

ISO/TC 147/SC 4

Date: 2018-07

ISO 16266-2:2018-(F)

ISO/TC 147/SC 4

Secrétariat: DIN

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* — Partie 2: Méthode du nombre le plus probable

Water quality — Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa — Part 2: Most probable number method

ICS: 13.060.70

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16266-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ff03cfc-42cd-4bd7-ac40-9283ff98f677/iso-16266-2-2018>



iTeh STANDARD PREVIEW (standards.iteh.ai)

ISO 16266-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ff03cfc-42cd-4bd7-ac40-9283f198f677/iso-16266-2-2018>



DOCUMENT PROTÉGÉ PAR COPYRIGHT

© ISO 2018

Tous droits réservés. Sauf prescription différente ou nécessité dans le contexte de sa mise en œuvre, 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, l'affichage sur l'internet ou sur un Intranet, sans autorisation écrite préalable. Les demandes d'autorisation peuvent être adressées à l'ISO à l'adresse ci-après ou au comité membre de l'ISO dans le pays du demandeur.

ISO copyright office
CP 401 • Ch. de Blandonnet 8
CH-1214 Vernier, Genève
Tél. + 41 22 749 01 11
Fax: + 41 22 749 09 47
E-mail: copyright@iso.org
Web: www.iso.org

Publié en Suisse

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

[ISO 16266-2:2018](https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ff03cfc-42cd-4bd7-ac40-9283f198f677/iso-16266-2-2018)

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ff03cfc-42cd-4bd7-ac40-9283f198f677/iso-16266-2-2018>

Sommaire

Page

Avant-propos.....	vi
Introduction.....	vii
1 Domaine d'application.....	1
2 Références normatives.....	2
3 Termes et définitions	2
4 Principe	3
5 Appareillage et verrerie.....	3
6 Milieux de culture, diluants et réactifs	4
6.1 Substances de base.....	4
6.2 Diluant	4
6.3 Antimousse B.....	4
7 Échantillonnage.....	4
8 Mode opératoire	4
8.1 Transport et conservation des échantillons	4
8.2 Préparation de l'échantillon et ensemencement des milieux.....	5
8.2.1 Préparation des échantillons de 100 ml	5
8.2.2 Préparation des échantillons de 250 ml	5
8.3 Incubation et différenciation	5
8.4 Examen des résultats	6
9 Expression des résultats	6
10 Assurance qualité	6
11 Rapport d'essai.....	7
Annexe A (informative) Informations microbiologiques complémentaires sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....	8
Annexe B (normative) Scelleuse Quanti-Tray et calcul des résultats.....	9
Annexe C (normative) Composition du milieu Pseudalert	131
Annexe D (informative) Caractéristiques de performance	132
Bibliographie.....	133

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 (IEC) en ce qui concerne la normalisation électrotechnique.

Les procédures utilisées pour élaborer le présent document et celles destinées à sa mise à jour sont décrites dans les Directives ISO/IEC, Partie 1. Il convient, en particulier, de prendre note des différents critères d'approbation requis pour les différents types de documents ISO. Le présent document a été rédigé conformément aux règles de rédaction données dans les Directives ISO/IEC, Partie 2 (voir www.iso.org/directives).

L'attention est attirée 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. Les détails concernant les références aux droits de propriété intellectuelle ou autres droits analogues identifiés lors de l'élaboration du document sont indiqués dans l'Introduction et/ou dans la liste des déclarations de brevets reçues par l'ISO (voir www.iso.org/brevets).

Les appellations commerciales éventuellement mentionnées dans le présent document sont données pour information, par souci de commodité, à l'intention des utilisateurs et ne sauraient constituer un engagement.

Pour une explication de la nature volontaire des normes, la signification des termes et expressions spécifiques de l'ISO liés à l'évaluation de la conformité, ou pour toute information au sujet de l'adhésion de l'ISO aux principes de l'Organisation mondiale du commerce (OMC) concernant les obstacles techniques au commerce (OTC), voir [le lien suivant : www.iso.org/iso/fr/avant-propos](http://www.iso.org/iso/fr/avant-propos).

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

Il convient que l'utilisateur adresse tout retour d'information ou toute question concernant le présent document à l'organisme national de normalisation de son pays. Une liste exhaustive desdits organismes se trouve à l'adresse www.iso.org/fr/members.html.

