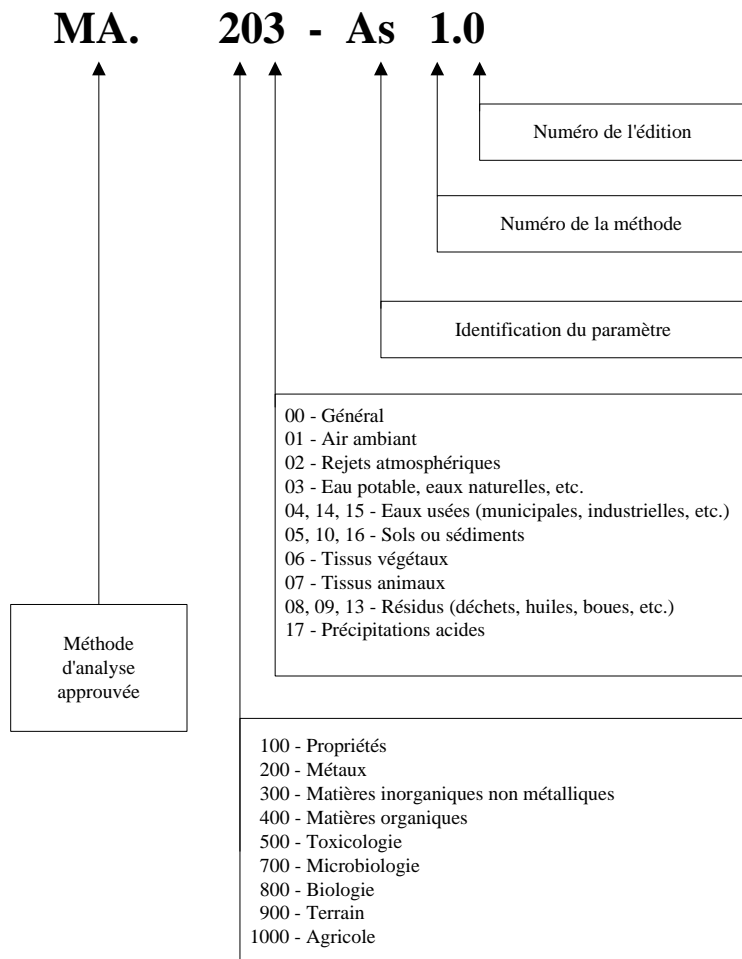


MA. 700 – Col 1.0
Édition : 2000-04-06
Révision : 2005-05-11 (2)

Méthode d'analyse
Recherche et dénombrement des coliformes totaux :
méthode par filtration sur membrane

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est identifiée par l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. L'indice peut également être augmenté si une révision entraîne des modifications en profondeur. La date de révision d'une méthode est suivie d'un chiffre indiquant la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Recherche et dénombrement des coliformes totaux : méthode par filtration sur membrane.
MA. 700 – Col 1.0, Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et
des Parcs du Québec, 2005, 20 p.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|----|
| INTRODUCTION | 4 |
| 1. DOMAINE D'APPLICATION | 4 |
| 2. PRINCIPE ET THÉORIE | 4 |
| 3. FIABILITÉ | 5 |
| 3.1. Interférence | 5 |
| 3.2. Limite de détection | 5 |
| 3.3. Limite de quantification | 5 |
| 3.4. Fidélité | 6 |
| 3.5. Sélectivité | 6 |
| 3.6. Taux de faux positifs et de faux négatifs | 6 |
| 4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION | 6 |
| 5. APPAREILLAGE | 7 |
| 6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS | 8 |
| 7. PROTOCOLE D'ANALYSE | 10 |
| 7.1. Préparation des échantillons | 11 |
| 7.2. Analyse de l'échantillon | 11 |
| 7.3. Observation des résultats | 13 |
| 7.4. Confirmation | 13 |
| 8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS | 15 |
| 8.1. Échantillons d'eau potable, d'eaux de surface, d'eaux usées, etc. | 15 |
| 8.2. Échantillons solides (boues, sols, déchets, etc.) | 15 |
| 8.3. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification | 16 |
| 8.4. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification | 16 |
| 9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ | 18 |
| 10. BIBLIOGRAPHIE | 18 |
| Tableau 1 - Liste des espèces bactériennes appartenant au groupe des coliformes totaux et des coliformes fécaux | 19 |
| Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation des colonies de coliformes totaux | 20 |

