

Arrêté du 21 Moharram 1434 correspondant au 5 décembre 2012 rendant obligatoire la méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane.

Le ministre du commerce,

Vu la loi n° 05-12 du 28 Joumada Ethania 1426 correspondant au 4 août 2005, modifiée et complétée, relative à l'eau ;

Vu le décret présidentiel n° 12-326 du 17 Chaoual 1433 correspondant au 4 septembre 2012 portant nomination des membres du Gouvernement ;

Vu le décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, relatif au contrôle de la qualité et à la répression des fraudes ;

Vu le décret exécutif n° 02-453 du 17 Chaoual 1423 correspondant au 21 décembre 2002 fixant les attributions du ministre du commerce ;

Vu le décret exécutif n° 05 - 465 du 4 Dhou El Kaada 1426 correspondant au 6 décembre 2005 relatif à l'évaluation de la conformité ;

Vu l'arrêté interministériel du 22 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 22 janvier 2006, modifié et complété, fixant les proportions d'éléments contenus dans les eaux minérales naturelles et les eaux de source ainsi que les conditions de leur traitement ou les adjonctions autorisées ;

Vu l'arrêté du 14 Safar 1415 correspondant au 23 juillet 1994, modifié et complété, relatif aux spécifications micro biologiques de certaines denrées alimentaires ;

Arrête :

Article 1er. — En application des dispositions de l'article 19 du décret exécutif n° 90-39 du 30 janvier 1990, modifié et complété, susvisé, le présent arrêté a pour objet de rendre obligatoire la méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane.

Art. 2. — Pour la détection et le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane, les laboratoires du contrôle de la qualité et de la répression des fraudes et les laboratoires agréés à cet effet doivent employer la méthode jointe en annexe du présent arrêté.

Cette méthode doit être utilisée par le laboratoire lorsqu'une expertise est ordonnée.

Art. 3. — Le présent arrêté sera publié au *Journal officiel* de la République algérienne démocratique et populaire.

Fait à Alger, le 21 Moharram 1434 correspondant au 5 décembre 2012.

Mustapha BENBADA.

ANNEXE

Méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane

La présente méthode spécifie une technique 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.

1. DÉFINITION

Pour les besoins du présent document, la définition suivante s'applique.

1.1 *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.

2. PRINCIPE

2.1 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.

2.2 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.

2.3 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.

3. 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 distillée ou de l'eau de pureté équivalente et exempte de substances pouvant inhiber la croissance dans les conditions de l'essai.

3.1 Milieu de culture

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

3.1.1 Base gélosée pour *Pseudomonas* gélose CN

3.1.1.1 Composition

Peptone de gélatine.....	16,0 g
Hydrolysate 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 équivalent).....	1 000 ml

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

Supplément CN

Bromure d'hexadécyltriméthyl ammonium (cétrimide).....	0,2 g
Acide nalidixique.....	0,015 g

3.1.1.2 Préparation

Mettre en suspension la peptone, l'hydrolysate 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.

3.2 Milieux de confirmation et réactifs

3.2.1 Milieu de King B

3.2.1.1 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 équivalent).....	1 000 ml

3.2.1.2 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 les utiliser dans les trois (3) mois.

3.2.2 Bouillon d'acétamide

3.2.2.1 Composition

Solution A

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 équivalent, exempte 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

3.2.2.2 Préparation

Pour préparer le bouillon d'acétamide, ajouter 1 ml de la solution (B) à 900 ml d'une solution (A) fraîchement préparée (3.2.2.1). Ajouter de l'eau sous agitation constante jusqu'à obtention d'un volume total de 1 litre.

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 les utiliser dans les trois (3) mois.

3.2.3 Gélose nutritive

3.2.3.1 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

3.2.3.2 Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau par chauffage. Stériliser à l'autoclave à $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ 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 $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ et les utiliser dans un délai d'un mois.

3.2.4 Réactif pour la recherche de l'oxydase**3.2.4.1 Composition**

Dichlorhydrate de tétraméthyle-*p*-phénylènediamine.....0,1 g
Eau.....10 ml

3.2.4.2 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.

3.2.5 Réactif de Nessler**3.2.5.1 Composition**

Chlorure mercurique (HgCl_2).....10 g
Iodure de potassium (KI).....7 g
Hydroxyde de sodium (NaOH).....16 g
Eau (exempte d'ammoniac).....jusqu'à 100 ml

Dissoudre 10g de HgCl_2 et 7 g de KI dans une petite quantité d'eau, puis en agitant, ajouter ce mélange lentement à une solution d'eau froide de 16 g de NaOH dissous dans 50 ml d'eau. Diluer à 100 ml. Conserver dans de la verrerie borosilicatée fermée par un bouchon en caoutchouc à l'abri de la lumière du soleil, pendant une durée maximale d'un an.

