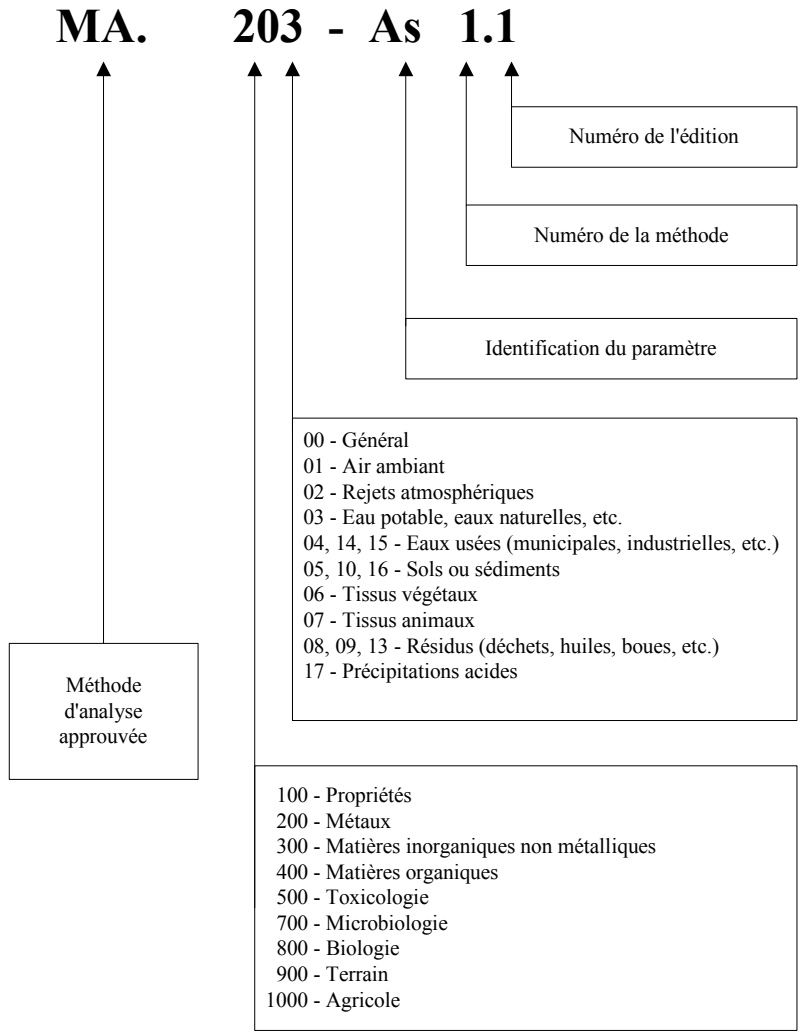


MA. 700 – Ecctmi 1.0
Édition : 2004-09-10

Méthode d'analyse

Recherche et dénombrement simultanés des coliformes totaux et d'*Escherichia coli* dans l'eau potable avec le milieu de culture MI : méthode par filtration sur membrane

Exemple de numérotation :



ÉDITION APPROUVÉE LE : 10 septembre 2004

Historique de la méthode

Cette méthode a été implantée et validée dans les laboratoires du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) pour la recherche et le dénombrement simultanés des coliformes totaux et d'*Escherichia coli* dans des échantillons d'eau potable. Elle correspond à la méthode USEPA 821-R-02-024 *Method 1604: Total Coliforms and Escherichia coli in Water by Membrane Filtration Using a Simultaneous Detection Technique (MI Medium)* (USEPA, 2002).

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Recherche et dénombrement simultanés des coliformes totaux et d'*Escherichia coli* dans l'eau potable avec le milieu de culture MI : méthode par filtration sur membrane. MA. 700 – Ecctmi. 1.0, Ministère de l'Environnement du Québec, 2004, 25 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
1. DOMAINE D'APPLICATION	8
2. PRINCIPE ET THÉORIE	8
3. FIABILITÉ	9
3.1. Interférence	9
3.2. Limite de détection	10
3.3. Limite de quantification	10
3.4. Fidélité	10
3.5. Sélectivité	11
3.6. Spécificité	11
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	12
5. APPAREILLAGE	12
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	13
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	16
7.1. Préparation des échantillons	16
7.2. Analyse de l'échantillon	17
7.3. Observation des résultats	18
7.4. Confirmation	19
8. EXPRESSION DES RÉSULTATS	20
8.1. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	20
8.2. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	21
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	24
10. BIBLIOGRAPHIE	24
Annexe 1 - Liste des espèces bactériennes appartenant au groupe des coliformes totaux (tirée de la méthode MA. 700 – Col 1.0)	25

INTRODUCTION

Dans un monde idéal, il serait possible de boire l'eau directement des sources souterraines ou l'eau des lacs et des rivières. Malheureusement, les rejets d'eaux usées domestiques, l'épandage de fumiers et de lisiers, les installations septiques défectueuses et les déjections animales peuvent entraîner des microorganismes pathogènes dans l'eau et la rendre impropre à la consommation. Ces microorganismes pathogènes peuvent être des virus, des bactéries ou des protozoaires disséminés dans l'environnement par les matières fécales humaines et animales.

