

NORME  
INTERNATIONALE

**ISO**  
**6340**

Première édition  
1995-12-01

---

---

**Qualité de l'eau — Recherche de  
*Salmonella***

**iTeh STANDARD PREVIEW**  
*Water quality — Detection of Salmonella species*  
**(standards.iteh.ai)**

[ISO 6340:1995](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f6649-eaba-4900-a749-8c23b9533d9b/iso-6340-1995>



Numéro de référence  
ISO 6340:1995(F)

## 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 (CEI) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les projets de Normes internationales adoptés par les comités techniques sont soumis aux comités membres pour vote. Leur publication comme Normes internationales requiert l'approbation de 75 % au moins des comités membres votants.

La Norme internationale ISO 6340 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f6649-eaba-4900-a749->

Les annexes A et B de la présente Norme internationale sont données uniquement à titre d'information.

© ISO 1995

Droits de reproduction réservés. Sauf prescription différente, 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 et les microfilms, sans l'accord écrit de l'éditeur.

Organisation internationale de normalisation  
Case Postale 56 • CH-1211 Genève 20 • Suisse

Imprimé en Suisse

## Introduction

Les *Salmonella* sont des bactéries qui sont largement répandues à travers le monde. Les *Salmonella* sont en général considérées comme pathogènes bien que leur virulence et leur pouvoir pathogène varient énormément. Les hôtes naturels des *Salmonella* sont la population humaine, le bétail, les animaux domestiques, ainsi que les animaux sauvages, y compris les oiseaux. Êtres humains et animaux peuvent excréter des *Salmonella* tout en étant des porteurs asymptomatiques, de même qu'en cas de maladies. Par conséquent, il est impossible de les éliminer de l'environnement. Étant donné les affections graves qui peuvent résulter de l'infection des êtres humains, la transmission des *Salmonella* par l'intermédiaire de différents vecteurs doit être réduite.

Dans la mesure où l'eau fait partie de ces vecteurs, il convient de contrôler la présence ou l'absence de *Salmonella* dans l'eau. Les *Salmonella* peuvent être présentes dans les eaux usées agricoles et domestiques, les eaux douces, y compris les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux souterraines, ainsi que dans les eaux de mer.

La recherche de *Salmonella* dans l'eau requiert habituellement une étape de concentration. Dans la mesure où les *Salmonella* peuvent avoir subi une altération dans l'environnement aqueux, leur recherche dans l'eau nécessite habituellement une étape de préenrichissement. Le mode opératoire décrit dans la présente Norme internationale consiste en des phases régulières d'enrichissement(s), de sélection et de confirmation.

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

ISO 6340:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/cd4f6649-eaba-4900-a749-8c23b9533d9b/iso-6340-1995>

# Qualité de l'eau — Recherche de *Salmonella*

**AVERTISSEMENT** — Afin de préserver la santé du personnel de laboratoire, il est essentiel d'effectuer les essais de recherche de *Salmonella* dans des laboratoires correctement équipés, uniquement sous la direction de microbiologistes compétents, et de faire très attention à l'élimination de toutes les substances incubées.

## 1 Domaine d'application

La présente Norme internationale prescrit une méthode pour la recherche de *Salmonella* dans des échantillons d'eau à des fins de contrôle. Dans certaines situations épidémiologiques, il peut être nécessaire d'utiliser des milieux supplémentaires.

La méthode peut être applicable à tous les types d'eaux, excepté les eaux usées brutes.

ISO 5667-3:1994, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3: Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.*

ISO 6579:1993, *Microbiologie — Directives générales concernant les méthodes de recherche des *Salmonella*.*

## 2 Références normatives

Les normes suivantes contiennent des dispositions qui, par suite de la référence qui en est faite, constituent des dispositions valables pour la présente Norme internationale. Au moment de la publication, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur la présente Norme internationale sont invitées à rechercher la possibilité d'appliquer les éditions les plus récentes des normes indiquées ci-après. Les membres de la CEI et de l'ISO possèdent le registre des Normes internationales en vigueur à un moment donné.

ISO 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai.*

ISO 5667-1:1980, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1: Guide général pour l'établissement des programmes d'échantillonnage.*

ISO 5667-2:1991, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

## 3 Définitions

Pour les besoins de la présente Norme internationale, les définitions suivantes s'appliquent.

**3.1 *Salmonella*:** Bactéries Gram-négatives, oxydase négatives, anaérobies facultatives, ne formant pas de spore, en forme de bâtonnet, qui forment généralement des colonies typiques sur milieu sélectif solide d'un diamètre compris entre 2 mm et 4 mm. Elles présentent les caractéristiques biochimiques et sérologiques décrites lorsque les essais sont effectués conformément à la présente Norme internationale.

