
**Qualité de l'eau — Détection et
dénombrement de *Pseudomonas
aeruginosa* — Méthode par filtration sur
membrane**

*Water quality — Detection and enumeration of Pseudomonas
aeruginosa — Method by membrane filtration*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16266:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006>



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 16266:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2006

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
Web www.iso.org

Version française parue en 2007

Publié en Suisse

Sommaire

Page

Avant-propos.....	iv
Introduction.....	v
1 Domaine d'application	1
2 Références normatives	1
3 Termes et définitions	2
4 Principe	2
5 Diluants, milieux de culture et réactifs	2
6 Appareillage et verrerie	6
7 Échantillonnage	6
8 Mode opératoire	6
9 Expression des résultats	8
10 Rapport d'essai	9
11 Données de performance	9
12 Interférences	9
13 Assurance de la qualité	9
Annexe A (informative) Informations complémentaires sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
Annexe B (informative) Autres milieux	11
Bibliographie	12

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 16266 a été élaborée par le comité technique ISO/TC 147, *Qualité de l'eau*, sous-comité SC 4, *Méthodes microbiologiques*.

La présente Norme internationale est l'équivalent de l'EN 12780:2002.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006>

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est un organisme pathogène pour l'homme, capable de croître dans l'eau à de très faibles concentrations nutritives. Il convient que toute eau minérale naturelle et toute eau de source soient exemptes de *Pseudomonas aeruginosa* à la source ainsi qu'à la date de commercialisation, dans 250 ml d'échantillon examiné (voir, par exemple, les directives du Conseil 80/777/CEE ^[1] et 96/70/CE ^[2]). Les autres eaux commercialisées en bouteilles doivent aussi être exemptes de *Pseudomonas aeruginosa*, dans 250 ml d'échantillon (voir, par exemple, la directive du Conseil 98/83/CE ^[3]). D'autres eaux, dont les eaux de piscine et les eaux destinées à la consommation humaine, peuvent parfois, pour des raisons de santé publique, faire l'objet d'une recherche de *Pseudomonas aeruginosa*. Des volumes de 100 ml sont alors généralement étudiés.

iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

[ISO 16266:2006](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006>

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16266:2006

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006>

Qualité de l'eau — Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* — Méthode par filtration sur membrane

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur de la présente Norme internationale connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. La présente Norme internationale n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il incombe à l'utilisateur de la présente Norme internationale 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.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément à la présente Norme internationale soient exécutés par du personnel ayant reçu une formation adéquate.

1 Domaine d'application

La présente Norme internationale spécifie une méthode permettant d'isoler et de dénombrer *Pseudomonas aeruginosa* dans des échantillons d'eau embouteillée, par filtration sur membrane. Cette méthode peut également être appliquée à d'autres types d'eau présentant une faible flore interférente, par exemple les eaux de piscine et les eaux destinées à la consommation humaine.

2 Références normatives

ISO 16266:2006

<http://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006>

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, *Eau pour laboratoire à usage analytique — Spécification et méthodes d'essai*

ISO 5667-1, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 1: Lignes directrices pour la conception des programmes et des techniques d'échantillonnage*

ISO 5667-2:—¹⁾, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 2: Guide général sur les techniques d'échantillonnage*

ISO 5667-3, *Qualité de l'eau — Échantillonnage — Partie 3: Lignes directrices pour la conservation et la manipulation des échantillons d'eau*

ISO 6887-1, *Microbiologie des aliments — Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique — Partie 1: Règles générales pour la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales*

ISO 7704, *Qualité de l'eau — Évaluation des membranes filtrantes utilisées pour les analyses microbiologiques*

1) L'ISO 5667-1 et l'ISO 5667-2, faisant actuellement l'objet d'une révision conjointe, seront publiées sous le numéro ISO 5667-1.