Afin de protéger la santé publique à l'égard des microorganismes pathogènes, plusieurs moyens ont été mis en place. De manière générale, l'eau est traitée et sa qualité microbiologique est vérifiée régulièrement. Cet examen de la qualité microbiologique de l'eau est effectué au moyen de microorganismes indicateurs, puisqu'il n'est pas possible de rechercher tous les microorganismes pathogènes à la fois en raison de contraintes techniques et financières. Les microorganismes indicateurs de contamination fécale possèdent plusieurs des caractéristiques suivantes :

- la densité des microorganismes indicateurs est généralement proportionnelle au degré de pollution de l'eau par les matières fécales;
- lorsque des microorganismes pathogènes d'origine intestinale sont présents dans l'échantillon, les microorganismes indicateurs sont aussi présents, et généralement en plus grand nombre que les microorganismes pathogènes;
- les microorganismes indicateurs sont toujours présents dans l'intestin des humains et des animaux à sang chaud et ils sont éliminés en grande quantité dans les matières fécales;
- la survie des microorganismes indicateurs dans l'environnement est généralement équivalente à celle des microorganismes pathogènes;
- une relation existe entre la présence des microorganismes indicateurs et l'apparition de maladies d'origine hydrique;
- les microorganismes indicateurs sont sans danger pour les humains et ils peuvent être dénombrés par des techniques de laboratoire relativement simples.

Au Québec, le contrôle de la qualité microbiologique de l'eau potable repose aussi sur l'utilisation de microorganismes indicateurs. Dans les normes québécoises, l'espèce *Escherichia coli* et les coliformes totaux occupent une place prépondérante.

Le groupe des coliformes totaux inclut des espèces bactériennes qui résident dans l'intestin des animaux à sang chaud ainsi que de manière naturelle dans les sols, la végétation et l'eau des sources, des lacs et des rivières. Ces bactéries peuvent aussi coloniser le biofilm présent dans tout système de distribution d'eau potable. Auparavant, les coliformes totaux constituaient le principal indicateur de contamination microbiologique de l'eau potable et la présence de plus de 10 coliformes totaux par 100 ml entraînait un avis d'ébullition (*Règlement sur l'eau potable*, publié en 1984). Aujourd'hui, on considère que la présence des coliformes totaux dans l'eau distribuée indique plutôt une dégradation de la qualité bactérienne de l'eau. Ce sont maintenant

les coliformes fécaux ou l'espèce *Escherichia coli* qui sont les indicateurs qui conduisent à un avis d'ébullition.

Escherichia coli est une espèce bactérienne appartenant au groupe des coliformes totaux. Cette bactérie est toujours trouvée dans les matières fécales des animaux à sang chaud, mais, à la différence des coliformes totaux, elle n'est pas présente de manière naturelle dans l'environnement et ne colonise pas le biofilm des réseaux de distribution. *Escherichia coli* est donc un indicateur spécifique d'une contamination fécale et sa présence dans l'eau indique la présence possible de microorganismes pathogènes entériques.

Le *Règlement sur la qualité de l'eau potable* (RQEP), entré en vigueur en 2001, contient des normes pour les coliformes totaux, les colonies atypiques observées lors de l'analyse des coliformes totaux ainsi que des normes pour *Escherichia coli*. Lorsque la méthode d'analyse employée pour les coliformes totaux permet leur dénombrement, la présence de plus de 10 UFC/100 ml ou la présence de coliformes totaux dans plus de 10 % des échantillons prélevés pendant 30 jours consécutifs entraîne une non-conformité au RQEP. Par ailleurs, la présence de plus de 200 colonies atypiques par membrane lors de l'analyse des coliformes totaux avec la technique de la membrane filtrante amène aussi une non-conformité au RQEP. Un processus de retour à la conformité, incluant entre autres des analyses supplémentaires aux contrôles bactériologiques habituels, est alors exigé. Selon le RQEP, l'eau ne doit pas contenir d'*Escherichia coli*. Sa présence dans un seul échantillon, peu importe la quantité, entraîne automatiquement un avis d'ébullition ainsi qu'un processus de retour à la conformité incluant des mesures correctives. Il est à noter que les coliformes fécaux apparaissent encore dans la version 2001 du RQEP comme indicateurs sanitaires et que la présence de cet indicateur entraîne les mêmes mesures que la présence d'*Escherichia coli*.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode permet de détecter et de dénombrer les coliformes totaux ainsi que l'espèce *Escherichia coli* (*E. coli*) dans les échantillons d'eau relativement propre telle que l'eau potable. Elle peut être utilisée pour le contrôle de la qualité de l'eau potable selon les normes du RQEP. Cette méthode ne permet pas le dénombrement des coliformes fécaux ni l'identification des souches pathogènes d'*E. coli*.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La technique de la membrane filtrante consiste à filtrer un volume plus ou moins grand d'eau à travers une membrane stérile contenant des pores de 0,45 µm. Les coliformes totaux et *E. coli* sont retenus sur la membrane. Celle-ci est alors déposée sur le milieu de culture sélectif et différentiel MI qui est incubé à une température de 35 °C pendant 24 h pour permettre la croissance des colonies.

Le milieu de culture MI contient du MUGal (4-methylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside) et de l'IBDG (indoxyl-β-D-glucuronide). Lorsque des coliformes totaux sont présents dans l'échantillon, le MUGal est utilisé par l'enzyme β-D-galactosidase, un enzyme spécifique au groupe des coliformes totaux. Les colonies bactériennes qui utilisent le MUGal deviennent fluorescentes

sous un éclairage ultraviolet (365 nm) et constituent des coliformes totaux. Lorsque *E. coli* est présent dans l'échantillon, l'IBDG est utilisé par l'enzyme β -D-glucuronidase, une enzyme spécifique à *E. coli*. Les colonies qui utilisent l'IBDG deviennent bleues (éclairage normal) et appartiennent à l'espèce *E. coli*.

Le peptone de protéose n° 3 et l'extrait de levure sont des ingrédients habituels des milieux de culture. Ils servent à soutenir la croissance des bactéries. Le D-lactose est utilisé comme source de carbone et d'énergie et sert également à induire la production de l'enzyme β -D-galactosidase par les coliformes totaux. Les sels (NaCl , K_2HPO_4 et KH_2PO_4) servent de nutriments généraux ainsi qu'à maintenir un pH neutre afin de prévenir les effets néfastes de la production d'acide à la suite de l'utilisation du lactose et des autres nutriments.