Introduction

Pseudomonas aeruginosa est un organisme pathogène pour l'homme, capable de croître dans l'eau à de très faibles concentrations nutritives. Toute eau minérale naturelle et toute eau de source doivent être exemptes de *Pseudomonas aeruginosa* à la source ainsi qu'à la date de commercialisation, dans 250 ml d'échantillon examiné (voir, par exemple, la Directive du Conseil 2009/54/CE, Référence [1]). Les autres eaux commercialisées en bouteille doivent aussi être exemptes de *Pseudomonas aeruginosa*, dans 250 ml d'échantillon (voir, par exemple, la directive du Conseil 98/83/CE, Référence [2]). D'autres eaux, dont les eaux de piscine et de spa, les eaux destinées à la consommation humaine et les eaux destinées aux hôpitaux, 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.

La méthode décrite dans le présent document peut être appliquée à différents types d'eau, par exemple, les eaux destinées aux hôpitaux, l'eau potable et les eaux en bouteille non gazéifiées destinées à la consommation humaine, les eaux souterraines, les eaux de piscine et de spa, y compris celles contenant des nombres importants de bactéries hétérotrophes (voir Références [3], [4], [5], [6] et [7]).

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16266-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ff03cfc-42cd-4bd7-ac40-9283f198f677/iso-16266-2-2018>

Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* — Partie 2-: Méthode du nombre le plus probable

AVERTISSEMENT — Il convient que l'utilisateur du présent document connaisse bien les pratiques courantes de laboratoire. Le présent document n'a pas pour but de traiter tous les problèmes de sécurité qui sont, le cas échéant, liés à son utilisation. Il est de la responsabilité de l'utilisateur de mettre en place des mesures de sécurité et d'hygiène appropriées.

IMPORTANT — Il est absolument essentiel que les essais conduits conformément au présent document soient réalisés par un personnel convenablement qualifié.

1 Domaine d'application

Le présent document spécifie une méthode permettant de dénombrer *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau. Cette méthode se fonde sur la croissance d'organismes cibles dans un milieu liquide et le calcul du nombre le plus probable (NPP) d'organismes en se référant aux tables du NPP.

Le présent document s'applique à différents types d'eau. Par exemple, les eaux destinées aux hôpitaux, l'eau potable et les eaux en bouteille non gazéifiées destinées à la consommation humaine, les eaux souterraines, les eaux de piscine et de spa, y compris celles contenant des nombres importants de bactéries hétérotrophes.

Le présent document ne s'applique pas aux eaux en bouteille gazéifiées, aux eaux en bouteille aromatisées, aux eaux de tour de refroidissement ou à l'eau de mer, pour lesquelles cette méthode n'a pas été validée. Par conséquent, ces eaux ne relèvent pas du domaine d'application du présent document. Les laboratoires peuvent utiliser la méthode présentée dans le présent document pour ces matrices en prenant les mesures adéquates de validation des performances de cette méthode avant son utilisation.

L'essai se fonde sur une technologie de recherche des enzymes bactériennes qui signale la présence de *P. aeruginosa* en hydrolysant un substrat de 7-amino-4-méthylcoumarine aminopeptidase présent dans un réactif spécial. Les cellules de *P. aeruginosa* se développent et se reproduisent rapidement à l'aide de l'apport important en acides aminés, vitamines et autres nutriments présents dans le réactif. Les souches de *P. aeruginosa* en développement actif présentent une enzyme qui dissocie le substrat de 7-amido-coumarine aminopeptidase, générant un produit qui présente une fluorescence sous une lumière ultraviolette (UV). L'essai décrit dans le présent document fournit un résultat confirmé dans un délai de 24 h sans avoir besoin de confirmer les puits positifs.

2 Références normatives

Les documents suivants sont cités dans le texte de sorte qu'ils constituent, pour tout ou partie de leur contenu, des exigences 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 8199, *Qualité de l'eau — Exigences et lignes directrices générales pour les examens microbiologiques sur milieu de culture*

ISO 11133, *Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture*

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

ISO/IEC Guide 2, *Normalisation et activités connexes — Vocabulaire général*

3 Termes et définitions

Pour les besoins du présent document, les termes et définitions de l'ISO/IEC Guide 2 ainsi que les suivants, s'appliquent.

L'ISO et l'IEC tiennent à jour des bases de données terminologiques destinées à être utilisées en normalisation, consultables aux adresses suivantes:

— ISO Online browsing platform: disponible à l'adresse <https://www.iso.org/obp>

— IEC Electropedia: disponible à l'adresse <http://www.electropedia.org/>

3.1

Pseudomonas aeruginosa

espèce de micro-organismes capable de se développer dans un bouillon sélectif et capable d'hydrolyser un substrat de diagnostic de 7-amino-4-méthylcoumarine aminopeptidase présent dans le réactif

Note 1 à l'article: Voir l'Annexe A pour des informations supplémentaires sur *P. aeruginosa*.

