

---

---

**Qualité de l'eau — Recherche et  
dénombrement des *Legionella* —**

Partie 2:

**Méthode par filtration directe sur  
membrane pour les eaux à faible teneur  
en bactéries**

iTeh STANDARD PREVIEW

(standards.iteh.ai)

*Water quality — Detection and enumeration of Legionella —*

*Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial  
counts*

[ISO 11731-2:2004](#)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9e587938-b276-43a8-9d7a-d3f237ddba90/iso-11731-2-2004>



**PDF – Exonération de responsabilité**

Le présent fichier PDF peut contenir des polices de caractères intégrées. Conformément aux conditions de licence d'Adobe, ce fichier peut être imprimé ou visualisé, mais ne doit pas être modifié à moins que l'ordinateur employé à cet effet ne bénéficie d'une licence autorisant l'utilisation de ces polices et que celles-ci y soient installées. Lors du téléchargement de ce fichier, les parties concernées acceptent de fait la responsabilité de ne pas enfreindre les conditions de licence d'Adobe. Le Secrétariat central de l'ISO décline toute responsabilité en la matière.

Adobe est une marque déposée d'Adobe Systems Incorporated.

Les détails relatifs aux produits logiciels utilisés pour la création du présent fichier PDF sont disponibles dans la rubrique General Info du fichier; les paramètres de création PDF ont été optimisés pour l'impression. Toutes les mesures ont été prises pour garantir l'exploitation de ce fichier par les comités membres de l'ISO. Dans le cas peu probable où surviendrait un problème d'utilisation, veuillez en informer le Secrétariat central à l'adresse donnée ci-dessous.

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

[ISO 11731-2:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9e587938-b276-43a8-9d7a-d3f237ddba90/iso-11731-2-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9e587938-b276-43a8-9d7a-d3f237ddba90/iso-11731-2-2004>



**DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT**

© ISO 2004

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'ISO à l'adresse ci-après ou du comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office  
Case postale 56 • CH-1211 Geneva 20  
Tel. + 41 22 749 01 11  
Fax. + 41 22 749 09 47  
E-mail [copyright@iso.org](mailto:copyright@iso.org)  
Web [www.iso.org](http://www.iso.org)

Version française parue en 2007

Publié en Suisse

**Sommaire**

Page

Avant-propos.....	iv
1 <b>Domaine d'application</b> .....	1
2 <b>Références normatives</b> .....	1
3 <b>Termes et définitions</b> .....	2
4 <b>Sécurité</b> .....	2
5 <b>Principe</b> .....	2
6 <b>Milieux de culture et réactifs</b> .....	3
7 <b>Appareillage</b> .....	6
8 <b>Échantillonnage</b> .....	7
9 <b>Mode opératoire</b> .....	8
10 <b>Expression des résultats</b> .....	10
11 <b>Rapport d'essai</b> .....	10

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

[ISO 11731-2:2004](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9e587938-b276-43a8-9d7a-d3f237ddba90/iso-11731-2-2004)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9e587938-b276-43a8-9d7a-d3f237ddba90/iso-11731-2-2004>

## 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 Normes internationales sont rédigées conformément aux règles données dans les Directives ISO/CEI, Partie 2.

La tâche principale des comités techniques est d'élaborer les Normes internationales. 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.

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.

L'ISO 11731-2 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

L'ISO 11731 comprend les parties suivantes, présentées sous le titre général *Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des Legionella*:

— *Partie 2: Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries*

La méthode générale fera l'objet d'une future Partie 1 de l'ISO 11731.

# Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des *Legionella* —

## Partie 2:

## Méthode par filtration directe sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries

**AVERTISSEMENT** — Il convient que l'utilisateur de la présente partie de l'ISO 11731 connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente partie de l'ISO 11731 n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à ses utilisateurs d'établir des pratiques appropriées en matière d'hygiène et de sécurité et de s'assurer de la conformité à la réglementation nationale en vigueur.

### 1 Domaine d'application

La présente partie de l'ISO 11731 décrit une méthode de contrôle pour la recherche et le dénombrement des *Legionella* dans l'eau destinée à un usage humain (par exemple eau chaude ou froide, eau utilisée pour le lavage), dans l'eau destinée à la consommation humaine et dans les eaux de baignade traitées (par exemple eaux de piscines). Cette méthode s'applique en particulier aux eaux à faible teneur en *Legionella*. La croissance des *Legionella* peut être inhibée par la croissance excessive d'autres colonies bactériennes sur la membrane; par conséquent, la méthode n'est applicable qu'aux eaux à faible teneur en bactéries.