Le lauryl sulfate de sodium et le désoxycolate de sodium servent à inhiber la croissance des coques à Gram positif et des bactéries sporulées. L'antibiotique cefsulodine est utilisé pour inhiber les bactéries à Gram positif et quelques bactéries à Gram négatif telles que *Aeromonas sp.*

Il est à noter que cette méthode sert à détecter l'*E. coli* « générique » et qu'elle ne permet pas de détecter et d'identifier les souches pathogènes d'*E. coli* telles que la bactérie *E. coli* O157:H7, qui est β -D-glucuronidase négative.

3. FIABILITÉ

3.1. INTERFÉRENCE

Les bouteilles d'échantillonnage de 250 ml remplies à pleine capacité ne permettent pas d'agiter l'échantillon et de disperser uniformément les bactéries présentes dans tout le volume initial. Le rejet d'une portion de l'échantillon au laboratoire risquerait de modifier la concentration initiale des bactéries par unité de volume de l'échantillon et de fausser le résultat. L'analyse d'échantillons de ce genre doit faire l'objet d'une remarque à cet effet dans le rapport d'analyse.

La présence de matières en suspension (alumine, argile, substances ferrugineuses, etc.) peut nuire à la filtration en colmatant la membrane. Les matières en suspension accumulées sur la membrane peuvent également entraver l'observation des colonies en masquant ou en inhibant la croissance des coliformes totaux ou d'*E. coli*. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée afin de filtrer le volume d'échantillon requis.

Le milieu MI doit être conservé à 4 °C à l'abri de la lumière pendant une période d'entreposage maximale de deux semaines et l'incubation doit se faire aussi à l'abri de la lumière. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une diminution appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu en raison notamment de la diminution de l'efficacité de l'antibiotique cefsulodine. De son côté, la lumière peut dégrader les substrats enzymatiques.

Sur les membranes contenant moins de 200 colonies de toutes sortes, les colonies de moins de 0,5 mm, qui sont petites, plates ou pointues en tête d'épingle, et bleues, peuvent être d'une autre espèce qu'*E. coli*. Elles sont rarement présentes dans le milieu et sont toujours accompagnées de

colonies plus grosses d'*E. coli* (Brenner *et al.* 1993). Il est recommandé de procéder à des confirmations sur ces colonies.

Les colonies vert brillant, fluorescentes, qui ne sont pas bleues, ne sont pas nécessairement des coliformes totaux. Il est recommandé de faire des confirmations sur ces colonies avant de les inclure dans le compte des coliformes totaux. Une augmentation du nombre de ces colonies vert brillant peut indiquer la présence d'une population bactérienne inhabituelle ou la perte d'efficacité de la cefsulodine (Brenner *et al.*, 1993).

3.2. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection pour cette méthode est de 1 UFC (unité formant des colonies) par volume ou dilution filtrée.

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification pour cette méthode se situent entre 20 et 80 colonies cibles (coliformes totaux et *E. coli*) par membrane. Le nombre total de colonies de toutes sortes (coliformes totaux, *E. coli* et colonies de fond) doit être inférieur à 200 par membrane. De plus, lorsqu'il y a une croissance abondante d'organismes, spécifique ou non, le résultat peut être non quantifiable. Le résultat est alors rapporté de la façon suivante :

TNI : colonies trop nombreuses pour être identifiées

3.4. FIDÉLITÉ

Les résultats de la validation primaire de cette méthode, c'est-à-dire les résultats obtenus lors de l'élaboration de la méthode, ont été publiés par Brenner *et al.* (1993, 1996) et sont rapportés dans cette section.

Lors de l'implantation de cette méthode dans son laboratoire, le CEAEQ a vérifié dans le contexte d'une validation secondaire qu'il était en mesure d'utiliser la méthode selon les spécifications obtenues lors de la validation primaire. Les résultats de la validation secondaire réalisée par le CEAEQ sont rapportés dans cette section.

3.4.1. Répétabilité

Lors de la validation primaire de la méthode, Brenner *et al.* (1993) ont obtenu des coefficients de variation respectifs de 25,1 et 17,6 % pour *E. coli* et pour les coliformes totaux. Ces résultats se rapportaient à un seul laboratoire.

Un test de répétabilité intertechniciens a été réalisé dans le laboratoire du CEAEQ en mars 2004. Quatre techniciens ont analysé chacun dix replica de 100 ml d'un échantillon d'eau usée diluée. Les coefficients de variation (rapport de l'écart type sur la moyenne) de l'ensemble des techniciens ont été de 26 % pour *E. coli* et de 12 % pour les coliformes totaux, et ce, pour des dénombrements moyens respectifs de 16 UFC/100 ml et de 68 UFC/100 ml.

Lors d'une validation touchant 19 laboratoires et 6 échantillons d'eau potable contaminée avec de l'eau usée, le coefficient de variation pour un seul laboratoire a été de 3,3 à 27,3 % (selon le niveau de contamination des échantillons) pour *E. coli* (Brenner *et al.*, 1996). Pour les coliformes totaux, le coefficient de variation pour un seul laboratoire a été de 2,5 à 5,1 %.

3.4.2. Reproductibilité

Lors d'une validation réalisée par 19 laboratoires sur 6 échantillons d'eau potable contaminée avec de l'eau usée, le coefficient de variation pour l'analyse d'*E. coli* pour l'ensemble des laboratoires a été de 8,6 à 40,5 % selon les échantillons (Brenner *et al.*, 1996). Pour les coliformes totaux, le coefficient de variation a été de 6,9 à 27,7 % selon les échantillons (Brenner *et al.*, 1996).