Note : Le chlorure mercurique (HgCl_2) est toxique - éviter toute ingestion.

4. APPAREILLAGE ET VERRERIE

Utiliser le matériel courant des laboratoires de microbiologie.

4.1 Verrerie

Avant utilisation, stériliser toute la verrerie à $(170 \pm 5)^\circ\text{C}$ pendant 1 h, au four ou à $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ pendant 15 min, à l'autoclave.

4.2 Incubateur, réglable à $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$.

4.3 Lampe à rayonnement ultraviolet, pouvant émettre un rayonnement d'une longueur d'onde de $(360 \pm 20) \text{ nm}$.

4.4 Membranes filtrantes stériles, ayant une porosité nominale de $0,45 \mu\text{m}$.

5. ECHANTILLONNAGE

L'échantillonnage se fait dans les conditions appropriées.

6. MODE OPÉRATOIRE**6.1 Généralités**

Appliquer la technique de filtration sur membrane décrite dans la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales.

6.2 Filtration sur membrane

Filtrer des volumes de l'échantillon d'eau ou des portions d'une dilution sur une membrane filtrante stérile en esters de cellulose de diamètre de pore nominal de $0,45 \mu\text{m}$. Comme spécifié dans la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales, placer chaque membrane sur une boîte de Petri contenant de la gélose avec supplément CN (3.1) en veillant à ne pas emprisonner d'air sous la membrane.

6.3 Incubation des boîtes

Incuber les boîtes de Petri à $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ pendant $(44 \pm 4) \text{ h}$ dans des récipients et protéger contre toute dessiccation.

6.4 Examen des membranes

Examiner les membranes pour vérifier la croissance des cultures après $(22 \pm 2) \text{ h}$ et $(44 \pm 4) \text{ h}$.

Compter toutes les colonies produisant une pigmentation bleu-vert (pyocyanine) comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés.

Examiner les membranes sous rayonnement ultraviolet. Il convient d'éviter toute exposition prolongée à l'éclairage UV car les colonies peuvent être tuées et donc ne pas se développer sur les milieux de confirmation. Compter les colonies ne produisant pas de pyocyanine et donnant lieu à une fluorescence comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés et confirmer leur identité en utilisant le bouillon d'acétamide décrit ci-après.

Compter toutes les autres colonies produisant une pigmentation brune-rougeâtre et ne produisant pas de fluorescence comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés et confirmer leur identité en utilisant un test oxydase, le bouillon d'acétamide et le milieu de King B décrit ci-après. La lecture après $(22 \pm 2) \text{ h}$ est réalisée dans le cas de colonies envahissantes, lesquelles peuvent apparaître au bout de $(44 \pm 4) \text{ h}$. Il est recommandé de prendre en compte le dénombrement le plus élevé pour calculer le nombre de « *Pseudomonas aeruginosa* » décrit en (7).

Le Tableau 1 récapitule la sélection des colonies et les étapes de confirmation.

Tableau 1 - Étapes requises pour la confirmation des colonies se développant sur la gélose CN

Description des colonies sur gélose CN	Ammoniac à partir d'acétamide	Production d'oxydase	Fluorescence sur milieu King B	Confirmés comme <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Bleu-vert	NT ^a	NT	NT	OUI
Fluorescence (pas bleu-vert)	+	NT	NT	OUI
Brun rougeâtre	+	+	+	OUI
Autres types	NT	NT	NT	NON

^a NT : Non testé.

6.5 Confirmation

6.5.1 Gélose nutritive

Repiquer toutes les colonies nécessitant une confirmation ou, si cela est irréalisable, autant de colonies que possible (la méthode de dénombrement des micro-organismes sur milieu de culture, lignes directrices générales à partir de la membrane et incubé pendant (22 ± 2) h à (36 ± 2) °C). Vérifier la pureté des repiquages et soumettre les colonies initialement brunes-rougeâtres au test de recherche de l'oxydase (6.5.2).

6.5.2 Test oxydase

Verser 2 ou 3 gouttes de réactif pour la recherche de l'oxydase (3.2.4) fraîchement préparé sur un morceau de papier-filtre placé dans une boîte de Petri.