ISO 8199, *Qualité de l'eau — Lignes directrices générales pour le dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture*

ISO 19458:—²⁾, *Qualité de l'eau — Échantillonnage pour analyse microbiologique*

3 Termes et définitions

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

3.1

Pseudomonas aeruginosa

micro-organismes se développant sur des milieux sélectifs contenant du cétrimide et produisant de la pyocyanine ou micro-organismes se développant sur des milieux sélectifs contenant du cétrimide, oxydase positive, donnant lieu à une fluorescence sous rayonnement ultraviolet (360 ± 20) nm et également capables de produire de l'ammoniac à partir d'acétamide

4 Principe

4.1 Filtration

Un volume mesuré de l'échantillon d'eau ou une dilution de l'échantillon est filtré sur une membrane filtrante de porosité 0,45 µm. La membrane filtrante est placée sur le milieu sélectif et incubée dans les conditions spécifiées pour le milieu.

4.2 Dénombrement

Le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* présumés est obtenu par comptage du nombre de colonies caractéristiques formées sur la membrane filtrante après incubation. Les colonies produisant de la pyocyanine sont considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés mais les colonies qui produisent une fluorescence ou celles de couleur brun rougeâtre nécessitent une confirmation.

4.3 Confirmation

Repiquage des colonies à confirmer à partir de la membrane sur des boîtes de gélose nutritive (mais voir Annexe B). Après incubation, les cultures qui ne présentaient initialement pas de fluorescence sont soumises au test de recherche de l'oxydase, puis les cultures oxydase positive sont soumises au test de production de fluorescéine et examinées pour déceler leur aptitude éventuelle à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide. Les cultures qui présentaient initialement une fluorescence sont examinées pour déceler leur aptitude éventuelle à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide.

5 Diluants, milieux de culture et réactifs

Sauf spécifications contraires, utiliser des réactifs de qualité analytique pour la préparation des milieux de culture et des diluants. Préparer le milieu comme suit et ajouter les agents sélectifs aux concentrations données ou utiliser des milieux et réactifs disponibles dans le commerce, préparés conformément aux instructions du fabricant. Préparer les milieux et réactifs en utilisant de l'eau de qualité 3 spécifiée dans l'ISO 3696 ou de l'eau de pureté équivalente et exempte de substances pouvant inhiber la croissance dans les conditions de l'essai.

2) En cours de publication.

5.1 Milieu de culture

Pour déterminer *Pseudomonas aeruginosa*, utiliser le milieu suivant.

5.1.1 Base gélosée pour *Pseudomonas*/gélose CN

5.1.1.1 Composition

Peptone de gélatine	16,0 g
Hydrolysats de caséine	10,0 g
Sulfate de potassium (anhydre) (K ₂ SO ₄)	10,0 g
Chlorure de magnésium (anhydre) (MgCl ₂)	1,4 g
Glycérol	10 ml
Gélose	11,0 g à 18,0 g
Eau (distillée ou l'équivalent)	1 000 ml

NOTE La quantité de gélose requise dépend du pouvoir gélifiant. Respecter les instructions du fabricant de la gélose utilisée.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

Supplément CN

Bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (cétrimide) 0,2 g

Acide nalidixique <https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ac08268-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006> 0,015 g

5.1.1.2 Préparation

Mettre en suspension la peptone, l'hydrolysats de caséine, le sulfate de potassium, le chlorure de magnésium et la gélose dans 1 000 ml d'eau distillée (ou l'équivalent). Ajouter 10 ml de glycérol. Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète et stériliser à l'autoclave à (121 ± 3) °C pendant 15 min. Laisser le milieu refroidir à (45 à 50) °C. Ajouter le supplément CN réhydraté dans 2 ml d'eau distillée stérile, bien mélanger et ajouter au milieu de base stérile fondu. Mélanger de nouveau et verser dans des boîtes de Petri stériles de façon à obtenir une épaisseur minimale de gélose de 5 mm. Il convient que le pH final du milieu solidifié soit égal à 7,1 ± 0,2 à 25 °C. Conserver les boîtes ainsi préparées à l'abri de la lumière, en évitant toute dessiccation, à une température de (5 ± 3) °C et les utiliser dans un délai d'un mois. Ne pas conserver la gélose fondue pendant plus de 4 h. Ne pas faire fondre de nouveau le milieu.