À la suite de sa participation à l'évaluation de la performance de l'Association canadienne des laboratoires d'analyses et d'essais (ACLAE) en mars 2004, le CEAEQ a obtenu une note de 100 % pour ses résultats d'analyse avec le milieu MI pour quatre échantillons contenant l'espèce *E. coli* et des coliformes totaux et a été reconnu compétent par l'ACLAE.

3.5. SÉLECTIVITÉ

Lors de travaux réalisés au CEAEQ, l'observation de 37 colonies bleues ou fluorescentes ou bleues et fluorescentes, de 707 colonies fluorescentes et de 283 colonies ni bleues ni fluorescentes lors de l'analyse de 27 échantillons d'eau potable sur le milieu MI a donné un indice de sélectivité de 0,72. La sélectivité d'un milieu augmente lorsque cet indice se rapproche de l'unité (1).

3.6. SPÉCIFICITÉ

3.6.1. *E. coli*

Lors de la validation primaire (Brenner *et al.*, 1993), 95,7 % (66/69) des colonies bleues appartenaient à l'espèce *E. coli*, le taux de faux positifs pour les colonies d'*E. coli* a été de 4,3 % (3/69) et le taux de faux négatifs pour *E. coli* a aussi été de 4,3 % (3/69). Les trois colonies de faux négatifs étaient des colonies fluorescentes typiques des coliformes totaux.

Lors de la validation secondaire réalisée au CEAEQ, 100 % (32/32) des colonies bleues vérifiées répondaient à nos critères de confirmation (oxydase négative, ONPG positif et MUG positif). Cent pour cent (13/13) des colonies bleues identifiées avec des galeries biochimiques d'identification Microscan Gram Negative[®] appartenaient à l'espèce *E. coli*. Selon nos critères de confirmation, le taux de faux positifs a été de 0 % (0/32) et le taux de faux négatifs a été de 3 % (1/33). Une colonie fluorescente non bleue s'est avérée être oxydase négative, ONPG positive et MUG positive et appartenir à l'espèce *E. coli* selon l'identification par galerie biochimique.

3.6.2. Coliformes totaux

Lors de la validation primaire (Brenner *et al.*, 1993), 100 % des colonies fluorescentes ou bleues ou les deux appartenaient à l'un ou l'autre des genres identifiés à l'annexe 1. Le taux de faux positifs pour les colonies de coliformes totaux a été de 0 % (0/173) et le taux de faux négatifs a été de 19 % (42/215). Les faux négatifs étaient des colonies de fond.

Lors de la validation secondaire au CEAEQ, 97,9 % des colonies fluorescentes étaient des coliformes totaux, c'est-à-dire qu'il s'agissait de colonies oxydase négative et ONPG positive. Le taux de faux positifs pour les colonies de coliformes totaux a été de 2,1 % (4/190), le taux de faux négatifs a été de 26 % (67/253). Les colonies de faux négatifs étaient des colonies de fond.

3.6.3. Colonies atypiques

Lors de la validation primaire (Brenner *et al.*, 1993), 35 % (23/65) des colonies atypiques (Brenner parle de colonies de fond pour désigner ce que nous appelons les colonies atypiques) n'appartenaient pas à l'un ou l'autre des genres identifiés à l'annexe 1, alors que 65 % (42/65) des colonies atypiques appartenaient à l'un ou l'autre des genres identifiés à l'annexe 1.

Lors de la validation secondaire au CEAEQ, 20 % (17/84) des colonies atypiques n'étaient pas des coliformes totaux et 80 % des colonies atypiques étaient des coliformes totaux (oxydase négative et ONPG positive).

4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Le prélèvement et la conservation des échantillons doivent être réalisés selon les instructions du document « Mode de prélèvement et de conservation des échantillons relatifs à l'application du Règlement sur la qualité de l'eau potable », DR-09-03.

Par ailleurs, une étude réalisée dans nos laboratoires sur les eaux de consommation a permis d'établir que le délai maximal admissible pour l'analyse est de 48 heures après le prélèvement et que l'échantillon devait être protégé contre les effets de la température à l'aide d'un isolant thermique ou être réfrigéré pendant le transport.

À leur réception au laboratoire, les échantillons qui ne sont pas analysés dans les 4 heures qui suivent leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur analyse.

Les échantillons reçus congelés, dans des contenants non conformes ou selon des délais de prélèvement inacceptables (> 48 heures) ne doivent pas être analysés.

5. **APPAREILLAGE**

5.1. Stérilisateur à rayons ultraviolets

5.2. Boîtes de Pétri d'environ 49 mm x 9 mm

5.3. Membranes filtrantes stériles quadrillées de porosité de 0,45 µm et de 47 mm de diamètre

- 5.4. Pincettes en acier inoxydable à bouts plats
- 5.5. Pipettes stériles de 10,0 ml et 1,0 ml de type TD
- 5.6. Thermomètre permettant une lecture à 0,5 °C
- 5.7. Tubes à essais de 16 mm x 125 mm avec bouchons
- 5.8. Fil à boucle
- 5.9. Stéréoscope
- 5.10. Autoclave
- 5.11. Incubateur dont la température est ajustée à 35 °C ± 0,5 °C
- 5.12. Balance analytique avec une précision de 0,0001 g
- 5.13. Rampe de filtration avec entonnoirs et supports de filtres
- 5.14. pH-mètre
- 5.15. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.16. Réfrigérateur maintenant une température entre 1 °C et 4 °C
- 5.17. Pompe à vide
- 5.18. Hygromètre
- 5.19. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.20. Bouteilles de 150 ml avec bouchon
- 5.21. Lampe à ultraviolets d'une longueur d'onde de 365 nm et d'une puissance de 4 ou 6 W
- 5.22. Chambre d'observation à rayons ultraviolets
- 5.23. Disque de filtration de 0,2 µm monté sur une seringue jetable de 10 ml

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité A.C.S., à moins d'indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultra-pure. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

- 6.1. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)
Solution commerciale 10 N.
- 6.2. Acide chlorhydrique, HCl (CAS n° 7647-01-0)

Solution commerciale 1 N.