### 2 Références normatives

Les documents de référence suivants sont indispensables pour 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 3696:1987, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 8199:—<sup>1)</sup> *Qualité de l'eau — Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture*

ISO 11731:1998, *Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des Legionella*

---

1) Publiée depuis la parution de la version anglaise du présent document. (Révision de l'ISO 8199:1988)

### 3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions suivants s'appliquent.

#### 3.1

##### **Legionella**

bactéries à Gram négatif normalement capables de se multiplier en 2 jours au minimum sur une gélose tamponnée contenant de l'extrait de levure et du charbon actif ainsi que de la L-cystéine et du fer(III), et formant des colonies, d'une couleur souvent blanche, pourpre à bleue, ou vert jaune

NOTE Certaines espèces sont fluorescentes sous une lumière UV de grande longueur d'onde. Les colonies ont une apparence de verre fritté lorsqu'elles sont observées avec une loupe de faible puissance. La croissance n'a pas lieu en l'absence de L-cystéine à l'exception des espèces *L. oakridgensis* et *L. spiritensis*. Les espèces *L. oakridgensis* et *L. spiritensis* exigent de la L-cystéine et du fer pour l'isolement primaire, mais elles peuvent présenter un léger développement en l'absence de L-cystéine par la suite.

### 4 Sécurité

Il convient que les réactifs utilisés dans la présente partie de l'ISO 11731 soient évalués conformément au contrôle des substances présentant un risque pour la santé.

Les *Legionella* peuvent être manipulées en toute sécurité par des microbiologistes avertis, sur une pailleuse découverte dans un laboratoire de microbiologie traditionnel conforme à un confinement de niveau 2. Une infection pouvant être causée par l'inhalation de ces bactéries, il est recommandé d'évaluer toutes les méthodes du point de vue de leur aptitude à former des aérosols. En cas de doute, les travaux doivent être effectués sous une hotte de sécurité.

(standards.iteh.ai)

### 5 Principe

ISO 11731-2:2004

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9e587938-b276-43a8-9d7a-d3f237ddba90/iso-11731-2-2004>

#### 5.1 Généralités

Les bactéries, y compris les *Legionella*, contenues dans un échantillon d'eau sont concentrées par filtration sur membrane. Après filtration, le filtre est traité avec un tampon acide placé directement dans l'entonnoir, pour réduire la croissance des micro-organismes autres que les *Legionella*. Le filtre est ensuite transféré sur une boîte contenant du milieu gélosé sélectif des *Legionella*, et incubé. Il n'est pas nécessaire, avant la mise en culture, de concentrer les échantillons supposés contenir un nombre suffisant de *Legionella* (9.1).

#### 5.2 Dénombrement

Après incubation, les colonies de morphologie caractéristique qui se forment sur le milieu sélectif sont considérées comme des *Legionella* présumées.

#### 5.3 Confirmation

Les colonies présumées sont confirmées comme étant des *Legionella* par repiquage pour mettre en évidence leur besoin en L-cystéine et en fer. Pour l'identification des espèces, il est nécessaire d'effectuer des essais biochimiques et sérologiques supplémentaires. L'identification des espèces n'est pas nécessaire pour la surveillance de routine, mais elle est indispensable en cas d'épidémie.

NOTE *L. pneumophila* de séro groupe 1 est responsable de la plupart des cas de légionellose. Il est donc considéré comme le type le plus dangereux de *Legionella* éventuellement présente dans un réseau d'eau. Cependant, comme un nombre de plus en plus important de cas de légionelloses dues à d'autres sérogroupes de *L. pneumophila* et à d'autres espèces de *Legionella* a été décrit, la présence d'autres espèces de *Legionella* dans l'eau est également considérée comme un risque potentiel.

## 6 Milieux de culture et réactifs

### 6.1 Généralités

Sauf spécification contraire, utiliser des produits chimiques de qualité analytique pour la préparation des milieux et des réactifs. Il est également possible d'utiliser des milieux et des réactifs déshydratés disponibles dans le commerce. Préparer les milieux conformément aux instructions du fabricant et ajouter les agents sélectifs ou suppléments de croissance fraîchement préparés aux concentrations recommandées (ou faire décongeler les ingrédients conservés à température ambiante avant utilisation). Préparer les milieux en utilisant de l'eau distillée dans un appareillage en verre ou une eau de qualité équivalente conforme à l'ISO 3696:1987, Qualité 3. L'utilisation de produits chimiques d'autres qualités est possible, sous réserve qu'il soit démontré qu'ils conduisent aux mêmes résultats.

