

## **E-IV-6V1 – RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DE *Pseudomonas aeruginosa*. FILTRATION SUR MEMBRANE**

### **1. Objet**

Cette procédure décrit la méthode de recherche et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux après filtration sur membrane.

### **2. Domaine d'application**

Cette procédure s'applique à tous les types d'eaux (y compris les eaux de piscines), excepté lorsque de grandes quantités de matières susceptibles d'être retenues par la membrane sont présentes.

### **3. Définitions et abréviations**

*Pseudomonas aeruginosa* : bactéries se développant sur des milieux sélectifs contenant du cétrimide et produisant de la pyocyanine ou bactéries se développant sur des milieux sélectifs contenant du cétrimide, oxydase positive donnant lieu à fluorescence sous rayonnement ultraviolet ( $360 \pm 20$  nm) et capables généralement de produire de l'ammoniac à partir d'acétamide. Ils hydrolysent la caséine.

### **4. Principe**

Le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* est basé sur la filtration de volumes donnés d'échantillon d'eau sur une membrane filtrante de porosité  $0.45 \mu\text{m}$ .

Les membranes sont placées sur un milieu sélectif approprié contenant du cétrimide et incubées à  $36 \pm 2$  °C pendant  $44 \pm 4$  h.

La confirmation est basée sur les caractéristiques de *Pseudomonas aeruginosa*: les colonies produisant de la pyocyanine sont considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmées mais les autres colonies fluorescentes ou de couleur brun rougeâtre nécessitent, après repiquage sur milieu nutritif, les confirmations suivantes : oxydase, la production de pigment fluorescent, l'aptitude de produire généralement de l'ammoniac à partir d'acétamide, hydrolyse de la caséine.

### **5. Conditionnement et conservation de l'échantillon**

Les échantillons d'eau doivent être prélevés dans des bouteilles ou des flacons stériles à usage unique (avec inhibiteur de désinfectant si nécessaire).

Les flacons contenant les échantillons destinés aux analyses microbiologiques ne sont pas remplis entièrement.



Les échantillons sont conservés jusqu'au moment de l'analyse entre 2 et 5 °C.

L'échantillon doit être analysé de préférence dans les 8 heures qui suivent le prélèvement, sinon impérativement dans les 24 h.

## 6. Appareillages et matériels utilisés

### 6.1 Appareillage

- Rampe de filtration
- Autoclave
- Incubateur à  $36 \pm 2$  °C
- Lampe à ultraviolet ( $360 \pm 20$  nm)
- Compteur de colonies.

### 6.2 Petit matériel

- Bouteille en verre : préparation du milieu de culture.
- Petit matériel stérile à usage unique : pipettes individuelles stériles en plastique de 2 et 10 ml, boîtes de pétri de 50 mm de diamètre, pots de 50 ml ou tubes de 20 ml en plastique pour les éventuelles dilutions.
- Des membranes filtrantes stériles de 0.45 µm de porosité, d'environ 47 mm de diamètre

## 7. Réactifs utilisés

- **Milieu de culture sélectif « Base gélosée pour Pseudomonas »** : Les colonies pigmentées (vert -bleu) (pyocyanine) sont considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmées, les autres colonies fluorescentes sous UV ou de couleur brun-rougeâtre sont à confirmer.
- **Milieu de confirmation : « King b »** : Milieu permettant de mettre en évidence l'aptitude des *Pseudomonas aeruginosa* à produire un pigment fluorescent sous UV.
- **Milieu de confirmation : Bouillon d'acétamide »** : Bouillon permettant de mettre en évidence l'aptitude des *Pseudomonas aeruginosa* à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide, révélé par le réactif de Nessler.
- **Réactif Oxydase** : Réactif permettant de mettre en évidence l'enzyme cytochrome oxydase présent notamment chez les Pseudomonas.
- **Diluant** : Pour des dilutions éventuelles, la solution de Ringer ¼ stérile est utilisée.
- **Milieu de confirmation au lait et au cétrimide** : Milieu permettant de révéler l'hydrolyse de la caséine

## 8. Mode opératoire

### 8.1 Préparation de l'échantillon

Le nombre de dilutions réalisées et le choix des volumes à filtrer varient en fonction du type d'échantillon analysé.

A titre indicatif :

- Pour les échantillons ponctuels d'eaux contaminées, les volumes de l'échantillon filtrés sont de 100 ml, 10 ml, 1 ml.
- Pour les eaux de distribution, eaux de piscine, les eaux souterraines et les eaux alimentaires, le volume filtré est de 100 ml.

Dans le cas où une pollution importante est suspectée le nombre de dilutions est augmenté.

### 8.2 Filtration

Les prises d'essai sont filtrées sur membranes de 0.45 µm de porosité.

### 8.3 Incubation.

Les boîtesensemencées sont retournées et disposées en piles (max 6 boîtes) et mises à incuber dans un incubateur réglé à  $36 \pm 2$  °C pendant  $44 \pm 4$  h.

### 8.4 Lecture.

Une première lecture est effectuée après  $21 \pm 3$  h. Si la membrane montre une croissance importante, un premier dénombrement a lieu. Les boîtes sont ensuite remises à incuber jusqu'au terme des  $44 \pm 4$  h et un second dénombrement est alors réalisé. Les confirmations débutent à ce moment.