- 6.3. Phosphate de potassium anhydre, KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)
- 6.4. Bandelettes pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase
Pathotec[®] cytochrome-oxydase, Remel[®].
- 6.5. Milieu de culture Colilert[®], format P/A 100 ml, Idexx Laboratories[®]
- 6.6. Cefsulodine
- 6.7. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

Ajouter 100 ml de la solution commerciale de NaOH 10 N (*cf.* 6.1) dans environ 700 ml d'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à la température ambiante.

- 6.8. Gélose MI

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 36,5 g/l et sa formulation telle que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Peptone de protéose n° 3	5,0 g
Extrait de levure	3,0 g
D-Lactose	1,0 g
4-Methylumbelliferyl- β -D-galactopyranoside (MUGal)	0,1 g
Indoxyl- β -D-glucuronide (IBDG)	0,32 g
Chlorure de sodium	7,5 g
Phosphate de potassium dibasique	3,3 g
Phosphate de potassium monobasique	1,0 g
Lauryl sulfate de sodium	0,2 g
Désoxycholate de sodium	0,1 g
Agar	15,0 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 36,5 g de milieu déshydraté, ajouter 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $6,95 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (*cf.* 6.2) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.7). Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes, puis refroidir dans un bain-marie à 50 °C. Ajouter 5,0 ml d'une solution de cefsulodine (1 mg/ml) fraîchement préparée et stérilisée par filtration (*cf.* 6.6) pour une concentration finale dans le milieu MI de 5 μg /litre. Répartir en volumes de 4 ml dans des boîtes de Pétri de 49 mm x 9 mm et laisser solidifier.

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant deux semaines au maximum.

6.9. Gélose infusion cœur-cerveille

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 52,0 g/l et sa formulation telle que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Infusion de cervelle de veau	200,0 g
Infusion de cœur de bœuf	250,0 g
Protéose peptone	10,0 g
Bacto dextrose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Agar	15,0 g

NOTE - La gélose nutritive ou la gélose trypticase de soya peut aussi être utilisée comme milieu non sélectif de propagation.

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 52,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante à feu moyen jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (*cf.* 6.2) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.7). Répartir environ 8 ml dans des tubes de 6 × 125 mm pour former des géloses inclinées. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant quatre semaines au maximum.

6.10. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH_2PO_4 (*cf.* 6.3) anhydre dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (*cf.* 6.7) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.11. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (*cf.* 6.10) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de polypropylène ou encore des flacons laveurs et autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes. L'eau tamponnée de rinçage se conserve deux mois à 4 °C.

6.12. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (*cf.* 6.10) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de

90 ml \pm 2 ml après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

6.13. Préparation des tubes de milieu Colilert®

Verser le contenu d'un sachet de milieu Colilert® (cf. 6.5) dans 100 ml d'eau stérile. Répartir en volume de 2 ml dans des tubes à essais stériles de 16 mm x 125 mm avec bouchons. Ne pas autoclaver le milieu Colilert®. Ce milieu se conserve une semaine à 4 °C.

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillons, les recommandations des « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », DR-12-SCA-02, sont suivies et tous les éléments de contrôle et d'assurance de la qualité nécessaires sont réalisés en conformité à ces lignes directrices.

Il est recommandé que les entonnoirs et supports de filtre soient lavés et stérilisés aux rayons ultraviolets après toute série d'analyses ou interruption de travail supérieure à 15 minutes. La stérilisation aux rayons ultraviolets est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau.

Le lavage et la stérilisation à l'autoclave de l'équipement de filtration sont indispensables après l'analyse d'échantillons fortement contaminés (eaux de plages, lacs, eaux usées, etc.) et avant de poursuivre l'analyse d'échantillons peu contaminés (eau de consommation).

L'absence de coliformes totaux dans chaque entonnoir et support de filtre doit être vérifiée avant chaque série d'analyses. Procéder en rinçant la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 ml à 30 ml d'eau de rinçage (cf. 6.11). Filtrer sur une membrane stérile et incubé pendant 24 heures \pm 2 heures à 35 °C \pm 0,5 °C sur le milieu MI (cf. 6.8). La fréquence de ce contrôle peut dépendre de la qualité de l'eau analysée. En tout temps, les exigences prescrites par le document DR-12-SCA-02 doivent être respectées.

7.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Tous les échantillons d'eau ou les échantillons très liquides doivent être homogénéisés en agitant vigoureusement les bouteilles d'un mouvement vertical.

Les échantillons soupçonnés d'être plus contaminés (eaux brutes, eaux de puits de surface, captage de source, etc.) doivent être traités de façon à obtenir, pour un volume donné d'échantillon, entre 20 et 80 colonies cibles sur la membrane et ainsi permettre une lecture juste et rapide du nombre de colonies. Pour l'eau potable, un volume d'échantillon de 100 ml doit être vérifié, mais il peut être réparti en plusieurs volumes plus faibles sur plusieurs membranes.