### 6.2 Milieux de culture

#### 6.2.1 Milieu gélosé tamponné contenant de l'extrait de levure et du charbon actif (BCYE)

##### 6.2.1.1 Composition

Extrait de levure (qualité bactériologique)	10,0 g
Agar	12,0 g
Charbon actif	2,0 g
$\alpha$ -Cétoglutarate, sel monopotassique	1,0 g
Tampon ACES (acide N-2-acétamido-2-aminoéthane sulfonique)	10,0 g
Hydroxyde de potassium (KOH) (pastilles)	2,8 g
Chlorhydrate de L-cystéine monohydraté	0,4 g
Pyrophosphate de fer(III) [Fe <sub>4</sub> (P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ) <sub>3</sub> ]	0,25 g
Eau distillée	1 000 ml

NOTE Vérifier les recommandations du fabricant concernant la concentration en gélose à ajouter pour obtenir un pouvoir gélifiant adéquat.

##### 6.2.1.2 Préparation

###### 6.2.1.2.1 Solution de cystéine et de fer

Préparer des solutions fraîches de chlorhydrate de L-cystéine et de pyrophosphate de fer(III) en ajoutant respectivement 0,4 g et 0,25 g de ces produits dans 10 ml en volume d'eau distillée. Stériliser chaque solution par filtration sur membrane filtrante en ester de cellulose, de porosité moyenne 0,2  $\mu$ m. Conserver les solutions dans des récipients stériles propres à une température de  $(-20 \pm 5)$  °C durant 3 mois au maximum.

### 6.2.1.2.2 Tampon ACES

Ajouter les granules d'ACES à 500 ml d'eau distillée et les dissoudre en plaçant le tout dans un bain d'eau entre 45 °C et 50 °C. Ajouter en outre à 480 ml d'eau distillée toutes les pastilles d'hydroxyde de potassium et les dissoudre en agitant doucement. Pour la préparation du tampon ACES, mélanger les deux solutions.

NOTE Le tampon ACES peut provoquer la dénaturation de l'extrait de levure si l'étape suivante n'est pas suivie.

### 6.2.1.2.3 Milieu final

Ajouter successivement aux 980 ml de tampon ACES le charbon, l'extrait de levure et l' $\alpha$ -cétoglutarate. Préparer une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) à 0,1 mol/l en dissolvant 5,6 g dans 1 l d'eau distillée. Préparer une solution d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) à 0,1 mol/l en ajoutant avec précaution 5,3 ml de  $H_2SO_4$  ( $\rho = 1,84$  g/ml, teneur de 95 % à 98 %) à 1 l d'eau distillée. Utiliser selon le cas les solutions à 0,1 mol/l d'hydroxyde de potassium ou à 0,1 mol/l d'acide sulfurique afin d'ajuster le pH à  $6,9 \pm 0,2$ . Ajouter la gélose, mélanger et passer à l'autoclave à une température de  $(121 \pm 3)$  °C pendant  $(15 \pm 1)$  min (6.2.4). Après passage à l'autoclave, laisser refroidir jusqu'à  $(50 \pm 2)$  °C dans un bain d'eau.

Ajouter dans des conditions d'asepsie la solution de L-cystéine et la solution de pyrophosphate de fer(III), mélanger soigneusement entre les ajouts.

Répartir par volumes de 20 ml dans des boîtes de Petri de 90 mm à 100 mm de diamètre. Pour l'incubation des membranes (voir 9.1 et 9.2), il est également possible d'utiliser les boîtes de Petri de 60 mm de diamètre. Le pH du milieu final est de  $6,9 \pm 0,4$  à 25 °C. Laisser sécher l'excès d'humidité dans les boîtes et conserver à  $(5 \pm 3)$  °C dans des récipients hermétiques, dans l'obscurité, pendant 4 semaines au maximum.

### 6.2.2 Milieu gélosé tamponné contenant de l'extrait de levure et du charbon actif (BCYE) sans L-cystéine (BCYE-Cys)

Préparer ce milieu en opérant de la même façon que pour le BCYE (6.2.1), mais sans ajouter de L-cystéine.

[https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9e587938-b276-43a8-9d7a-](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9e587938-b276-43a8-9d7a-13f271d1b090/iso-11731-2-2004)

### 6.2.3 Milieu sélectif: milieu gélosé tamponné contenant de l'extrait de levure et du charbon actif avec suppléments sélectifs [milieu glycine, vancomycine, polymyxine et cycloheximide (GVPC)]

NOTE Ce milieu est identique au BCYE, excepté l'ajout de trois antibiotiques et de glycine au milieu BCYE.

#### 6.2.3.1 Suppléments sélectifs

Les concentrations finales dans le milieu GVPC doivent être:

Glycine, exempte d'ammonium	3 g/l
Sulfate de polymyxine B	80 000 UI/l
Chlorohydrate de vancomycine	0,001 g/l
Cycloheximide	0,08 g/l

La natamycine peut être utilisée au lieu du cycloheximide.

