

---

---

**Qualité de l'eau — Dénombrement de  
Clostridium perfringens — Méthode  
par filtration sur membrane**

*Water quality — Enumeration of Clostridium perfringens — Method  
using membrane filtration*

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

[ISO 14189:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>



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

ISO 14189:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2013, Publié en Suisse

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  
Ch. de Blandonnet 8 • CP 401  
CH-1214 Vernier, Geneva, Switzerland  
Tel. +41 22 749 01 11  
Fax +41 22 749 09 47  
copyright@iso.org  
www.iso.org

## Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
<b>1</b> <b>Domaine d'application</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b> <b>Références normatives</b> .....	<b>1</b>
<b>3</b> <b>Termes et définitions</b> .....	<b>1</b>
<b>4</b> <b>Principe</b> .....	<b>2</b>
<b>5</b> <b>Appareillage et verrerie</b> .....	<b>2</b>
<b>6</b> <b>Milieux de culture et réactifs</b> .....	<b>3</b>
6.1    Matériaux de base.....	3
6.2    Milieux de culture.....	3
6.2.1    Gélose Tryptose-Sulfite-Cyclosérine (gélose TSC), Références [6][11][12].....	3
6.2.2    Gélose au sang ou base de gélose Columbia ou autre gélose adaptée riche en nutriments.....	3
6.2.3    Réactif de la phosphatase acide.....	3
<b>7</b> <b>Échantillonnage</b> .....	<b>3</b>
<b>8</b> <b>Mode opératoire</b> .....	<b>3</b>
8.1    Transport et stockage de l'échantillon.....	3
8.2    Prétraitement thermique pour la sélection des spores.....	3
8.3    Dilution de l'échantillon.....	4
8.4    Filtration.....	4
8.5    Incubation et examen.....	4
8.6    Confirmation de <i>Clostridium perfringens</i> .....	4
8.6.1    Généralités.....	4
8.6.2    Essai à la phosphatase acide.....	5
8.6.3    Interprétation.....	5
<b>9</b> <b>Expression des résultats</b> .....	<b>5</b>
<b>10</b> <b>Rapport d'essai</b> .....	<b>5</b>
<b>11</b> <b>Assurance de la qualité</b> .....	<b>5</b>
<b>Annexe A (normative) Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs</b> .....	<b>7</b>
<b>Annexe B (informative) Données de performance</b> .....	<b>9</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>12</b>

## 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](http://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](http://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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: [www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos.html)

Le présent document a été élaboré par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

## Introduction

Les bactéries *Clostridium perfringens* sont largement reconnues comme étant un précieux indicateur de pollution fécale. Dans le tractus intestinal des animaux et de l'homme, ces bactéries Gram positives forment des spores qui, contrairement aux cellules végétatives, sont résistantes à la chaleur. Dans les intestins, *C. perfringens* est présent sous forme de spores et de cellules végétatives, lesquelles se retrouvent également dans les échantillons environnementaux. Les spores de *C. perfringens* survivent dans l'eau pendant des mois, ce qui est nettement plus long que les bactéries végétatives indicatrices d'une contamination fécale et, par conséquent, la présence de ces spores peut indiquer une pollution fécale éloignée ou intermittente. La surveillance de *C. perfringens* s'est avérée utile pour évaluer la qualité des ressources en eau et contrôler les phases du traitement de l'eau afin d'en évaluer les performances. Les spores ne sont pas toujours inactivées par les modes opératoires de désinfection de routine (chloration, par exemple).

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

[ISO 14189:2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>

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

ISO 14189:2013

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>

# Qualité de l'eau — Dénombrement de *Clostridium perfringens* — Méthode par filtration sur membrane

**AVERTISSEMENT** — Il convient que les utilisateurs du présent document maîtrisent les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document ne prétend pas couvrir tous les problèmes de sécurité potentiels associés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur d'établir les pratiques de sécurité et de santé appropriées et d'assurer la conformité aux réglementations nationales.

**IMPORTANT** — Il est absolument indispensable que les essais menés conformément au présent document le soient par du personnel dûment qualifié.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode pour le dénombrement des cellules végétatives et des spores de *Clostridium perfringens* par filtration sur membrane dans des échantillons d'eau destinée à la consommation humaine. Cette méthode peut toutefois s'appliquer à tous les types d'échantillons d'eau, sous réserve qu'ils ne contiennent pas de matière particulaire ou colloïdale interférant avec la filtration.

