

---

Norme internationale



6461/2

---

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 2: Méthode par filtration sur membrane**

iTeh STANDARD PREVIEW  
(standards.iteh.ai)

*Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (clostridia) — Part 2: Method by membrane filtration*

Première édition — 1986-02-01

ISO 6461-2:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0de4141-a1d8-4c38-a40b-df3ee276cccd/iso-6461-2-1986>

---

CDU 543.39 : 579.852.13

Réf. n° : ISO 6461/2-1986 (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.

La Norme internationale ISO 6461/2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

[ISO 6461-2:1986](#)

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 2: Méthode par filtration sur membrane

### 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 de recherche et de dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) par filtration sur membrane.

### 2 Domaine d'application

Le principe de la méthode est applicable à tous les types d'eau, sauf dans le cas où une grande quantité de matières sous forme de particules est susceptible d'être retenue par la membrane.

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

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 et réactions

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 végétatives soient détruites.

#### 5.2 Filtration sur membrane et culture

Filtration de l'échantillon d'eau au travers d'une membrane filtrante dont les pores présentent une dimension telle que les spores des bactéries (0,2 µm) sont retenues à l'intérieur de la membrane filtrante ou sur celle-ci.

Mise en place du filtre sur un milieu de culture spécialement sélectif (sulfite-fer-gélose), suivie de l'incubation à 37 ± 1 °C pendant 20 ± 4 h et 44 ± 4 h, et énumération des colonies noires.

1) Actuellement au stade de projet.

## 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.

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 rapportés 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 Sulfite-fer-gélose

#### 6.2.1 Milieu de base (gélose nutritive)

##### Composition

Extrait de viande	3 g
Peptone	10 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Gélose	15 g
Eau	1 000 ml

##### Préparation

Chauffer à la vapeur pour dissoudre, compléter à 1 litre avec de l'eau, ajuster le pH à  $7,6 \pm 0,1$  avec une solution d'hydroxyde de sodium à 1 mol/l. Stériliser à  $121 \pm 1$  °C à l'autoclave pendant 20 min.

Conservé au réfrigérateur après solidification.

#### 6.2.2 Sulfite de sodium ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), solution.

Dissoudre 10 g de sulfite de sodium dans 100 ml d'eau.

Il est conseillé de préparer une nouvelle solution toutes les deux semaines.

#### 6.2.3 Sulfate de fer(II) ( $\text{FeSO}_4$ ), solution.

Dissoudre 8 g de sulfate de fer(II) cristallisé dans 100 ml d'eau.

#### 6.2.4 Milieu complet

Immédiatement avant de l'utiliser, faire fondre le milieu de base (6.2.1) et, pour chaque volume de 18 ml, ajouter 1 ml de solution de sulfite de sodium (6.2.2) et 5 gouttes de la solution de sulfate de fer(II) (6.2.3).

Ajouter 1 ml de la solution de sulfite de sodium et 5 gouttes de la solution de sulfate de fer(II) dans les tubes de gélose juste avant de procéder à l'ensemencement (voir 9.3).

### 6.3 Tryptose-sulfite-gélose (autre milieu)

##### Composition

Tryptose	15 g
Soiatone	5 g
Extrait de levure	5 g
Métabisulfite de sodium	1 g
Citrate de fer(III) et d'ammonium	1 g
Eau	1 000 ml

##### Préparation

Chauffer à la vapeur pour dissoudre, ajuster le pH à  $7,6 \pm 0,1$  à 25 °C.

Répartir dans les tubes à essai par volumes de 18 ml. Stériliser le milieu pendant 15 min à  $121 \pm 1$  °C.

Conservé au réfrigérateur à 4 à 5 °C.

Jeter le milieu non utilisé deux semaines après sa préparation.

## 7 Appareillage et verrerie de laboratoire

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

**7.1 Ballons et fioles en verre** (fiole Erlenmeyer, ballon à fond rond ou fioles conique), de capacité 2 litres.

**7.2 Tubes à essai**, de 160 mm × 16 mm.

**7.3 Pipettes graduées**, de capacité 10 ml, graduées en 0,1 ml.

**7.4 Pipettes volumétriques**, de capacité 10 ml.

**7.5 Flacons**, de capacité 1 litre.

**7.6 Marmite à vapeur.**

**7.7 Bains d'eau.**

**7.8 Appareil de filtration à membrane.**

**7.9 Membranes filtrantes stériles**, de dimensions nominales des pores 0,2 µm.

NOTE — La qualité des membranes filtrantes peut varier selon le type et même d'un lot à l'autre; il est donc conseillé de vérifier la qualité selon l'ISO 7704.

**7.10 Incubateur**, réglable à  $37 \pm 1$  °C.

**7.11 Boîtes de Petri.**

## 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

Se référer à l'ISO 7704 en ce qui concerne la description générale de la technique de filtration sur membrane.

Conformément aux instructions données dans ce document, filtrer une quantité d'eau appropriée. Pour l'eau potable, l'eau de source et l'eau de puits, les eaux minérales, l'eau de mer et les eaux de surface moins polluées par les clostridia, filtrer 100 ml; pour les eaux très polluées ou pour les eaux d'égoût, utiliser des volumes plus faibles. Les volumes d'eau inférieurs à 10 ml doivent être additionnés de 10 à 100 ml d'eau stérile ou d'un diluant.

Les dilutions doivent être prévues de telle manière que les éventuelles colonies noires apparaissant soient bien séparées et faciles à compter.

Après filtration, enlever la membrane avec des pinces stériles et la placer la face supérieure tournée vers le bas dans le fond d'une boîte de Petri en s'assurant qu'il ne reste pas de bulles d'air prises sous le filtre. Verser ensuite soigneusement 18 ml du milieu de culture entier liquéfié, préalablement refroidi à environ 50 °C, sur la membrane en l'immobilisant avec des pinces stériles. Après que cette couche de milieu se soit déposée, incuber anaérobiquement, ou bien dans d'autres conditions assurant l'anaérobiose, à une température de  $37 \pm 1$  °C dans l'incubateur pendant  $20 \pm 4$  h et  $44 \pm 4$  h. Si l'on utilise un flacon anaérobie ou un incubateur anaérobie, la membrane filtrante peut être placée sur la surface de la gélose la face supérieure tournée vers le haut.

### 9.4 Interprétation

Compter toutes les colonies noires après incubation pendant  $20 \pm 4$  h et  $44 \pm 4$  h.

## 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 en tant que nombre d'organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) par volume d'échantillon. L'énumération après  $44 \pm 4$  h doit habituellement être indiquée. Si cela n'est pas possible, l'énumération après  $20 \pm 4$  h sera indiquée seulement comme valeur approximative.

Le procès-verbal d'essai 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 6461-2:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0de4141-a1d8-4c38-a40b-df3ee276cccd/iso-6461-2-1986>

Page blanche

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

ISO 6461-2:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0de4141-a1d8-4c38-a40b-df3ee276cccd/iso-6461-2-1986>

Page blanche

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

ISO 6461-2:1986

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d0de4141-a1d8-4c38-a40b-df3ee276cccd/iso-6461-2-1986>