INTRODUCTION

L'expression « coliformes totaux » regroupe plusieurs espèces bactériennes de la famille des Entérobactéries qui sont aérobies et anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées en forme de bâtonnet et produisant des colonies foncées à reflets vert métallique en moins de 24 heures, à 35 °C sur un milieu de type m-Endo contenant du lactose. De plus, tous les coliformes totaux doivent produire une réaction négative à l'épreuve de la cytochrome-oxydase et une réaction positive au test de l'ONPG (ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside).

Les coliformes totaux sont des microorganismes indicateurs dont le dénombrement permet de déceler le niveau de pollution d'origine organique dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sources d'approvisionnement ou les canalisations d'eau potable.

Compte tenu que les coliformes fécaux font partie du groupe des coliformes totaux, l'absence de coliformes totaux dans une eau de consommation est une indication relativement fiable de l'absence de pollution d'origine fécale. Cependant, la présence de coliformes totaux ne caractérise pas nécessairement ce même type de pollution mais permet plutôt d'établir la potabilité d'une eau traitée, l'efficacité d'un traitement de désinfection ou l'étanchéité d'un réseau de distribution d'eau potable.

Cette méthode correspond à la méthode 9222B du *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA et WEF, 1998). L'étape facultative de confirmation des colonies de coliformes totaux est une procédure originale élaborée et validée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ).

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode sert à dénombrer les coliformes totaux par filtration sur membrane et s'applique aux eaux usées, aux eaux souterraines, à l'eau de surface et à l'eau de consommation. Les échantillons de sols, de boues, de déchets solides et de sédiments peuvent être analysés par cette méthode si la concentration suspectée en coliformes totaux est supérieure à 10 UFC/g d'échantillon humide (unités formant des colonies).

Les coliformes totaux sont utilisés comme indicateur de pollution d'origine organique.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La méthode de filtration sur membrane consiste à recueillir, identifier et dénombrer, à la surface d'une membrane filtrante stérile, les bactéries recherchées dans un échantillon. Les eaux usées doivent faire l'objet de dilutions et les solides sont mis en suspension et dilués dans un tampon phosphate. Pour les coliformes totaux, un volume déterminé de l'échantillon est filtré à travers une membrane d'une porosité de 0,45 µm et ensuite incubé pendant 24 heures ± 2 heures à 35 °C ± 0,5 °C sur le milieu m-Endo. Dans ces conditions, le résultat des réactions biochimiques entre un sous-produit de la fermentation du lactose (l'acétaldéhyde), la fuschine basique et le sulfite de sodium présent dans le milieu de culture permet la croissance sélective, la numération et l'identification présomptive des coliformes totaux qui apparaissent en colonies caractéristiques

à reflets vert métallique. La présence de coliformes totaux est confirmée ensuite par une réaction négative à l'épreuve de la cytochrome-oxydase et une réaction positive au test de l'ONPG.

Le lauryl sulfate de sodium présent dans le milieu de culture m-Endo inhibe la croissance des microorganismes sporulants producteurs de gaz, alors que le désoxycholate de sodium et l'alcool inhibent les microorganismes sporulants et les bactéries à Gram positif.

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 de tels échantillons doit faire l'objet d'une remarque à cet effet dans le rapport d'analyse.

La présence de matières en suspension de l'échantillon 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. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée afin de filtrer le volume d'échantillon requis. La technique de fermentation en tubes multiples (TFTM) doit être utilisée si l'emploi de plusieurs membranes ne constitue pas une solution valable pour remédier à ces interférences.

La gélose m-Endo doit être conservée à 4 °C à l'abri de la lumière pendant une période d'entreposage maximale de deux semaines. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une baisse appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu.

Les bactéries ne doivent pas être en suspension dans l'eau de dilution pendant plus de 30 minutes à la température ambiante, car il peut en résulter une variation de la population initiale.