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

ISO/TS 11133-1, *Microbiologie des aliments — Lignes directrices pour la préparation et la production des milieux de culture — Partie 1: Lignes directrices générales d'assurance qualité pour la préparation des milieux de culture en laboratoire*

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

Guide ISO/IEC 2:2004, *Normalisation et activités connexes — Vocabulaire général*

## 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions donnés dans le Guide ISO/IEC 2 ainsi que les suivants s'appliquent.

### 3.1

#### ***Clostridium perfringens* présomptives**

bactéries qui produisent toutes les nuances de colonies noires ou grises à jaunes-brunes sur la gélose Tryptose-Sulfite-Cyclosérine, même si la coloration est légère, après incubation anaérobie à  $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$  pendant  $(21 \pm 3)$  h

Note 1 à l'article: à l'Article Contrairement aux colonies qui se développent directement sur le milieu gélosé, les colonies sur la membrane ne présentent pas toujours un noircissement distinct et, de ce fait, les colonies légèrement colorées sont incluses dans le dénombrement.

### 3.2

#### ***Clostridium perfringens* confirmées**

bactéries qui produisent des colonies caractéristiques sur la gélose Tryptose-Sulfite-Cyclosérine et possèdent l'enzyme phosphatase acide

## 4 Principe

Un volume mesuré de l'échantillon, ou une dilution de ce dernier, est filtré à travers une membrane ayant des pores de 0,45 µm, cette dimension étant suffisante pour retenir les spores de clostridia. La membrane est incubée sur une gélose sélective/différentielle (gélose Tryptose-Sulfite-Cyclosérine) en anaérobiose à  $(44 \pm 1)$  °C pendant  $(21 \pm 3)$  h. Les *C. perfringens* produisent généralement des colonies de couleur noire ou grise à jaune-brune suite à la réduction du sulfite en sulfure qui réagit avec un sel ferrique présent dans le milieu. Les colonies caractéristiques sont dénombrées et des essais de confirmation réalisés. Le résultat calculé est exprimé en unités formant colonie par volume d'échantillon. Si seul un dénombrement de spores est requis, l'échantillon est d'abord soumis à un prétraitement à  $(60 \pm 2)$  °C afin d'inactiver les bactéries végétatives.

NOTE 1 Le milieu contient de la cyclosérine comme agent sélectif pour inhiber les espèces de *Bacillus*.

NOTE 2 L'incubation à 44 °C augmente la sélectivité de l'essai pour *C. perfringens*.

## 5 Appareillage et verrerie

Hormis la verrerie ou le matériel en plastique à usage unique qui est fourni stérile, stériliser la verrerie tel que spécifié dans l'ISO 8199.

Utiliser un équipement de microbiologie courant et, en particulier:

**5.1 Appareillage de filtration sur membrane**, tel que spécifié dans l'ISO 8199.  
ISO 14189:2013  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>

**5.2 Entonnoirs de filtration stériles**

Utiliser des entonnoirs stériles à usage unique ou stérilisés conformément à l'ISO 8199. Alternativement, flamber les entonnoirs métalliques avant de les utiliser.

NOTE Pour cette méthode, une désinfection des entonnoirs par ébullition n'est pas suffisante.

**5.3 Membranes filtrantes stériles**, ayant des pores de dimension nominale 0,45 µm.

La qualité des membranes filtrantes peut varier d'un fournisseur à l'autre, voire d'un lot à un autre. Il est donc conseillé de vérifier régulièrement la qualité des membranes.

**5.4 Étuves thermostatées**, pouvant être maintenues à  $(36 \pm 2)$  °C et  $(44 \pm 1)$  °C.

**5.5 Bain d'eau (facultatif)**, pouvant être maintenu à  $(60 \pm 2)$  °C et équipé d'un système de circulation d'eau.

**5.6 Autoclave**, pouvant être maintenu à  $(121 \pm 3)$  °C.

**5.7 Pince stérile**

**5.8 Jarres anaérobies**, ou équipement similaire.

**5.9 Système générateur de gaz anaérobie**, pour produire une atmosphère contenant approximativement 90 % d'hydrogène et 10 % de dioxyde de carbone.



## 6 Milieux de culture et réactifs

### 6.1 Matériaux de base

Pour l'uniformité des résultats, les constituants utilisés dans la préparation des milieux doivent être de qualité uniforme et les produits chimiques de qualité analytique reconnue. Pour la préparation des milieux, utiliser de l'eau distillée dans une verrerie ou de l'eau déionisée de pureté équivalente, tel que spécifié dans l'ISO 3696[1] pour une eau de qualité 3.