#### 6.2.3.2 Préparation de suppléments antibiotiques

Ajouter la quantité appropriée (en général 200 mg) de sulfate de polymyxine B à 100 ml d'eau distillée pour obtenir une concentration de 14 545 UI/ml. Mélanger et stériliser par filtration sur membrane, comme décrit en 6.2.1.2. Répartir par volumes de 5,5 ml dans des récipients stériles et conserver à  $(-20 \pm 5)$  °C. Avant utilisation, décongeler à température ambiante.



Ajouter 20 mg de chlorhydrate de vancomycine à 20 ml d'eau distillée, mélanger et stériliser par filtration sur membrane (voir 6.2.1.2). Répartir par volumes de 1 ml dans des récipients stériles et conserver à  $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ . Avant utilisation, décongeler à température ambiante.

Ajouter 2 g de cycloheximide à 100 ml d'eau distillée et stériliser par filtration sur membrane, comme décrit en 6.2.1.2. Répartir par volumes de 4 ml dans des récipients stériles et conserver à  $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ . Avant utilisation, décongeler à température ambiante.

Les suppléments antibiotiques peuvent être conservés congelés pendant une période maximale de 6 mois.

**AVERTISSEMENT — Le cycloheximide est hépatotoxique. Des gants et un masque sont nécessaires lors de sa manipulation sous forme de poudre.**

### 6.2.3.3 Préparation du milieu GVPC

Suivre les instructions données en 6.2.1.2 pour la préparation du milieu BCYE, en ajoutant 3 g de glycine exempte d'ammonium, après l'ajout de l' $\alpha$ -cétoglutarate et ajuster ensuite le pH à  $6,8 \pm 0,2$ .

Après ajout de la L-cystéine et du fer, ajouter au milieu final un volume de chacun des trois suppléments antibiotiques mentionnés ci-dessus (6.2.3.2). Mélanger soigneusement.

### 6.2.4 Contrôle de qualité des milieux

Le chauffage prolongé pendant la stérilisation ou à trop haute température doit être évité, car il peut affecter les qualités nutritionnelles du milieu BCYE. Des variations d'un lot à l'autre des composants du milieu (notamment de l' $\alpha$ -cétoglutarate) peuvent également affecter les performances du milieu. C'est pourquoi, il est essentiel de vérifier la qualité de chaque lot de milieu fraîchement préparé afin d'évaluer son aptitude à assurer la croissance de *L. pneumophila* de sérotype 1 dans les 3 jours suivant l'incubation.

Pour la plupart des bactéries, il est habituel d'évaluer l'aptitude des milieux de culture à favoriser la croissance, au moyen de cultures d'organismes précédemment isolés, cultivées au laboratoire. Dans le cas des *Legionella*, cette méthode peut être source d'erreurs, dans la mesure où les *Legionella* peuvent s'adapter facilement à des milieux de culture qui ne permettraient pas l'isolement primaire de souches «sauvages». C'est pourquoi, il est recommandé d'employer le mode opératoire suivant pour évaluer si le milieu gélosé sélectif GVPC convient aux *Legionella*.

- a) Utiliser des boîtes provenant d'un précédent lot de milieu GVPC reconnu apte à favoriser la croissance de *Legionella* avec des boîtes d'un nouveau lot de milieu et les ensemencer avec un échantillon d'eau contenant des *Legionella*.
- b) Autrement, se procurer une souche lyophilisée de *Legionella pneumophila* de sérotype 1 auprès d'une collection de cultures de référence reconnue au plan national. La reconstituer et la récupérer comme recommandé, puis la repiquer sur le milieu BCYE (6.2.1) pour la purifier. Si une culture de collection n'est pas disponible, utiliser une souche de *L. pneumophila* de sérotype 1 fraîchement isolée et confirmée. Les souches mères de *L. pneumophila* doivent être remplacées au bout de 10 repiquages au maximum. Après incubation, faire à partir de la culture qui s'est produite une suspension dans un bouillon de glycérol stérile (6.2.5) de turbidité tout juste visible à l'œil nu. Répartir la culture par volumes de 1 ml pour une conservation à  $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ . Ou bien utiliser une solution saline de Page (6.3.2) ou de l'eau distillée pour une conservation à  $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$  ou un autre milieu de congélation et conserver à  $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$  ou à  $(-70 \pm 10) ^\circ\text{C}$  selon le cas. Étaler une suspension de chaque isolat sur milieu BCYE pour identification et enregistrement de l'espèce et du sérotype de *Legionella* (9.4). Avant utilisation, décongeler à température ambiante une suspension mère d'une ou de plusieurs souches. Agiter soigneusement, attendre de 5 min à 10 min pour permettre la déposition des aérosols, puis ensemencer un volume défini (par exemple 0,1 ml) sur chacune des deux boîtes de milieu GVPC provenant du lot à tester.

Après incubation, enregistrer et comparer les résultats afin de s'assurer que la morphologie (9.4) et le nombre des colonies sont équivalents.