- Sur le milieu avec Cétrimide, les colonies caractéristiques pigmentées (bleu-vert) sont considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés et ne doivent pas être soumises aux tests de confirmation.
- Les colonies fluorescentes non bleu-vert sont considérées comme des *Pseudomonas aeruginosa* présumés et doivent être confirmées par les tests de production d'ammoniaque à partir d'acétamide et l'hydrolyse de la caséine.
- Les colonies brun rouge sont considérées aussi comme des *Pseudomonas aeruginosa* présumés, elles doivent être confirmées par le test à l'oxydase, la fluorescence sur milieu King's B, la production d'ammoniac à partir d'acétamide et l'hydrolyse de la caséine.

### 8.5 Confirmation

La confirmation concerne 2 types de colonies :

- les colonies fluorescentes qui ne présentent pas une coloration bleu-vert
- les colonies qui présentent une coloration 'brun rougeâtre'.

Les colonies qui ne sont ni bleu-vert, ni brun rougeâtre et qui ne fluorescent pas ne doivent pas être confirmées.

Il convient d'éviter une exposition prolongée aux UV car les bactéries peuvent être tuées et incapables de se développer sur le milieu de confirmation.



### 8.5.1 Isolement

Si possible, 10 colonies par type morphologique sont à confirmer.

Si les colonies ne sont pas bien isolées, les colonies à confirmer sont isolées sur la Gélose nutritive et incubées à  $36 \pm 2$  °C pendant  $22 \pm 2$  h. Pour les colonies brun rouge, elles sont d'office isolées sur gélose nutritive en vue d'entreprendre les tests de confirmation.

Après vérification de la pureté de la colonie, les tests de confirmation peuvent alors être entrepris.

### 8.5.2 Essai oxydase

Pour les colonies brun-rougeâtre, le test d'oxydase est en premier lieu effectué à partir de l'isolement. A l'aide d'une anse en plastique, une partie de la culture est étalée sur la bandelette « Bactident oxydase », si la zoneensemencée de la bandelette vire au rose-violet dans les 10 sec, la réaction est considérée comme étant positive.

Une réponse positive est nécessaire pour poursuivre les prochains tests : acétamide et fluorescence sur King B.

### 8.5.3 Fluorescence sur milieu King B

Les colonies brun rougeâtre isolées sur la gélose nutritive et oxydase positive subissent ce test.

Une partie de la culture est étalée sur la gélose en pente King B à l'aide d'une anse ; cette gélose est ensuite incubée pendant 5 jours maximum (en général 24 h suffisent) à une température de  $36 \pm 2$  °C. Examiner la croissance sous lumière UV et noter la présence de toute fluorescence. Un isolement est considéré comme positif si une fluorescence apparaît dans les 5 jours.

### 8.5.4 Production d'ammoniaque à partir d'acétamide

Les colonies brun rougeâtre positives pour l'oxydase et les colonies fluorescentes non bleu vert doivent être contrôlées pour la production d'ammoniaque à partir d'acétamide.

Un tube de bouillon d'acétamide estensemencé à l'aide de la culture isolée et est incubé à  $36 \pm 2$  °C pendant  $22 \pm 2$  h. Après incubation, deux gouttes de réactif de Nessler sont ajoutées au bouillon ; si le test est positif une coloration allant du jaune au rouge brique (en fonction de la concentration en ammoniaque) apparaît.

### 8.5.5 Hydrolyse de la caséine

Les colonies fluorescentes ne présentant pas une couleur bleu-vert et les colonies brun rougeâtre doivent être contrôlées pour l'hydrolyse de la caséine.

Deux colonies par type sont isolées sur une gélose au lait et au cétrimide, et incubées à  $36 \pm 2$  °C pendant  $22 \pm 2$  h. L'apparition de halos translucides au niveau des colonies indique l'hydrolyse de la caséine et confirme la présence de *Pseudomonas aeruginosa*

**NB :** Des témoins positif et négatif sont réalisés pour chaque test de confirmation.



## 9. Paramètres qualité

Le contrôle de qualité des essais sera réalisé par :

- Le contrôle des conditions d'essais : délais entre le prélèvement et l'analyse, condition de conservation des échantillons, qualité des milieux de culture, surveillance des températures d'incubation,...
- La vérification de l'asepsie de l'environnement : témoin (filtration de 100ml de solution de Ringer et incubation parallèlement aux échantillons)
- Utilisation de Matériaux de référence quantifiés et établissement d'une carte de contrôle
- Le contrôle externe par la participation à des exercices interlaboratoires

## 10. Calcul et expression de résultats

Le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* est déterminé en tenant compte:

- Du nombre de *Pseudomonas aeruginosa* se présentant sous forme de colonies bleu-vert
- Du taux de confirmation obtenu à partir des colonies fluorescentes (hydrolyse de la caséine positive, et généralement acétamide positive) et des colonies de coloration brun-rougeâtre (cf test spécifique)
- Du volume d'échantillon ou de la dilution analysée

Les résultats sont généralement exprimés en nombre de *Pseudomonas aeruginosa* par 100 ml.

## 11. Sécurité

Sans objet dans cette procédure.

## 12. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne et éventuellement à la méthode normalisée
- l'identification complète de l'échantillon
- la date de prélèvement ; ceci qu'il ait été réalisé par le laboratoire ou par le client
- la date d'analyse
- les résultats du dénombrement conformément au point 10
- les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

### 13. Références

**ISO 16266: 2006** – Water Quality- Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration

**ISO 8199 : 2005** – Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

ORIGINAL 2014