4 Principe

Un sachet de milieu déshydraté est ajouté à un échantillon d'eau (100 ml ou 250 ml), ou à une dilution d'un échantillon complété à 100 ml. L'échantillon contenant le milieu est doucement agité pour garantir un mélange adéquat et pour dissoudre le milieu. Lorsque le dénombrement est exigé, l'échantillon contenant le milieu (100 ml) est versé dans des conditions aseptiques dans un Quanti-Tray¹⁾ ou un Quanti-Tray/2000¹⁾ pour dénombrer jusqu'à 201 organismes ou 2 419 organismes respectivement par échantillon de 100 ml. Le mode opératoire pour le dénombrement des échantillons de 250 ml est décrit en 8.2. Les plateaux sont étanchéifiés à l'aide d'une scelleuse Quanti-Tray¹⁾. Les Quanti-Tray¹⁾ ou flacons (pour les essais de type présence/absence) sont ensuite incubés à $(38 \pm 0,5)$ °C pendant 24 h à 28 h. Les résultats sont confirmés au bout de 24 h, mais peuvent être consultés jusque dans un délai de 28 h.

Après l'incubation, les puits d'échantillon des flacons ou des Quanti-Tray¹⁾ qui présentent un certain degré de fluorescence bleue sous une lumière ultraviolette de grande longueur d'onde (365 nm) sont considérés comme étant positifs pour *P. aeruginosa*.

À l'aide de tables statistiques ou d'un simple programme informatique, le nombre le plus probable (NPP) de *P. aeruginosa* dans 100 ml ou 250 ml d'échantillon peut être déterminé.

Cette méthode est également adaptée en tant que procédure qualitative.

5 Appareillage et verrerie

Matériel courant de laboratoire de microbiologie et, en particulier, le matériel ci-après.

5.1 Appareil de stérilisation à la vapeur (autoclave).

Tout appareil ou toute verrerie fourni(e) non stérile doit être stérilisé(e) conformément aux instructions de l'ISO 8199.

5.2 Four à air chaud, pour la stérilisation à la vapeur.

5.3 Incubateur, contrôlé par thermostat réglable à $(38 \pm 0,5)$ °C.

5.4 Scelleuse Quanti-Tray¹⁾ et insert en caoutchouc.

5.5 Flacons stériles à col large d'au moins 110 ml.

5.6 Lampe à rayons ultraviolets, 365 nm, 6 watt, grande longueur d'onde.

5.7 Quanti-Tray¹⁾ ou Quanti-Tray/2000¹⁾, conformément à l'Annexe B.

¹⁾ Quanti-Tray est une appellation commerciale ou une marque déposée d>IDEXX Laboratories, Inc. ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Cette information est donnée à l'attention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné.

6 Milieux de culture, diluants et réactifs

6.1 Substances de base

La méthode utilise Pseudalert²⁾, un milieu disponible sous la forme d'une poudre prête à l'emploi répartie dans des sachets. Chaque sachet contient suffisamment de milieu (2,45 g pour des échantillons de 100 ml) pour un seul essai. Pour le dénombrement quantitatif des échantillons de 250 ml, un sachet de 2,45 g est ajouté à chaque aliquote d'échantillon divisé tel que décrit en 8.2. Il convient que le réactif Pseudalert²⁾ soit de couleur beige et fluide. Le milieu contient des nutriments tels que des acides aminés et des vitamines, un tampon, du chlorure de sodium, du sulfate de magnésium, des indicateurs de développement, des antibiotiques et des sources d'azote. Le milieu est conservé dans des conditions ambiantes (2 °C à 30 °C) à l'abri de la lumière directe du soleil et il convient de l'utiliser avant la date de péremption indiquée sur le sachet. Le réactif présente une durée de conservation de 12 mois à compter de la date de fabrication.

La composition du milieu Pseudalert²⁾ doit être conforme à l'Annexe C. Les caractéristiques de performance pour la présente méthode sont fournies à l'Annexe D.

6.2 Diluant

Pour les dilutions à employer avec Pseudalert²⁾, n'utiliser que de l'eau stérile, non inhibitrice et exempte d'oxydants. L'utilisation de diluants à base d'eau saline ou peptonée tamponnée interfère avec les performances de l'essai.

