

NORME INTERNATIONALE

ISO
8360-1

Première édition
1988-12-15



INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION
ORGANISATION INTERNATIONALE DE NORMALISATION
МЕЖДУНАРОДНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ПО СТАНДАРТИЗАЦИИ

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* —

Partie 1: Méthode par enrichissement en milieu liquide

Water quality — Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa —

Part 1: Method by enrichment in liquid medium

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 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 8360-1 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*.

L'ISO 8360 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de Pseudomonas aeruginosa* :

- *Partie 1: Méthode par enrichissement en milieu liquide*
- *Partie 2: Méthode par filtration sur membrane*

L'annexe A de la présente partie de l'ISO 8360 est donnée uniquement à titre d'information.

Introduction

*Pseudomonas aeruginosa*¹⁾ peut apparaître dans l'eau pour des raisons multiples et être de diverses origines, mais il ne peut pas être utilisé comme indicateur de pollution fécale et la signification de sa présence ne peut pas toujours être définie avec précision. Dans certaines conditions, par contre, il peut être à l'origine d'infections occasionnelles chez l'homme, en particulier chez des sujets en état de faiblesse, et sa présence dans l'eau potable, l'eau en bouteille, l'eau de piscine et l'eau distribuée aux hôpitaux est considérée comme indésirable.

Lorsqu'on juge important de dénombrer les cellules des souches non pigmentées, l'addition d'un stade de pré-enrichissement avec un milieu non sélectif est susceptible d'accroître le nombre de micro-organismes obtenus avec cette technique.

1) Voir l'annexe A pour des informations complémentaires.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8360-1:1988

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d602fa9b-192a-4428-b534-33f3a271c536/iso-8360-1-1988>

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* —

Partie 1 : Méthode par enrichissement en milieu liquide

1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 8360 prescrit une méthode permettant d'isoler *Pseudomonas aeruginosa* et d'estimer le nombre de ces organismes contenus dans des échantillons d'eau par enrichissement en milieu liquide.

Cette méthode est applicable à toutes les eaux et matières associées.

Elle est recommandée pour l'application à des eaux dans lesquelles le nombre prévu de *Pseudomonas aeruginosa* est faible, par exemple l'eau en bouteille, et dans le cas où l'eau renferme une teneur relativement élevée en désinfectant résiduel (par exemple, eau de piscine).

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 partie de l'ISO 8360. Au moment de la publication de cette partie de l'ISO 8360, les éditions indiquées étaient en vigueur. Toute norme est sujette à révision et les parties prenantes des accords fondés sur cette partie de l'ISO 8360 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 : 1982, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage.*

ISO 5667-3 : 1985, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3: Guide général pour la conservation et la manipulation des échantillons.*

ISO 6887 : 1983, *Microbiologie — Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.*

ISO 8199 : 1988, *Qualité de l'eau — Guide général pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture.*

3 Définition

Pour les besoins de la présente partie de l'ISO 8360, la définition suivante s'applique.

Pseudomonas aeruginosa: Micro-organismes pouvant croître et capables de produire un pigment fluorescent soluble dans l'eau dans un milieu contenant de l'asparagine et de l'éthanol. Ils donnent également des colonies caractéristiques lorsqu'ils sont cultivés sur une gélose lactée à 42 °C. Certaines souches sont non pigmentées.

4 Principe

Addition, à un milieu sélectif dans des récipients, de volumes mesurés de l'échantillon d'eau, ou d'une dilution de l'échantillon, et incubation dans des conditions données pour le milieu.

4.1 Dénombrement

Examen des récipients pour déterminer soit la présence d'un pigment fluorescent soluble dans l'eau sous un rayonnement ultraviolet, soit une croissance.

4.2 Confirmation

Des repiquages sont effectués à partir de chaque récipient donnant lieu à une croissance ou à une fluorescence sur des boîtes d'un milieu gélosé lacté.

Après l'incubation, les boîtes sont examinées pour la recherche des colonies typiques de *Pseudomonas aeruginosa*.