Des dilutions en série peuvent aussi être effectuées de la façon suivante :

- en conditions aseptiques, pipetter 10 ml d'échantillon dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (1 : 10) ou encore 10 ml de la dilution 1 : 10 d'un échantillon solide dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (1 : 100);
- bien agiter la bouteille d'eau tamponnée de dilution afin d'homogénéiser son contenu;
- répéter cette opération jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (1 : 100, 1 : 1 000, 1 : 10 000, etc.);
- changer de pipette entre chaque dilution.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- Placer les entonnoirs et les supports dans le stérilisateur à rayons ultraviolets pendant 2 minutes.
- Mettre les supports et les entonnoirs sur la rampe de filtration.
- Mettre en fonction l'appareil à vide.
- Prendre une membrane filtrante stérile près du bord à l'aide d'une pincette stérilisée par flambage à l'alcool et la déposer ensuite sur le support de filtre.
- Placer l'entonnoir sur le support et le fixer fermement.
- Verser 100 ml de l'échantillon pour l'eau potable ou le volume approprié pour les cas particuliers. Pour les volumes de 10 ml ou moins, introduire de 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (cf. 6.11) dans l'entonnoir de filtration. Ensuite, prélever à l'aide d'une pipette stérile le volume d'échantillon désiré. Laisser couler l'échantillon en appuyant le bout de la pipette sur l'épaulement interne de l'entonnoir. Enlever la dernière goutte de la pipette à l'aide de la poire.
- Faire le vide pour filtrer l'échantillon.
- Rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 ml à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile (utiliser un flacon laveur). Rincer davantage s'il y a possibilité de forte contamination.
- Retirer l'entonnoir et déposer la membrane filtrante à l'aide d'une pince stérile sur une gélose MI (cf. 6.8).

NOTE - Déposer la membrane en la déroulant pour obtenir un contact étroit avec la gélose. La présence de bulles d'air est signalée par des taches blanches.
- Incrire sur la boîte de Pétri le numéro de l'échantillon et le volume filtré.

- Placer les boîtes de Pétri en position inversée dans un incubateur à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pendant 24 heures \pm 2 heures le plus tôt possible après la filtration. L'inversion des boîtes de Pétri empêche la condensation sur les membranes.

7.3. OBSERVATION DES RÉSULTATS

- Après la période d'incubation, sortir et ranger les boîtes de Pétri par ordre de numéro d'échantillon. L'observation des membranes s'effectue le plus tôt possible après leur sortie de l'incubateur.
- Choisir les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 80 colonies cibles et au maximum de 200 colonies de toutes sortes.
- Observer d'abord les boîtes de Pétri avec un éclairage normal pour vérifier la présence de colonies d'*E. coli*.
 - Les colonies d'*E. coli* sont bleues sous un éclairage normal.
 - Les colonies d'*E. coli* peuvent être visibles et dénombrables malgré la présence d'un tapis de croissance ou de > 200 colonies atypiques ou > 200 colonies de coliformes totaux. Cependant, l'absence de colonies bleues typiques d'*E. coli* lorsque la membrane est très chargée en colonies ne garantit pas l'absence de cette bactérie.
- Avec un éclairage normal, dénombrer les colonies de toutes sortes.
- Observer ensuite les boîtes de Pétri avec un éclairage fluorescent à 365 nm (cf. 5.21) pour vérifier la présence de coliformes totaux. Effectuer cette observation dans l'obscurité (cf. 5.22) lorsque la fluorescence n'est pas nette.
 - Les colonies de coliformes totaux sont fluorescentes.
 - Les colonies bleues (*E. coli*) sont aussi des coliformes totaux.
 - Le nombre de coliformes totaux est la somme des colonies bleues (fluorescentes ou non) et des colonies fluorescentes.
- Un résultat positif apparaissant avant une durée d'incubation de 24 heures est valide.
- Les résultats négatifs ne sont définitifs qu'après une période d'incubation de 24 heures.
- Un résultat négatif après 24 heures est valide.

En cas de doute, il est nécessaire de procéder à la confirmation décrite à la section 7.4.

Si la lecture est difficile, effectuer les observations à l'aide d'un stéréoscope aux grossissements de 10 X à 15 X. Placer la lampe à un angle minimum de 80° avec le plan de la lame de microscope. Ne pas vérifier la fluorescence avec le stéréomicroscope.

Inscrire sur la feuille de travail le nombre de colonies bleues, de colonies fluorescentes et de colonies atypiques (non bleues et non fluorescentes) correspondant au volume d'eau filtrée et reporter le résultat par 100 ml, tel que précisé à la section 8.

7.4. CONFIRMATION

Le degré de certitude avec lequel l'analyste doit préciser l'identification de la bactérie isolée détermine l'ampleur que prendra la confirmation. Elle peut être sommaire, indiquant l'appartenance ou non à l'espèce *E. coli* ou au groupe des coliformes totaux avec l'épreuve de l'oxydase, de l'ONPG et du MUG, ou être plus complète avec une identification à l'espèce à l'aide d'un système d'identification biochimique (système API 20E[®], système MicroScan[®], etc.).

7.4.1. Propagation des souches suspectes

Prélever une colonie bien isolée sur la gélose MI et effectuer une propagation de la souche par étalement sur gélose infusion cœur-cerveille inclinée (cf. 6.9). Placer dans un incubateur à 35,0 °C ± 0,5 °C pendant 18 à 24 heures.

7.4.2. Épreuve de la cytochrome-oxydase

À partir de la croissance présente sur la gélose de propagation, effectuer la détection de l'activité de la cytochrome-oxydase en faisant un frottis sur une bandelette pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase (cf. 6.4). *E. coli* et les coliformes totaux ne possèdent pas l'enzyme appelée cytochrome-oxydase, et produisent une réaction négative. Pour l'utilisation des bandelettes, voir les instructions du fabricant.

7.4.3. Épreuve de l'ONPG et du MUG (Colilert[®])

Cette double épreuve combinée de l'ONPG et du MUG s'effectue à l'aide du milieu Colilert[®] (cf. 6.5).

Inoculer un tube de milieu Colilert[®] avec la croissance obtenue en 7.4.1 et placer le tube dans un incubateur à 35,0 °C ± 0,5 °C pendant 24 heures ± 2 heures.

