doit être utilisé parallèlement comme témoin afin de vérifier le temps de chauffage nécessaire. La température de l'eau dans le flacon témoin peut être enregistrée de manière permanente à l'aide d'un thermomètre.

**9.3 Inoculation et incubation**

Ajouter 50 ml de l'échantillon (9.2) à un flacon à capuchon à vis contenant 50 ml du milieu double concentration (6.2.5.3).

Ajouter 10 ml de l'échantillon (9.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis de 25 ml contenant 25 ml du milieu double concentration (6.2.5.3).

Ajouter 1 ml de l'échantillon (9.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis de 25 ml contenant 25 ml du milieu simple concentration (6.2.5.2).

Si nécessaire, ajouter 1 ml d'une dilution au 1/10 de l'échantillon (9.2) à une série de cinq flacons à capuchon à vis contenant 25 ml du milieu simple concentration (6.2.5.2).

Afin de procéder à un examen qualitatif de 100 ml d'eau potable ou d'eau en bouteille sans faire un comptage du NPP, utiliser une fiole de 200 ml contenant un mélange de 100 ml du milieu double concentration (6.2.5.3) et de 100 ml de l'échantillon (9.2).

Si nécessaire, remplir tous les flacons avec le milieu simple concentration (6.2.5.2), de façon à amener le liquide au niveau du col et s'assurer qu'il ne reste qu'un très petit volume d'air ; fermer alors les flacons hermétiquement ou incubé dans des conditions anaérobies.

Incuber les flacons inoculés à  $37 \pm 1$  °C pendant  $44 \pm 4$  h.

NOTE — Des volumes importants de bouillon de culture dans des flacons en verre hermétiquement fermés peuvent exploser en raison de la production de gaz. L'addition d'un fil de fer chauffé au rouge et placé dans le milieu avant inoculation peuvent favoriser l'anaérobiose.

**9.4 Interprétation**

Les flacons dans lesquels on observe un noircissement résultant de la réduction du sulfite et de la précipitation du sulfure de fer(II) doivent être considérés comme étant positifs.

**10 Expression des résultats**

Exprimer les résultats en conformité avec l'ISO 8199.

**11 Procès-verbal d'essai**

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et exprimer les résultats obtenus en tant que nombre le plus probable d'organismes anaérobies sulfite-réducteurs (clostridia) par volume d'échantillon. Il doit également mentionner tous détails du mode opératoire non spécifiés dans la présente partie de l'ISO 6461 ou considérés comme facultatifs, ainsi que tout incident susceptible d'avoir influencé les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner toutes les informations nécessaires permettant d'identifier complètement l'échantillon.

Page blanche

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

ISO 6461-1:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd79ecc1-b175-453e-86bc-57b83440bb26/iso-6461-1-1986>

Page blanche

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

ISO 6461-1:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd79ecc1-b175-453e-86bc-57b83440bb26/iso-6461-1-1986>

Page blanche

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

ISO 6461-1:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd79ecc1-b175-453e-86bc-57b83440bb26/iso-6461-1-1986>