6.3 Antimousse B

Antimousse B utilisé comme une suspension de silicone hydrosoluble active à 1 %. Ce réactif est ajouté aux échantillons afin de réduire autant que possible la formation de bulles d'air pendant le mélange.

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ff03cfc-42cd-4bd7-ac40-9283f198f677/iso-16266-2-2018>

NOTE Des flacons préremplis d'antimousse sont disponibles.

7 Échantillonnage

Procéder au prélèvement, à la conservation et à la manipulation des échantillons comme spécifié dans l'ISO 19458.

8 Mode opératoire

8.1 Transport et conservation des échantillons

Il convient de transporter et de conserver les échantillons conformément à l'ISO 19458. Il convient de commencer l'analyse le jour du prélèvement ou dans les 12 h qui le suivent. Dans certains cas

²⁾ Pseudalert est une appellation commerciale ou une marque déposée d>IDEXX Laboratories, Inc. ou de ses filiales aux États-Unis et/ou dans d'autres pays. Cette information est donnée à l'attention des utilisateurs du présent document et ne signifie nullement que l'ISO approuve l'emploi du produit ainsi désigné.

exceptionnels, les échantillons peuvent être conservés à (5 ± 3) °C pendant une durée maximale de 24 h jusqu'à ce qu'ils soient examinés. Dans ce cas, le temps de stockage doit figurer dans le rapport d'essai.

8.2 Préparation de l'échantillon et ensemencement des milieux

8.2.1 Préparation des échantillons de 100 ml

Pour le dénombrement des échantillons de 100 ml, ajouter, dans des conditions aseptiques, un seul sachet de milieu Pseudalert²⁾ à chaque échantillon ou dilution d'échantillon de 100 ml dans un flacon stérile et transparent, puis bien mélanger. Une fois que le milieu est complètement dissous, l'échantillon contenant le milieu est versé dans des conditions aseptiques dans un Quanti-Tray¹⁾ ou Quanti-Tray/2000¹⁾ puis étanchéifié à l'aide de la scelleuse Quanti-Tray¹⁾. Pour réduire au minimum la formation de bulles d'air dans les puits, les échantillons peuvent être préparés dans des flacons préalablement stérilisés contenant l'antimousse B. L'antimousse B peut aussi être ajouté dans chaque flacon à l'aide d'un flacon compte-gouttes. Une autre méthode du NPP consiste à répartir l'échantillon d'eau dans lequel le Pseudalert²⁾ a été dissous dans des tubes stériles pour déterminer le NPP selon un format NPP plus classique (par exemple, 1×50 ml et 5×10 ml).

NOTE Le mélange de réactif Pseudalert²⁾ peut devenir trouble en raison de la teneur élevée en minéraux (en particulier, magnésium et/ou calcium), mais cela n'affecte en rien le résultat de l'essai.

8.2.2 Préparation des échantillons de 250 ml

Pour le dénombrement des échantillons de 250 ml, diviser l'échantillon dans trois flacons stériles et transparents, de manière à obtenir deux échantillons avec des aliquotes de 100 ml et un échantillon avec une aliquote de 50 ml. Compléter l'échantillon de 50 ml à 100 ml en ajoutant 50 ml d'eau stérile, non inhibitrice et exempte d'oxydants. Ajouter, dans des conditions aseptiques, un seul sachet de milieu Pseudalert²⁾ à chacun des trois échantillons de 100 ml, puis bien mélanger. Une fois que le milieu est complètement dissous, les trois échantillons de 100 ml contenant le milieu sont chacun versés dans des conditions aseptiques dans trois Quanti-Tray¹⁾ ou Quanti-Tray/2000¹⁾ séparés, puis étanchéifiés à l'aide de la scelleuse Quanti-Tray¹⁾. Pour réduire au minimum la formation de bulles d'air dans les puits, les échantillons peuvent être préparés dans des flacons préalablement stérilisés contenant l'antimousse B. L'antimousse B peut aussi être ajouté dans chaque flacon à l'aide d'un flacon compte-gouttes. Il est essentiel de prévoir un étiquetage adéquat des trois Quanti-Tray¹⁾ permettant de distinguer clairement le plateau contenant la portion d'échantillon de 50 ml (c'est-à-dire la portion diluée) des deux plateaux contenant les portions d'échantillon non diluées de 100 ml. Ceci est important pour le calcul correct du dénombrement final.