À l'aide d'une anse métallique en platine (pas en Nichle-chrome) ou en plastique, d'une baguette ou d'une pipette en verre, étaler une partie de la culture sur le papier-filtre préparé. La réaction est considérée comme positive lorsqu'une coloration bleu-pourpre foncé apparaît dans les 10 s. Il est également possible d'utiliser des tests oxydase disponibles dans le commerce en suivant les instructions du fabricant.

6.5.3 Milieu de King B

Repiquer les colonies brunes rougeâtres oxydase positive obtenues en (6.5.1) sur un milieu de King B et incubé cinq jours au plus, à une température de (36 ± 2) °C. Examiner quotidiennement la culture sous un rayonnement UV et noter la présence d'une éventuelle fluorescence. Enregistrer comme positive toute fluorescence apparue dans les cinq jours.

6.5.4 Bouillon d'acétamide

Ensemencer un tube à l'aide du repiquage obtenu en (6.5.1) et incubé à (36 ± 2) °C pendant (22 ± 2) h. Ajouter 1 ou 2 gouttes de réactif de Nessler (3.2.5) et examiner les tubes afin de déceler une production éventuelle d'ammoniac se traduisant par une coloration allant du jaune au rouge brique, selon la concentration.

6.5.5 Dénombrement

Compter comme « *Pseudomonas aeruginosa* » confirmés toutes les colonies produisant de la pyocyanine (pigmentation bleu-vert) ou oxydase positive, donnant lieu à une fluorescence sous rayonnement UV (6.4) et (6.5.3.) et capables de produire de l'ammoniac à partir d'acétamide (6.5.4).

Note — Les colonies qui présentent une fluorescence sur la première membrane sont toujours oxydase positive et n'ont donc pas besoin d'être soumises au test oxydase (Tableau 1).

7. EXPRESSION DES RESULTATS

A partir du nombre de colonies caractéristiques dénombrées sur les membranes et en tenant compte du nombre d'essais de confirmation réalisés, calculer le nombre de « *Pseudomonas aeruginosa* » confirmés présents dans un volume d'eau déterminé. Pour l'eau minérale, l'eau de source et les autres eaux en bouteille, le volume est de 250ml. Pour les autres eaux, le volume est généralement de 100 ml.

Calculer le nombre de « *Pseudomonas aeruginosa* » par volume d'échantillon d'eau étudié comme suit :

$$P + F (CF / nF) + R (CR / nR)$$

P : est le nombre de colonies bleu-vert, toutes ayant été comptées comme cibles confirmées ;

F : est le nombre de colonies fluorescentes ;

R : est le nombre de colonies brun rougeâtre ;

nF : est le nombre de colonies fluorescentes ayant fait l'objet d'une détection de production d'ammoniac ;

CF : est le nombre de colonies fluorescentes ayant produit de l'ammoniac ;

nR : est le nombre de colonies brun rougeâtre ayant fait l'objet d'une détection de production d'ammoniac, d'une recherche de l'oxydase et de fluorescence sur le milieu de King B ;

CR : est le nombre de colonies brun rougeâtre ayant produit de l'ammoniac, oxydase positive et fluorescentes sur le milieu de King B.

Une autre solution consiste à exprimer les résultats qualitativement en indiquant la présence ou l'absence de « *Pseudomonas aeruginosa* » dans le volume d'eau étudié.

Note A

Informations complémentaires sur « *Pseudomonas aeruginosa* »

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

C'est une bactérie Gram négative, non sporulée, oxydase positive et catalase positive. Elle présente un métabolisme oxydatif tel qu'indiqué par l'essai selon Hugh et Leifson, réduit généralement les nitrates au-delà des nitrites et produit de l'ammoniac à partir de la dégradation de l'acétamide.

La plupart des souches (98 %) produisent un pigment fluorescent soluble dans l'eau. La majorité des souches sont capables de croître à 42 °C mais pas à 4 °C, ce qui différencie « *Pseudomonas aeruginosa* » de « *Pseudomonas fluorescens* » qui croît à 4 °C et non à 42 °C. Elle liquéfie la gélatine et hydrolyse la caséine mais pas l'amidon. Plus de 90 % des souches produisent le pigment pyocyanine (bleu-vert).

Note B

Autres milieux

Il est possible d'utiliser d'autres milieux que la gélose nutritive à condition qu'ils ne soient pas sélectifs et qu'ils ne contiennent pas d'hydrate de carbone fermentescible.