4.2.1 Souches non pigmentées et atypiques

Des repiquages en surface sur une boîte de milieu gélosé solide sont effectués à partir de chaque récipient, puis incubés. Des cultures pures sont obtenues par des repiquages supplémentaires sur des boîtes du même milieu gélosé. Chaque culture pure est finalement étudiée pour certaines caractéristiques biochimiques (voir l'annexe A).

5 Diluants, milieux de culture et réactifs

Utiliser des réactifs de qualité analytique pour la préparation des milieux de culture et des diluants, sauf spécification contraire. Préparer les milieux en utilisant de l'eau distillée sur verre, ou de l'eau d'une qualité équivalente conforme à l'ISO 3696, grade 3.

Des milieux déshydratés existant dans le commerce peuvent aussi être utilisés. Les milieux doivent être préparés conformément aux instructions du fabricant et les adjonctions d'agents sélectifs doivent être faites à la concentration donnée.

5.1 Liquides de dilution

Utiliser l'un des diluants de l'ISO 8199.

5.2 Milieux de culture

Il est très important que le milieu de culture soit approprié au type d'eau à analyser et au but recherché dans l'analyse. Pour la mise en évidence de *Pseudomonas aeruginosa* présumé, utiliser le milieu suivant.

5.2.1 Bouillon à l'asparagine à l'éthanol (milieu de Drake 10)

5.2.1.1 Composition

	Milieu simple concentration	Milieu concentré
DL-asparagine	2 g	3,2 g
L-proline	1 g	1,6 g
Monohydrogénophosphate de potassium anhydre	1 g	1,6 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	0,5 g	0,8 g
Sulfate de potassium anhydre	10 g	16 g
Éthanol	25 ml	40 ml
Eau	à 1000 ml	à 1000 ml

5.2.1.2 Préparation

Dissoudre tous les constituants dans l'eau et continuer en se conformant à l'une des méthodes suivantes.

Ajouter l'éthanol et répartir dans des bouteilles stériles à fermeture à vis. Serrer les coiffes sur les bouteilles jusqu'à ce que le joint dans le couvercle commence à s'engager avec le rebord de la bouteille. Passer à l'autoclave à $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 15 min. Serrer les coiffes sur chaque bouteille, juste après les avoir retirées de l'autoclave, afin d'empêcher les pertes d'éthanol par évaporation. Ne pas utiliser de coiffes en polypropylène sans joint.

En variante, stériliser l'éthanol par filtration sur membrane en acétate ou en nitrate de cellulose, de dimension moyenne des pores de $0,22\text{ }\mu\text{m}$, puis l'ajouter aseptiquement au milieu après passage à l'autoclave et refroidissement. Ajuster le pH à $7,2 \pm 0,2$. Conserver dans des bouteilles à fermeture à vis, à l'obscurité et à température ambiante au maximum jusqu'à 3 mois.

5.3 Milieu confirmatif

5.3.1 Gélose lactée à la cétrimide

5.3.1.1 Composition

Poudre de lait écrémé	100 g
Bouillon d'extrait de levure (voir ci-après)	250 ml
Gélose	15 g
Bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (cétrimide)	0,3 g
Eau	à 750 ml

Bouillon d'extrait de levure :

Extrait de levure	3 g
Peptone bactériologique	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau	à 1000 ml

5.3.1.2 Préparation du milieu

Préparer un volume approprié de bouillon d'extrait de levure en dissolvant tous les composants dans de l'eau distillée à l'ébullition. Ajuster le pH entre 7,2 et 7,4. Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à une température de $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

Mélanger le bouillon d'extrait de levure stérile, la cétrimide et la gélose, et porter à ébullition jusqu'à ce que la gélose soit dissoute. Introduire la poudre de lait écrémé dans un récipient en verre, à part, contenant de l'eau et agiter, de préférence à l'aide d'un agitateur magnétique, jusqu'à ce que la poudre soit complètement dissoute. Traiter les deux solutions séparément à l'autoclave pendant 5 min à une température de $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$. Éviter la caramélisation du lait en suivant les instructions données. Laisser refroidir les solutions aseptiquement à une température comprise entre 50 °C et 55 °C , ajouter la solution de lait au milieu gélosé et bien mélanger.

