NORME INTERNATIONALE

ISO 14189

Première édition
2013-11-01

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

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

Numéro de référence
ISO 14189:2013(F)

© ISO 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**
1 Domaine d'application **1**
2 Références normatives **1**
3 Termes et définitions **1**
4 Principe **2**
5 Appareillage et verrerie **2**
6 Milieux de culture et réactifs **3**
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
7 Échantillonnage **3**
8 Mode opératoire **3**
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 ***Clostridium perfringens*** ***4***
8.6.1 Généralités 4
8.6.2 Essai à la phosphatase acide 5
8.6.3 Interprétation 5
9 Expression des résultats **5**
10 Rapport d'essai **5**
11 Assurance de la qualité **5**
Annexe A (normative) **Composition et préparation des milieux de culture et des réactifs** **7**
Annexe B (informative) **Données de performance** **9**
Bibliographie **12**

© ISO 2013 – Tous droits réservés

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'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir le lien suivant: 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*.

© ISO 2013 – Tous droits réservés

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).

© ISO 2013 – Tous droits réservés

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 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 ± 1) °C pendant (21 ± 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.

© ISO 2013 – Tous droits réservés

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 ± 1) °C pendant (21 ± 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 ± 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.

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 ± 2) °C et (44 ± 1) °C.

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

5.6 Autoclave, pouvant être maintenu à (121 ± 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.

© ISO 2013 – Tous droits réservés