**3.2 recherche de *Salmonella*:** Mise en évidence de la présence de ces bactéries dans un volume particulier, lorsque des essais sont effectués conformément à la présente Norme internationale.

## 4 Principe

La recherche de *Salmonella* nécessite quatre phases successives.

#### 4.1 Préenrichissement

Un préenrichissement est nécessaire pour permettre aux cellules ayant subi une altération de croître. Si nécessaire, les échantillons peuvent être concentrés par filtration sur membrane. La membrane filtrante ensemencée, ou un volume connu de l'échantillon ou de sa dilution, est transféré dans un bouillon non sélectif (eau peptonée tamponnée) pour incubation à la température optimale pour les bactéries mésophiles.

#### 4.2 Enrichissement sur milieu sélectif liquide

Une phase d'enrichissement sélectif est nécessaire pour augmenter la proportion de *Salmonella* par rapport à la flore interférente. Dans ce but, un inoculum provenant du bouillon de préenrichissement est ensemencé sur milieu au vert malachite et au chlorure de magnésium (Rappaport-Vassiliadis modifié), et incubé à température élevée pour augmenter la sélectivité.

NOTE 1 Pour la recherche de *Salmonella typhi*, qui n'est généralement pas importante pour le contrôle de la qualité de l'eau, mais qui peut être rendue nécessaire dans des circonstances particulières, un milieu à la sélénite-cystine (disponible également sous forme de milieu complet déshydraté auprès de différents fabricants) peut être utilisé, en incubant les cultures à  $36\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  pendant une période allant jusqu'à 24 h. Pour certaines situations épidémiologiques particulières, il peut être nécessaire d'utiliser d'autres milieux.

#### 4.3 Sélection sur milieux gélosés

Des milieux sélectifs solides sont utilisés après les phases d'enrichissement pour la recherche et l'isolement des *Salmonella*. Afin d'accroître la probabilité de détecter des *Salmonella*, au moins deux milieux différents sont ensemencés à partir des cultures en milieu sélectif d'enrichissement:

- la gélose lactosée au rouge de phénol et au vert brillant;
- la gélose lysine xylose désoxycholate;
- la gélose au sulfite de bismuth (facultatif).

#### 4.4 Confirmation

La présence de colonies typiques de *Salmonella* sur milieux gélosés sélectifs n'est pas une preuve suffisante de la présence de *Salmonella*. En conséquence, il est nécessaire de repiquer les colonies présumées de *Salmonella* sur différents milieux pour confirmation biochimique et sérologique (voir tableau 1).

NOTE 2 Des kits d'identification disponibles dans le commerce, convenant pour l'identification des *Salmonella* peuvent être utilisés au lieu des essais figurant dans le tableau 1, sous réserve qu'ils soient utilisés conformément aux instructions du fabricant et qu'ils soient considérés comme au moins aussi fiables que les essais indiqués dans le tableau 1.

### 5 Milieux de culture et milieux de confirmation

Sauf indication contraire, utiliser des réactifs de qualité analytique pour la préparation des milieux de culture. Préparer les milieux en utilisant de l'eau distillée ou de l'eau de pureté équivalente, conforme à la qualité 3 de l'ISO 3696.

Lorsque des milieux déshydratés disponibles dans le commerce sont utilisés, les préparer conformément aux instructions du fabricant et ajouter les agents sélectifs, en tant que suppléments, afin d'obtenir les concentrations requises.

Toutes les valeurs de pH données dans la présente Norme internationale sont données pour les milieux après stérilisation; pour la correction du pH, utiliser de l'hydroxyde de sodium ou de l'acide chlorhydrique à 1 mol/l chacune.

#### 5.1 Milieux de culture

##### 5.1.1 Milieu de préenrichissement: eau peptonée tamponnée

###### 5.1.1.1 Composition

	Concentration simple	Concentration double
Peptone	10 g	20 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g	10 g
Hydrogénophosphate disodique dodécahydraté (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O)	9 g	18 g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,5 g	3 g
Eau, q.s.p.	1 000 ml	1 000 ml

###### 5.1.1.2 Préparation

Dissoudre tous les composants dans de l'eau en chauffant doucement, sans porter à ébullition.

Ajuster le pH à  $7,2 \pm 0,1$  avec une solution d'hydroxyde de sodium ou avec de l'acide chlorhydrique.

Répartir le milieu dans des flacons ou des tubes de culture.

Stériliser le milieu à l'autoclave (6.1.2) à  $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 15 min.

Conserver au réfrigérateur pendant une période maximale de 3 mois.