5.3.1.3 Préparation des boîtes de gélose

Répartir des portions de 15 ml du milieu gélosé final dans des boîtes de Petri stériles (voir 6.1). Laisser le milieu se solidifier dans les boîtes. Faire sécher les boîtes à l'étuve. Conserver à une température de $4\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant au maximum 1 mois.

6 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire microbiologique, et

6.1 Verrerie

Toute la verrerie doit être stérilisée avant utilisation pendant 1 h à une température de $170\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ au four, ou pendant 15 min à une température de $121\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ à l'autoclave.

Utiliser des boîtes de Petri stérilisées d'un diamètre de 90 mm ou 100 mm.

6.2 Étuves, pouvant être maintenues à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ et $42\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

6.3 Lampe à ultraviolet, émettant une lumière d'une longueur d'onde de 360 nm ± 20 nm.

NOTE — Lorsque le volume de l'échantillon ou de la dilution de l'échantillon examiné est égal ou inférieur à 1 ml, des boîtes de « répétition » en plastique stérilisées peuvent être utilisées à la place des flacons ou des tubes en verre.

Des boîtes de « répétition » en plastique sont des boîtes carrées subdivisées en 25 compartiments identiques pouvant contenir 1 ml de milieu de culture et 1 ml d'échantillon ou de dilution de l'échantillon. L'utilisation de ces boîtes permet d'effectuer simultanément l'essai en cinq exemplaires sur chacune des cinq dilutions successives de l'échantillon. Ces boîtes existent préstérilisées.

7 Échantillonnage

Prélever les échantillons conformément à l'ISO 5667-1, l'ISO 5667-2 et l'ISO 5667-3. Le volume d'échantillons prélevé doit être suffisant pour pouvoir effectuer les essais nécessaires, en tenant compte du nombre attendu de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau examinée.

8 Mode opératoire

Effectuer la préparation des dilutions et procéder à l'estimation du nombre le plus probable, conformément à l'ISO 8199 et à l'ISO 6887.

8.1 Dilutions

Préparer des dilutions décimales successives appropriées de l'échantillon dans un diluant (5.1) préstérilisé conformément à l'ISO 8199.

8.2 Ensemencement

Ajouter 1 ml de chaque échantillon, ou de chaque dilution de l'échantillon à 4 ml du milieu (5.2.1) dans des flacons ou des tubes. Si des volumes d'échantillon plus importants (10 ml, 50 ml) ou des boîtes de répétition sont utilisés, ajouter à l'échantillon un volume égal de milieu concentré.

8.3 Incubation

Incuber les récipients pendant 48 h à une température de 37 °C ± 1 °C. Examiner la croissance et la fluorescence sous une lampe à ultraviolet, soit dans un local à l'abri de la lumière, soit dans un appareil permettant d'éliminer la lumière visible.

NOTE — L'incubation à 38 °C – 39 °C peut être utilisée si les échantillons d'eau sont susceptibles de contenir de grands nombres d'autres bactéries. L'effet défavorable éventuel exercé par ce mode opératoire sur les nombres d'organismes récupérés devrait être pris en considération.

8.4 Confirmation

8.4.1 Gélose lactée

Repiquer à l'aide d'une boucle le milieu de culture de chaque récipient dans lequel on a constaté la croissance ou la fluorescence et transférer cette quantité sur une boîte de gélose lactée (5.3.1). Incuber les boîtes de gélose lactée pendant 24 h à une température de 42 °C ± 0,5 °C. Examiner les boîtes pour la

croissance, la production de pigment et l'hydrolyse de la caséine (clarification du milieu lacté autour des colonies) et enregistrer les résultats comme indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1 — Réactions de *Pseudomonas aeruginosa*

Mode de réaction	Atypique*)		
	Typique (1)	(2)	(3)
Hydrolyse de la caséine	+	+	+
Croissance à 42 °C ± 0,5 °C	+	+	+
Fluorescence (sous les rayons ultraviolets uniquement)	+	+	–
Pigment de pyocyanine (bleu-vert)	+	–	–
+ = réaction positive			
– = réaction négative			
*) D'autres bactéries peuvent parfois produire des réactions atypiques (2) et (3). En ce cas, la procédure décrite en 8.4.3 devrait être suivie.			