Après ce délai, une coloration jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et confirme la présence de coliformes totaux. Une fluorescence observée à l'aide de la lampe ultraviolette indique la métabolisation du MUG et confirme la présence d'*E. coli*. Il est cependant possible d'effectuer l'observation des tubes après 4 heures d'incubation. Si la réaction est négative, on doit poursuivre l'incubation jusqu'à 24 heures.

Un milieu incolore correspond à une réaction négative et confirme une colonie de bactéries non coliforme.

7.4.4. Pourcentage de confirmation

Inscrire sur la feuille de travail le nombre et le pourcentage des colonies qui, selon la confirmation précédente, sont reconnues coliformes totaux ou *E. coli*. Établir le pourcentage de confirmation comme suit :

$$\% \text{ de confirmation} = \frac{\text{Nombre de colonies confirmées}}{\text{Nombre de colonies testées}} \times 100$$

Exemple :

Si 5 colonies sur le milieu MI ont été soumises aux étapes de confirmation et si 3 de ces colonies se sont révélées être des coliformes totaux selon les critères du test, le pourcentage de confirmation est le suivant :

$$\% \text{ de confirmation} = \frac{3}{5} \times 100 = 60 \%$$

8. **EXPRESSION DES RÉSULTATS**

De façon générale, choisir la ou les membranes ayant ≤ 200 colonies au total et ≤ 80 colonies cibles. Exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 ml d'échantillon selon les équations générales suivantes :

$$E. coli \text{ (UFC / 100 ml)} = \frac{\text{Nombre de colonies bleues (fluorescentes ou non)}}{\text{Volume d'échantillon analysé en ml}} \times 100$$

$$\text{Coliformes totaux (UFC/100 ml)} = \frac{\text{Nb de colonies bleues (fluorescentes ou non) et de colonies fluorescentes}}{\text{Volume d'échantillon analysé en ml}} \times 100$$

Dans le cas où les colonies atypiques sont confirmées, il faut additionner aux résultats précédents le nombre de colonies d'*E. coli* ou de coliformes totaux ou les deux qui ont été confirmées, en tenant compte du pourcentage de confirmation (cf. 7.4.3) :

$$\text{UFC/100 ml (E. coli ou coliformes totaux)} = \text{UFC/100 ml (colonies atypiques confirmées)} \times \% \text{ de confirmation}$$

8.1. DÉNOMBREMENT À L'INTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

Calculer le résultat en ne retenant que les membranes sur lesquelles il y a de 20 à 80 colonies.

Exemples :

- 1) Si des volumes filtrés de 100 ml, 50 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml d'un échantillon produisent respectivement des dénombrements de 200, 110, 25, 4 et 1 colonies, choisir la membrane

sur laquelle il y a 25 colonies (volume de 10 ml) et calculer le résultat à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{25}{10} \times 100 = 250 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

- 2) Si des volumes filtrés de 10,0 ml, 1,0 ml, 0,1 ml et 0,01 ml d'un échantillon produisent respectivement les résultats suivants : TNI, 55, 30 et 8 colonies, choisir les membranes sur lesquelles il y a 55 et 30 colonies (1,0 ml et 0,1 ml) :

$$\frac{55 + 30}{1,0 + 0,1} \times 100 = 7\,727 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.2. DÉNOMBREMENT À L'EXTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

8.2.1. Dénombrement lorsque le nombre de colonies isolées sur les membranes est inférieur à la limite de quantification

Additionner toutes les colonies sur l'ensemble des membranes, tout en tenant compte des volumes de l'échantillonensemencés et exprimer le résultat par 100 ml.

Exemples :

- 1) Si deux volumes filtrés de 50 ml d'un échantillon produisent respectivement 5 et 3 colonies :

$$\frac{5 + 3}{50 + 50} \times 100 = 8 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

- 2) Si des volumes filtrés de 50 ml, 10 ml et 1 ml d'échantillon produisent respectivement 15, 4 et 0 colonies :

$$\frac{15 + 4 + 0}{50 + 10 + 1} \times 100 = 31 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.2.2. Dénombrement lorsque aucune colonie n'a été isolée sur les membranes correspondant à plusieurs volumes filtrés d'un échantillon

Calculer le résultat à l'aide du volume d'échantillon filtré le plus grand.

Exemple :

Si des volumes filtrés de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml d'un échantillon produisent tous des dénombrements de 0 colonie, calculer le nombre de colonies par 100 ml qui aurait été rapporté s'il y avait eu 1 colonie sur la membrane du plus grand volume d'échantillon filtré :

$$\frac{1}{10} \times 100 = 10 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

$$< 10 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.2.3. Dénombrement lorsque tous les résultats de plusieurs volumes filtrés d'un échantillon sont au-delà de la limite supérieure de quantification

Calculer le résultat à l'aide de la limite de quantification et du plus petit volume d'échantillon filtré utilisé.

Exemple :

Si des volumes de 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml produisent respectivement les résultats suivants : TNI, 150 et 110 colonies, ces dénombrements sont au-delà de la limite supérieure de quantification. Estimer le résultat à l'aide de la limite de quantification (80 pour les coliformes totaux) et du plus faible volume d'échantillon filtré (0,01 ml) :

$$\frac{80}{0,01} \times 100 = 800\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

$$> 800\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.2.4. Signification des résultats