Il est également possible d'utiliser un milieu complet déshydraté et des réactifs disponibles dans le commerce, préparés et utilisés conformément aux instructions du fabricant.

D'autres qualités de produits chimiques peuvent être utilisées, sous réserve de démontrer qu'elles conduisent aux mêmes résultats.

### 6.2 Milieux de culture

Voir [Annexe A](#).

#### 6.2.1 Gélose Tryptose-Sulfite-Cyclosérine (gélose TSC), Références [6][11][12]

Voir [A.1](#).

#### 6.2.2 Gélose au sang ou base de gélose Columbia ou autre gélose adaptée riche en nutriments

Voir [A.2](#).

#### 6.2.3 Réactif de la phosphatase acide

Voir [A.3](#).

ISO 14189:2013  
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013>

## 7 Échantillonnage

Procéder à l'échantillonnage tel que spécifié dans l'ISO 19458.

## 8 Mode opératoire

### 8.1 Transport et stockage de l'échantillon

Débuter l'examen dès que possible après le prélèvement de l'échantillon, de préférence le même jour. Il convient de refroidir les échantillons pendant le transport, idéalement à  $(5 \pm 3)$  °C. La durée de stockage maximale recommandée pour l'échantillon, transport inclus, est de 12 h pour les bactéries végétatives et de 24 h pour les spores. La durée de stockage de l'échantillon, transport inclus, ne doit pas dépasser 18 h pour les bactéries végétatives et 72 h pour les spores.

### 8.2 Prétraitement thermique pour la sélection des spores

Si seul un dénombrement de spores est souhaité, bien homogénéiser l'échantillon puis le chauffer à  $(60 \pm 2)$  °C dans un bain d'eau pendant  $(15 \pm 1)$  min. Il convient que le volume chauffé soit supérieur à celui à analyser. Il est recommandé de surveiller la température en plaçant un thermomètre adapté dans un flacon de référence de taille identique au flacon d'échantillon et contenant le même volume d'eau à la même température initiale que l'échantillon en cours de traitement. Le temps requis pour atteindre  $(60 \pm 2)$  °C ne doit pas dépasser 15 min et peut être réduit en assurant une circulation d'eau dans le bain afin d'optimiser l'échange thermique.

### 8.3 Dilution de l'échantillon

Il convient de choisir un volume d'essai de l'échantillon ou une dilution de ce dernier - après le traitement thermique si requis - de manière à obtenir, si possible, entre 10 et 80 colonies sur une membrane de 47 mm à 50 mm de diamètre. Il est recommandé de préparer les volumes d'essai ou les dilutions conformément à la description de l'ISO 8199.

### 8.4 Filtration

Pour obtenir une description générale de la méthode de filtration sur membrane, voir l'ISO 8199.

Filtrer un volume d'eau mesuré. Il convient d'adapter le volume au type d'eau en cours d'analyse. Pour les eaux destinées à la consommation humaine, un volume de 100 ml est généralement filtré. Enregistrer le volume filtré.

Après la filtration, placer la membrane face quadrillée vers le haut sur une boîte de gélose TSC, en vérifiant qu'aucune bulle d'air n'est piégée sous le filtre.

NOTE Il est également possible de recouvrir le filtre d'une mince couche (5 ml à 10 ml environ versés dans une boîte de Petri de 90 mm de diamètre) de gélose TSC fondue (maintenue dans un bain d'eau à  $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ ). Laisser solidifier avant l'incubation anaérobie. Ce mode opératoire peut améliorer le noircissement des colonies. Il n'est pas nécessaire d'ajouter de la cyclosérine dans la gélose TSC pour le recouvrement. Cependant, l'obtention de cultures pures pour l'essai de confirmation peut s'avérer plus laborieuse.

Comme les spores de *C. perfringens* sont plus résistantes à la chaleur, des entonnoirs stériles doivent être utilisés (5.2). L'utilisation d'un bain d'eau en ébullition entre les échantillons peut s'avérer insuffisante pour inactiver les spores. Le passage des entonnoirs métalliques à la flamme est jugé acceptable. Pour différents volumes d'un même échantillon, l'entonnoir peut être réutilisé sous réserve que les volumes les moins importants de l'échantillon soient filtrés en premier.

### 8.5 Incubation et examen

ISO 14189:2013

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013)

[57638cb653f4/iso-14189-2013](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/a29c62e8-a222-4951-a332-57638cb653f4/iso-14189-2013)

Il convient que le laps de temps entre le dépôt de la membrane sur la gélose TSC et le début de l'incubation soit aussi court que possible et ne doit pas dépasser 1 h.