NOTE — La production de pigments dans le milieu de culture peut être inhibée par la croissance de bactéries autres que les *Pseudomonas aeruginosa*. Dans de tels cas, il convient d'exposer les boîtes à la lumière du jour, à la température ambiante, avant l'examen de la pigmentation.

8.4.2 Dénombrement

Tous les récipients de milieu de culture, donnant lieu soit à la croissance, soit à la fluorescence, qui forment des colonies (après repiquage sur des boîtes de gélose lactée) présentant la réaction (1) ou (2) (voir tableau 1 en 8.4.1) doivent être considérés comme positifs quant à la présence de *Pseudomonas aeruginosa*.

NOTE — D'autres micro-organismes identifiés comme étant des *Pseudomonas aeruginosa* non pigmentés ou atypiques selon la méthode décrite en 8.4.3 peuvent être inclus dans ce résultat.

8.4.3 Souches non pigmentées

NOTE — Suivant une étape ultérieure, il est possible d'obtenir confirmation des souches non pigmentées ou des souches atypiques. Si nécessaire, une méthode appropriée consiste à prendre une boucle de milieu de culture et à la repiquer sur boîte de gélose lactée. La boîte est incubée à une température de 37 °C ± 1 °C pendant 24 h. Une colonie bien isolée est sélectionnée et la confirmation finale est obtenue par la mise en évidence de certaines caractéristiques biochimiques (voir l'annexe A). Des galeries d'identification, qui sont disponibles dans le commerce, peuvent présenter un intérêt supplémentaire.

9 Expression des résultats

À partir du nombre de récipients de milieu de culture et des essais confirmatifs ayant donné des réactions positives, calculer, en se reportant aux tables statistiques de l'ISO 8199, le nombre le plus probable de *Pseudomonas aeruginosa* présents dans 100 ml d'échantillon d'eau conformément à l'ISO 8199.

Les résultats peuvent être exprimés également qualitativement en constatant que les *Pseudomonas aeruginosa* étaient présents ou absents dans un échantillon d'eau de 100 ml.

Lorsque de plus grands volumes sont examinés, par exemple, des eaux en bouteilles, exprimer les résultats qualitativement en spécifiant le volume approprié.

10 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir les indications suivantes :

- a) la référence à la présente partie de l'ISO 8360;
- b) tout détail nécessaire à l'identification complète de l'échantillon;
- c) les méthodes de confirmation appliquées pour identifier des souches non pigmentées, s'il y a lieu;
- d) les résultats obtenus, exprimés conformément à l'article 9;
- e) d'éventuels incidents particuliers observés au cours de l'analyse et des opérations non spécifiées dans la méthode ou considérées comme facultatives, et qui sont susceptibles d'avoir influé sur les résultats.

Annexe A (informative)

Informations complémentaires sur *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce type du genre *Pseudomonas*.

C'est une bactérie en bâtonnet, Gram négatif, non sporulée qui est oxydase et catalase positives. Elle est capable de croître à 42 °C mais non à 4 °C. Elle produit en général un pigment fluorescent soluble dans l'eau (98 % des souches) et montre un métabolisme oxydatif qui est mis en évidence par l'essai de

Hugh et Leifson. Elle réduit en général les nitrates au-delà des nitrites et produit de l'ammoniac à partir de l'acétamide par décomposition.

La gélatine est liquéfiée, la caséine hydrolysée, mais l'amidon n'est pas hydrolysé. Le pigment pyocyanine (bleu-vert) est produit par plus de 90 % des souches.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 8360-1:1988

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/d602fa9b-192a-4428-b534-33f3a271c536/iso-8360-1-1988>