Paramètre	Résultats apparaissant sur le certificat d'analyse	Signification des résultats
Colonies atypiques ^a	≤ 200 UFC	- Indique que l'analyse de l'échantillon est valide et que les résultats d' <i>E. coli</i> et des coliformes totaux sont fiables.
	> 200 UFC	- Suggère un doute sur la fiabilité des résultats et ce doute doit être interprété comme suit : <ul style="list-style-type: none"> - Lorsqu'une coloration bleue ou de la fluorescence sont visibles, on peut conclure sans doute à la présence d'<i>E. coli</i> ou de coliformes totaux. Cependant, on ne peut pas se fier à un dénombrement. - Lorsqu'il n'y a ni coloration bleue ni fluorescence, on ne peut pas conclure à l'absence d'<i>E. coli</i> ou de coliformes totaux. Il est recommandé de reprendre l'échantillonnage dans les plus brefs délais, et de fractionner le volume de 100 ml sur plusieurs membranes filtrantes (ex. : 2 × 50 ml, 4 × 25 ml, etc.)
Coliformes totaux	0 UFC	- Aucune colonie fluorescente ou bleue n'a été observée. - Aucune colonie atypique n'a été confirmée comme étant un coliforme total ou <i>E. coli</i> . - Le nombre total de colonies était ≤ 200 UFC.
	1-80 UFC	- Indique le nombre de colonies bleues (fluorescente ou non) et de colonies fluorescentes auxquelles a été additionné le nombre de colonies de fond confirmée coliformes totaux. - Le nombre total de colonies ≤ 200 UFC.
	> 80 ou TNC	- Indique que l'échantillon contient des colonies bleues (fluorescentes ou non) et de colonies fluorescentes en nombre supérieur à 80. - Le nombre total de colonies ≤ 200 UFC.
	Présence	- Indique que l'échantillon contient des colonies bleues (fluorescentes ou non) et de colonies fluorescentes, mais qu'elles ne sont pas dénombrables, soit en raison de leur confluence, soit en raison de la présence de > 200 colonies de toutes sortes. - Le nombre total de colonies peut être > 200 UFC.
	TNI	- Indique que le nombre élevé de colonies atypiques (généralement > 200 UFC) ne permet pas d'observer de colonies bleues (fluorescentes ou non) ou de colonies fluorescentes, ni d'exclure leur présence.
<i>Escherichia coli</i>	0 UFC	- Aucune colonie bleue n'a été observée. - Le nombre total de colonies était ≤ 200 UFC.
	1-80 UFC	- Indique le nombre de colonies bleues. - Le nombre total de colonies ≤ 200 UFC.
	> 80 ou TNC	- Indique que l'échantillon contient des colonies bleues en nombre supérieur à 80. - Le nombre total de colonies ≤ 200 UFC.
	Présence	- Indique que l'échantillon contient des colonies bleues, mais qu'elles ne sont pas dénombrables, soit en raison de leur confluence, soit en raison de la présence de > 200 colonies de toutes sortes. - Le nombre total de colonies peut être > 200 UFC.
	TNI	- Indique que le nombre élevé de colonies atypiques (généralement > 200 UFC) ne permet pas d'observer de colonies bleues, ni d'exclure leur présence.

^a Au Québec, on utilise l'appellation « colonies atypiques » pour désigner toute colonie qui ne présente pas l'apparence attendue pour la bactérie visée par un milieu de culture sélectif et différentiel. Brenner *et al.* (1993) utilisent plutôt l'expression « colonies de fond » (« background colonies » en anglais) pour désigner les colonies qui n'ont pas l'apparence attendue des coliformes totaux ou d'*E. coli*.

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les blancs d'entonnoir effectués au moment de l'analyse doivent démontrer l'absence de colonies de coliformes totaux, d'*E. coli* ou de tout autre microorganisme.

La température de l'incubateur doit être maintenue à $35\text{ °C} \pm 0,5$ pendant toute la durée de l'incubation.

Toutes les exigences précisées dans le document DR-12-SCA-02, intitulé « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », doivent être respectées.

10. BIBLIOGRAPHIE

APHA, AWWA, and WEF, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, 20th Edition, 1998, various pagings.

BRENNER, K.P., C.C. Rankin, and M. Sivaganesan, Interlaboratory Evaluation of MI Agar and the U.S. Environmental Protection Agency-Approved Membrane Filter Method for the Recovery of Total Coliforms and *Escherichia coli* from Drinking Water, Journal of Microbiological Methods, 1996, 27: 111-119.

BRENNER, K.P., C.C. Rankin, Y.R. Roybal, G.N. Stelma, P.V. Scarpino, and A.P. Dufour, New Medium for the Simultaneous Detection of Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water, Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(11): 3534-3544.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie, DR-12-SCA-02, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, Modes de prélèvement et de conservation des échantillons relatifs à l'application du Règlement sur la qualité de l'eau potable, DR-09-03, Ministère de l'Environnement du Québec, Édition courante.

MANAFI, M., New developments in chromogenic and fluorogenic culture media, Int. J. Food Microbiol., 60, 2000, p. 205-218.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC, Règlement sur la qualité l'eau potable, Gazette officielle du Québec, Partie 2, Lois et règlements, 133^e année, n^o 24, 13 juin 2001, p. 3561-3573.

USEPA, Method 1604: Total Coliforms and *Escherichia coli* in Water by Membrane Filtration Using a Simultaneous Detection Technique (MI Medium), USEPA, 2002, 821-R02-024.

**Annexe 1 - Liste des espèces bactériennes appartenant au groupe des coliformes totaux
(tirée de la méthode MA. 700 – Col 1.0)**

Arizona sp.

Cedecea sp.

Citrobacter amalonaticus

Citrobacter diversus

Citrobacter freundii

Enterobacter aerogenes

Enterobacter agglomerans

Enterobacter cloacae

Enterobacter gergoviae

Enterobacter intermedium

Enterobacter sakasaki

Escherichia coli

Hafnia alvei

Klebsiella oxytoca

Klebsiella ozanae

Klebsiella pneumoniae

Kluyvera sp.

Serratia ficaria

Serratia fonticola

Serratia liquefaciens

Serratia marcescens

Serratia odorifera

Serratia plymuthica

Serratia rubideae

Yersinia sp.