

Essais des eaux

Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium* sulfito-réducteurs**Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds**

E : Testing water — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobies and of sulfite-reducing *Clostridia* — General method by the standing tube technique

D : Wasseruntersuchungen — Nachweis und Bestimmung von sulfit-reduzierender Anaerobier- und *Clostridien* Sporenbildender — Verfahren durch Eingliederung

Norme française homologuée par décision du Directeur Général de l'afnor le 5 septembre 1985 pour prendre effet le 5 octobre 1985.

correspondance Absence de norme internationale sur le même sujet à la date de publication de la présente norme.

analyse La présente norme décrit une méthode générale pour la recherche et le dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium* sulfito-réducteurs. Elle a été conçue pour servir de référence dans certaines normes françaises pour l'analyse microbiologique de types d'eaux particuliers (eaux potables, eaux de surface, eaux de baignade, etc.) actuellement en cours d'élaboration à l'afnor. En conséquence, son application directe en dehors de ces usages prévus implique de vérifier qu'elle est adaptée au type d'eau analysé et à la précision recherchée, et, d'indiquer quelles options ou modifications sont adoptées dans ce but.

descripteurs **Thesaurus International Technique** : protection de l'environnement, essai des eaux, analyse microbiologique, eau d'alimentation humaine, eau de surface, comptage des bactéries, bactérie sulfito-réductrice, *Clostridium*.

modifications

corrections

Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium* sulfito-réducteurs

Octobre 1985

Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds

AVANT-PROPOS

La présente norme a été élaborée par la commission de normalisation de l'afnor « Essais des eaux — Microbiologie ».

La méthode par incorporation en gélose qu'elle décrit ne fait pas l'objet de travaux à l'ISO/TC 147 « Qualité de l'eau ». Les travaux en cours sur le même sujet au sein de l'Organisation Internationale de Normalisation (ISO) portent sur la normalisation de méthodes par filtration sur membrane et par ensemencement en milieu liquide.

0 INTRODUCTION

La recherche et le dénombrement d'un certain nombre de bactéries sulfito-réductrices, ou de leur seule forme sporulée, permettent d'obtenir des indications très variées sur la qualité des eaux et leurs aptitudes à diverses utilisations. La méthode décrite dans la présente norme peut permettre de contrôler l'efficacité d'une filtration (naturelle ou mise en œuvre dans un traitement), d'apprécier l'état de propreté d'un réseau, d'envisager l'éventualité (mais non la certitude) d'une pollution fécale, notamment ancienne, ou encore d'amorcer la recherche de certaines espèces constituant plus particulièrement des nuisances pour la santé des consommateurs de produits alimentaires fabriqués avec l'eau étudiée.

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme a pour objet de décrire :

- une méthode générale permettant la détection et le dénombrement, dans un volume réduit d'eau (ne dépassant pas quelques dizaines de millilitres), des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices (voir chapitre 7),
- une méthode générale permettant la détection et le dénombrement des spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs (voir chapitre 8).

Les méthodes décrites aux chapitres 7 et 8 sont applicables aux différents types d'eau, notamment dans le cas où une prise d'essai de grand volume n'est pas nécessaire.

2 DÉFINITIONS

Pour les besoins de la présente norme, les définitions suivantes sont adoptées :

2.1 Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices : formes de résistance de micro-organismes se développant en anaérobiose à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ en 24 h et/ou 48 h en gélose viande-foie en donnant des colonies typiques réduisant le sulfite de sodium.

2.2 Spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs : spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices en bacilles, à Gram positif, ne possédant pas de catalase et ayant l'aspect morphologique des *Clostridium*.

3 PRINCIPE

3.1 Détection et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices

Incorporation d'un échantillon d'eau, après destruction des formes végétatives des bactéries par un chauffage approprié, dans un milieu de culture, contenant du sulfite de sodium et des sels de fer. Dénombrement, après incubation pendant 24 h et/ou 48 h à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, sous anaérobiose, des colonies entourées d'un halo noir.

3.2 Détection et dénombrement des spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs

Caractérisation des *Clostridium* parmi les colonies isolées précédemment, ou obtenues sur un milieu sélectif spécifié selon la même technique qu'en 3.1.

4 ÉCHANTILLONNAGE

Les échantillons doivent être prélevés dans des récipients stériles avec toutes les précautions d'asepsie nécessaires. Ils doivent être maintenus à une température comprise entre 1 °C et 4 °C dès leur prélèvement. Ils doivent être remis le jour même au laboratoire chargé des analyses. En l'absence de prescription particulière, l'ensemencement doit être réalisé le plus tôt possible. Le délai maximal entre le prélèvement et l'ensemencement peut être précisé par les normes spécifiques au type d'eau à analyser.

Dans le cas d'échantillons provenant d'eaux chlorées, bromées ou ozonées, le récipient collecteur doit de plus contenir du thiosulfate de sodium en quantité suffisante pour neutraliser les oxydants, introduit stérilement après stérilisation du flacon, ou préalablement à celle-ci mais en tenant compte des pertes par oxydation.

5 APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et notamment :

5.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)

À l'exclusion du matériel livré stérile, particulièrement celui en plastique, la verrerie doit être stérilisée :

- soit au four, en la maintenant à une température comprise entre 170 °C et 175 °C pendant au moins 1 h,
- soit à l'autoclave, en la maintenant à une température de $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant au moins 20 min.

5.2 Bain d'eau réglé à $80\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$.

5.3 Étuve ou enceinte thermostatée réglée à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

5.4 Jarres pour anaérobiose ou autre appareillage approprié pour la culture en anaérobiose.

5.5 pH-mètre.

5.6 Anses bouclées, en platine iridié ou en métal nickel-chrome, ou pipettes Pasteur.