5.2 Milieux de confirmation et réactifs

5.2.1 Milieu de King B

5.2.1.1 Composition

Peptone	20,0 g
Glycérol	10 ml
Hydrogénophosphate de potassium (K ₂ HPO ₄)	1,5 g
Sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO ₄ ·7H ₂ O)	1,5 g
Gélose	15,0 g
Eau (distillée ou l'équivalent)	1 000 ml

5.2.1.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau par chauffage. Laisser refroidir à une température de (45 à 50) °C et ajuster le pH à 7,2 ± 0,2 à 25 °C, en utilisant soit de l'acide chlorhydrique, soit de l'hydroxyde de sodium. Répartir le milieu en aliquotes de 5 ml dans des tubes de culture bouchés et autoclavés à (121 ± 3) °C pendant 15 min. Laisser les tubes refroidir et se solidifier en position inclinée.

Conserver à l'abri de la lumière à (5 ± 3) °C et utiliser dans les trois mois.

5.2.2 Bouillon d'acétamide

5.2.2.1 Composition

Solution A

ISO 16266:2006
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-702d393827bc/iso-16266-2006>

Dihydrogénophosphate de potassium (KH ₂ PO ₄)	1,0 g
Sulfate de magnésium (anhydre) (MgSO ₄)	0,2 g
Acétamide	2,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	0,2 g
Eau (distillée ou l'équivalent, exempté d'ammoniac)	900 ml

Dissoudre les composants dans l'eau et ajuster ensuite le pH à 7,0 ± 0,5, à 25 °C, en utilisant soit de l'acide chlorhydrique, soit de l'hydroxyde de sodium.

ATTENTION — L'acétamide est cancérigène et irritant. Des précautions particulières doivent donc être prises lors de la pesée, de la préparation et de la mise au rebut du milieu.

Solution B

Molybdate de sodium (Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O)	0,5 g
Sulfate de fer heptahydraté (FeSO ₄ ·7H ₂ O)	0,05 g
Eau	100 ml

5.2.2.2 Préparation

Pour préparer le bouillon d'acétamide, ajouter un 1 ml de la solution B à 900 ml d'une solution A fraîchement préparée (5.2.2.1). Ajouter de l'eau sous agitation constante jusqu'à obtention d'un volume total de 1 l. Répartir ce mélange en aliquotes de 5 ml dans des tubes de culture. Boucher les tubes et les stériliser à l'autoclave à (121 ± 3) °C pendant 15 min. Conserver à l'abri de la lumière à (5 ± 3) °C et utiliser dans les trois mois.

5.2.3 Gélose nutritive

5.2.3.1 Composition

Peptone	5,0 g
Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
Gélose	15,0 g
Eau	1 000 ml

5.2.3.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau par chauffage. Stériliser à l'autoclave à (121 ± 3) °C pendant 15 min. Il convient que le pH du milieu ainsi préparé et solidifié soit égal à $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Sécher les boîtes pour éliminer toute humidité excessive de la surface, avant utilisation. Conserver les boîtes ainsi préparées à l'abri de la lumière à (5 ± 3) °C et les utiliser dans un délai d'un mois.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/8ec08368-c079-4ac4-a239-9c22-3259c/iso-16266-2006>

5.2.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase

5.2.4.1 Composition

Dichlorhydrate de tétraméthyle- <i>p</i> -phénylènediamine	0,1 g
Eau	10 ml

5.2.4.2 Préparation

Immédiatement avant utilisation, dissoudre le dichlorhydrate de tétraméthyle-*p*-phénylènediamine dans l'eau et mettre à l'abri de la lumière. Ce réactif n'étant pas stable, le préparer en petites quantités juste avant de l'utiliser.

Il est également possible d'utiliser des tests oxydase disponibles dans le commerce.