8.3 Incubation et différenciation

Incuber les Quanti-Tray¹⁾ ensemencés pendant 24 h à 28 h à $(38 \pm 0,5)$ °C pour détecter *P. aeruginosa*.

8.4 Examen des résultats

Examiner les Quanti-Tray¹⁾ ou Quanti-Tray/2000¹⁾ après incubation sous rayonnement ultraviolet (365 nm) dans une pièce sombre ou dans une chambre dont la lumière ambiante est tamisée. S'assurer que la lumière ultraviolette est éloignée des yeux et dirigée vers l'échantillon. Il convient de vérifier l'efficacité de la lumière à rayons ultraviolets régulièrement à l'aide d'un témoin positif à fluorescence conformément à l'Article 10. Il convient également de remplacer la lampe conformément à la durée de vie de la lampe indiquée par le fabricant (par exemple, 6 000 h) ou tous les ans, l'échéance la plus courte étant retenue. Considérer comme positifs à *P. aeruginosa* et dénombrer tous les puits présentant un certain degré de fluorescence bleue. À des fins d'interprétation, comparer avec un témoin négatif. En cas de doute concernant la fluorescence d'un puits au bout de 24 h, remettre le plateau dans l'incubateur pour une incubation supplémentaire en veillant à ne pas dépasser un temps d'incubation maximal de 28 h. Le positionnement de l'insert en caoutchouc du Quanti-Tray¹⁾ ou Quanti-Tray/2000¹⁾ sur l'échantillon peut faciliter l'identification des puits fluorescents.

9 Expression des résultats

D'après le nombre de puits positifs présents sur un Quanti-Tray¹⁾ ou Quanti-Tray/2000¹⁾, le NPP/100 ml de *P. aeruginosa* peut être calculé en référence aux tables statistiques ou à l'aide d'un programme informatique de génération de NPP (voir les Tableaux B.1 et B.2). Pour le dénombrement des échantillons de 250 ml, le NPP est calculé en utilisant la somme des dénombrements des deux Quanti-Tray¹⁾ contenant les portions d'échantillon non diluées, comme premier dénombrement, et le dénombrement du Quanti-Tray¹⁾ contenant la portion d'échantillon diluée, comme deuxième dénombrement (voir le Tableau B.3).

10 Assurance qualité

Le laboratoire doit être doté d'un système de contrôle de la qualité clairement défini garantissant que l'appareillage, les réactifs et les techniques sont adaptés à l'essai. L'utilisation de contrôles positifs, de contrôles négatifs et de blancs fait partie de l'essai.

Pour la définition de la productivité et de la sélectivité, se référer à l'ISO 11133. Les performances de Pseudalert²⁾ doivent être soumises à essai conformément aux méthodes et critères décrits dans l'ISO 11133 (voir le Tableau 1).

Tableau 1 — Essai de performance de Pseudalert²⁾

Fonction	Incubation	Souche de contrôle ^a	Milieu de référence	Méthode de contrôle	Critères	Réactions caractéristiques
Productivité	24 h à 28 h/ (38 ± 0,5) °C	<i>P. aeruginosa</i> WDCM 00024 ou WDCM 00025	TSA	Quantitative	PR ≥ 0,5	Fluorescence bleue
Sélectivité	24 h à 28 h/ (38 ± 0,5) °C	<i>P. fluorescens</i> WDCM 00115	—	Qualitative	Inhibition totale	Absence de fluorescence bleue

^a Se référer au catalogue des souches de référence disponible à l'adresse: http://www.wfcc.info/pdf/WDCM_Reference_Strain_Catalogue.pdf pour connaître les numéros de collection des souches de culture et les détails de contact.

11 Rapport d'essai

Le rapport d'essai doit contenir au moins les informations suivantes:-

- a) la méthode d'essai employée ainsi que la référence du présent document, à savoir ISO 16266-2:2018;
- b) toutes les informations nécessaires à l'identification complète de l'échantillon;
- c) les résultats exprimés conformément à l'Article 9;
- d) tout phénomène particulier observé au cours de l'analyse et toute opération non spécifiée dans le présent document ayant pu influencer les résultats.

Si, dans certains cas exceptionnels, l'échantillon est conservé à (5 ± 3) °C pendant une durée maximale de 24 h jusqu'à ce qu'il soit examiné, le temps de stockage doit figurer dans le rapport d'essai.

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 16266-2:2018

<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/5ff03cfc-42cd-4bd7-ac40-9283f198f677/iso-16266-2-2018>