### 5.1.2 Milieu d'enrichissement: milieu au vert malachite et au chlorure de magnésium (milieu de Rappaport-Vassiliadis modifié)

#### 5.1.2.1 Composition

Milieu de base	
Peptone, hydrolysats enzymatique de tissu animal	4 g
Peptone papaïnique	1 g
Chlorure de sodium (NaCl)	8 g
Hydrogénophosphate de potassium trihydraté ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )	0,4 g
Dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	0,6 g
Eau, q.s.p.	1 000 ml

#### Supplément 1 <sup>1)</sup>

Chlorure de magnésium hexahydraté ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	31,7 g
Eau, q.s.p.	100 ml

1) Étant donné que ce sel est très hygroscopique, il est recommandé de le conserver dans un dessiccateur ou de dissoudre le contenu total provenant d'un récipient de chlorure de magnésium ayant été ouvert récemment, de manière à ce que la concentration en masse du chlorure de magnésium hexahydraté soit de 28,6 g/l dans le milieu final. La solution de chlorure de magnésium peut être conservée longtemps dans un récipient fermé.

#### Supplément 2

Oxalate de vert malachite	0,4 g
Eau, q.s.p.	100 ml

#### 5.1.2.2 Préparation

Dissoudre tous les composants du milieu de base dans de l'eau en chauffant doucement, sans porter à ébullition.

Ajouter la solution de chlorure de magnésium préparée (supplément 1) et 10 ml de solution au vert malachite (supplément 2) au milieu de base.

Ajuster le pH à  $5,2 \pm 0,1$  avec une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique.

Répartir environ 10 ml du milieu dans chaque tube de culture.

Stériliser le milieu à l'autoclave (6.1.2) à  $115\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 15 min.

### 5.1.3 Milieu d'enrichissement facultatif: milieu à la sélénite-cystine

#### 5.1.3.1 Composition

Peptone de caséine	5 g
L-Cystine	0,01 g
Lactose	4 g
Hydrogénophosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	10 g
Hydrogénosélénite de sodium ( $\text{NaHSeO}_3$ )	4 g
Eau, q.s.p.	1 000 ml

#### 5.1.3.2 Préparation

Dissoudre tous les composants dans de l'eau en chauffant doucement, sans porter à ébullition.

**ATTENTION — Ne pas stériliser le milieu à l'autoclave. Procéder à la place à une filtration stérilisante; et ne pas utiliser ce milieu en cas d'apparition de sédiments rouges.**

Ajuster le pH à  $7,0 \pm 0,2$ .

**AVERTISSEMENT — L'inhalation de poussières d'hydrogénosélénite de sodium et le contact avec la peau sont très dangereux. Les poussières irritent les yeux, la peau et les membranes muqueuses et l'hydrogénosélénite de sodium peut pénétrer la peau à la fois sous forme de poudre ou en solution. Il provoque des effets sur la santé à long terme et peut être cancérigène. Les réactions avec des acides libèrent de l'hydruure de sélénium gazeux, qui est très dangereux s'il est inhalé et irrite les yeux et les membranes muqueuses. L'hydrogénosélénite de sodium et ses solutions doivent être manipulés sous une hotte en utilisant des gants et, si nécessaire, il convient d'utiliser un masque. Le contact avec des acides doit être évité. Conserver dans des récipients fermés hermétiquement, dans un lieu bien ventilé et sec, et séparé des acides.**

## 5.1.4 Milieux sélectifs solides

### 5.1.4.1 Gélose lactosée au rouge de phénol et au vert brillant (selon Edel et Kampelmacher)

#### 5.1.4.1.1 Composition

Milieu de base	
Extrait de viande en poudre	5 g
Peptone, hydrolysats enzymatique de tissu animal	5 g
Hydrogénophosphate disodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1 g
Dihydrogénophosphate de sodium (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0,6 g
Gélose	environ 15 g
Eau, q.s.p.	900 ml

Supplément 1	
Lactose	10 g
Saccharose	10 g
Rouge de phénol	0,09 g
Eau, q.s.p.	100 ml

Supplément 2	
Vert brillant	0,5 g
Eau, q.s.p.	100 ml

#### 5.1.4.1.2 Préparation

Dissoudre tous les composants du milieu de base dans de l'eau et stériliser à l'autoclave (6.1.2) à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

Préparer le supplément 1 en dissolvant les composants dans de l'eau stérile. Chauffer la solution dans un bain d'eau (6.2) à 70 °C pendant 20 min. La refroidir à 55 °C ± 1 °C et l'utiliser immédiatement.

Préparer le supplément 2 en dissolvant du vert brillant dans de l'eau. Conserver la solution pendant au moins 1 jour à l'obscurité afin qu'une autostérilisation se produise.