Incuber les boîtes avec les filtres, en anaérobiose à  $(44 \pm 1)^\circ\text{C}$  pendant  $(21 \pm 3)$  h en les retournant afin d'éviter les interférences dues à la condensation de l'eau.

Après l'incubation, dénombrer les *C. perfringens* présomptives en comptant toutes les colonies qui présentent une coloration noire ou grise à jaune-brune, même si la coloration est légère, du milieu TSC observées par le dessus ou le dessous de la membrane filtrante.

Comme la couleur noire des colonies perd rapidement son intensité et finit par disparaître, les boîtes doivent être dénombrées dans les 30 min après la fin de l'incubation en anaérobiose. Si plusieurs jarres anaérobies sont utilisées, il convient de contrôler les boîtes jarre par jarre ou par fraction si l'incubation a été réalisée dans une étuve thermostatée anaérobie.

### 8.6 Confirmation de *Clostridium perfringens*

#### 8.6.1 Généralités

Pour les méthodes de filtration sur membrane utilisées pour l'analyse de l'eau, il est recommandé, pour les dénombrements de 1 à 10 colonies, de soumettre à confirmation toutes les colonies et, pour les dénombrements supérieurs à 10 colonies, au moins 10 colonies prises au hasard.

Pour la confirmation, repiquer sur des boîtes de gélose au sang, toutes les colonies pour les dénombrements de 1 à 10 colonies, et au moins 10 colonies prises au hasard pour les dénombrements supérieurs à 10 colonies. Si ce repiquage n'est pas réalisable, toutes les colonies typiques doivent être examinées à partir d'une sous-zone de la membrane.

Si aucune gélose au sang n'est disponible, une gélose à base Columbia ou une autre gélose riche en nutriments (par exemple gélose tryptone soja) peut être utilisée en sous-culture.

Incuber en anaérobiose dans une étuve thermostatée à  $(36 \pm 2)$  °C pendant  $(21 \pm 3)$  h.

### 8.6.2 Essai à la phosphatase acide

Les colonies se développant en anaérobiose sur des boîtes de gélose au sang ou de gélose riches en nutriments sont étalées sur un papier filtre et 2 à 3 gouttes de réactif de la phosphatase acide sont placées sur les colonies. Une couleur violacée développée dans les 3 à 4 min est considérée comme une réaction positive.

### 8.6.3 Interprétation

*C. perfringens* produit des colonies de couleur noire ou grise à jaune-brune sur la gélose TSC, même si la coloration est légère, et possède la phosphatase acide.

## 9 Expression des résultats

À partir des nombres des colonies totales et confirmées, calculer les nombres de *C. perfringens* présumptives et de *C. perfringens* ainsi que le nombre de spores, le cas échéant, présents dans 100 ml du volume filtré conformément à l'ISO 8199.

Si requis, il convient d'évaluer la variabilité des résultats de l'essai conformément à l'ISO 29201[3].

## 10 Rapport d'essai (standards.iteh.ai)

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:

- la méthode d'essai utilisée, avec une référence à la présente Norme internationale (ISO 14189:2013);
- toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- le nombre de colonies de *C. perfringens* présumptives (facultatif, selon l'objectif de l'examen);
- le nombre de colonies de *C. perfringens* confirmées;
- une information indiquant si le résultat représente le nombre total de *C. perfringens* (cellules végétatives et spores) ou uniquement les spores;
- tout événement particulier observé pendant l'analyse et toute opération non spécifiée dans cette méthode, ayant pu influencer sur les résultats.

## 11 Assurance de la qualité

Le laboratoire doit mettre en œuvre un système de maîtrise de la qualité clairement défini afin de garantir que l'appareillage, les réactifs et les techniques sont adaptés à l'essai. L'utilisation de témoins positifs, de témoins négatifs et de blancs entre dans le cadre de l'essai.

L'ISO/TS 11133-1 décrit un contrôle qualité de milieu. Une suspension de *C. perfringens* est utilisée pour le contrôle qualité du processus quantitatif. Sélectionner le volume filtré de manière à obtenir entre 10 ufc et 80 ufc et traiter le témoin comme un échantillon. Comparer le rendement à celui obtenu sur une gélose non sélective telle que la gélose au sang. Des matériaux de référence peuvent également être utilisés à la place de la suspension de *C. perfringens*.

NOTE Étant donné que le milieu doit être utilisé aussi frais que possible, il est admis d'effectuer le contrôle du milieu et des échantillons simultanément et parallèlement à l'analyse des échantillons.