Ajouter la solution de sucres au rouge de phénol préparée (supplément 1) et 1 ml de la solution au vert brillant (supplément 2) à la gélose avant répartition dans des boîtes de Petri (6.7); s'assurer que le pH final est de 7,0 ± 0,1. Immédiatement avant utilisation, sécher les boîtes de gélose jusqu'à ce que la surface de la gélose soit sèche. Utiliser des boîtes fraîchement préparées.

## 5.1.4.2 Gélose lysine xylose désoxycholate

### 5.1.4.2.1 Composition

Milieu de base	
D(+)-Xylose	3,5 g
L(+)-Lysine	5 g
Désoxycholate de sodium	2,5 g
Extrait de levure	3 g
Saccharose	7,5 g
Lactose	7,5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Thiosulfate de sodium (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	6,8 g
Citrate de fer(III) ammoniacal	0,8 g
Gélose	environ 13 g
Eau, q.s.p.	1 000 ml

Supplément	
Rouge de phénol	0,4 g
Eau, q.s.p.	100 ml

### 5.1.4.2.2 Préparation

Dissoudre tous les composants, y compris 20 ml de solution au rouge de phénol (supplément) en chauffant jusqu'à ébullition.

Ajuster le pH à 7,4 ± 0,1.

**ATTENTION — Ne pas surchauffer, ne pas préparer de portions supérieures à 1 litre à la fois. Ne pas stériliser le milieu à l'autoclave. Après préparation, transférer dans un bain d'eau à 50 °C et verser dans des boîtes de Petri (6.7) dès que le milieu a refroidi.**

### 5.1.4.3 Gélose au sulfite de bismuth (selon Wilson et Blair)

#### 5.1.4.3.1 Composition

Milieu de base	
Extrait de viande	5 g
Peptone, hydrolysats enzymatique de tissu animal	10 g
D(+)-Glucose	5 g
Hydrogénophosphate disodique (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	4 g
Sulfate de fer(II) heptahydraté (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0,3 g
Sulfite de bismuth [Bi <sub>2</sub> (SO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ]	8 g
Gélose	environ 15 g
Eau, q.s.p.	1 000 ml



**Supplément**

Vert brillant	0,5 g
Eau, q.s.p.	100 ml

**5.1.4.3.2 Préparation**

Dissoudre tous les composants, y compris 5 ml de solution au vert brillant (supplément) en chauffant. Ne pas stériliser le milieu à l'autoclave.

Ajuster le pH à  $7,6 \pm 0,1$  et verser environ 20 ml de milieu dissous mais trouble dans chaque boîte de Petri (6.7). S'assurer que la gélose est brunâtre, jaune rougeâtre ou verdâtre. Si la couleur est brune, ne pas utiliser ce milieu.

**5.2.2 Gélose ferrique aux deux sucres** (selon Kligler)**5.2.2.1 Composition****Milieu de base**

Extrait de viande	3 g
Extrait de levure	3 g
Peptone, hydrolysats enzymatique de tissu animal	20 g
Lactose	10 g
D(+)-Glucose	1 g
Citrate de fer(III)	0,5 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Thiosulfate de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )	0,3 g
Gélose	environ 12 g
Eau, q.s.p.	1 000 ml

**Supplément**

Rouge de phénol	0,4 g
Eau, q.s.p.	100 ml

**5.2 Milieux de confirmation**

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

**5.2.2.2 Préparation**

ISO 6340:1995

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/14f662a-94e1-4581-8c23b9533d9b/iso-6340-1995>

Dissoudre tous les composants, y compris 6 ml de rouge de phénol (supplément) en chauffant.

Ajuster le pH pour obtenir une valeur finale de  $7,4 \pm 0,1$ .

Stériliser à l'autoclave (6.1.2) à  $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  pendant 15 min.

Verser environ 6 ml de milieu dans chaque tube.

Laisser prendre en position oblique pour former une extrémité d'environ 2,5 cm de longueur.

**5.2.1 Gélose nutritive****5.2.1.1 Composition**

Extrait de viande	3 g
Peptone, hydrolysats enzymatique de tissu animal	5 g
Gélose	environ 15 g
Eau, q.s.p.	1 000 ml
Chlorure de sodium (NaCl) (facultatif)	5 g

**5.2.1.2 Préparation**

Dissoudre tous les composants par ébullition.

Ajuster le pH à  $7,0 \pm 0,1$ .

Stériliser le milieu à l'autoclave (6.1.2) à  $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  pendant 15 min.

Répartir dans des boîtes de Petri (6.7).

**5.2.3 Gélose à l'urée** (selon Christensen)**5.2.3.1 Composition****Milieu de base**

Peptone, hydrolysats enzymatique de tissu animal	1 g
D(+)-Glucose	1 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5 g
Dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	2 g
Gélose	environ 15 g
Eau, q.s.p.	1 000 ml