Certains genres bactériens tels que *Aeromonas* peuvent croître occasionnellement sur le milieu m-Endo à 35 °C et produire des colonies vert métallique caractéristiques. Cependant, ceux-ci produisent une réaction positive à l'épreuve de la cytochrome-oxydase.

3.2. LIMITE DE DÉTECTION

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

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification, inférieure et supérieure, pour cette méthode sont respectivement de 20 et 80 UFC de coliformes totaux. Le nombre total de colonies de toutes sortes 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

3.4.1. Répétabilité

Un test de répétabilité intertechniciens a été réalisé dans le laboratoire du CEAEQ en avril 2005. Quatre techniciens ont analysé chacun 8 replica d'un échantillon d'eau de surface. Le coefficient de variation (rapport de l'écart type sur la moyenne) de l'ensemble des trente-deux résultats a été de 12 % pour un dénombrement moyen de 5 100 UFC/100 ml.

Un test de répétabilité impliquant un seul technicien a été réalisé dans le laboratoire du CEAEQ en février 2005. Dix replica d'un échantillon d'eau usée ont été analysés. Le coefficient de variation a été de 13 % pour un dénombrement moyen de 6 700 UFC/100 ml. Les membranes utilisées pour faire les dénombrements contenaient en moyenne 67 colonies typiques et 125 colonies atypiques.

3.5. SÉLECTIVITÉ

La sélectivité est la proportion des colonies typiques observées par rapport au nombre total de colonies (typiques et atypiques) observées sur un milieu de culture. Selon des données recueillies dans notre laboratoire, la sélectivité du milieu m-Endo LES est de 22 % dans les eaux de surface et de 37 % dans les eaux usées. Un total de 2 238 colonies dans 15 échantillons a été considéré dans les eaux de surface et un total de 1 235 colonies dans 15 échantillons a été considéré pour les eaux usées.

3.6. TAUX DE FAUX POSITIFS ET DE FAUX NÉGATIFS

Lors de la confirmation de 252 colonies dans 22 échantillons d'eau usée analysés, le taux de colonies classées faussement positives sur le milieu m-Endo a été de 19 % et le taux de colonies classées faussement négatives a été de 31 %. L'efficacité, c'est-à-dire le nombre de colonies typiques ou atypiques classées correctement lors de la confirmation, a été de 75 %.

4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Les échantillons doivent toujours être prélevés avec toutes les conditions d'asepsie nécessaires dans des contenants stériles de verre ou de polypropylène à large ouverture, de capacité d'environ 250 ml, en laissant un espace d'air d'au moins 2,5 cm.

De plus, les contenants utilisés pour le prélèvement des échantillons d'eau probablement chlorée doivent contenir une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dont la concentration finale est d'au moins 100 mg/l dans l'échantillon. Pour obtenir ce résultat, introduire 2,5 ml d'une solution

de thiosulfate de sodium à 1 % (1 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ par 100 ml d'eau) dans un contenant de 250 ml avant de le stériliser. Le thiosulfate de sodium agit comme agent neutralisant du chlore résiduel qui pourrait être présent dans l'eau. Il empêche ainsi le chlore d'agir entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse et permet donc d'obtenir une estimation juste du nombre de microorganismes présents dans l'eau au moment du prélèvement.

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 était de 48 heures après le prélèvement et que l'échantillon doit 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 \pm 0,5 °C
- 5.12. Balance analytique avec une précision de 0,01 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 2 et 6 °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. Papiers en laine de verre

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. Éthanol 95 %, C_2H_5OH (CAS n° 64-17-5)

6.2. Hydroxyde de sodium, $NaOH$ (CAS n° 1310-73-2)

Solution commerciale 10 N.

6.3. Acide chlorhydrique, HCl (CAS n° 7647-01-0)

Solution commerciale 1 N.

6.4. Phosphate de potassium anhydre, KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)

6.5. Bandelettes pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase

Pathotec[®] cytochrome-oxydase, Remel[®].

6.6. Substrats chromogéniques Colilert[®], format P/A 100 ml, Idexx Laboratories[®]

6.7. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

Ajouter 100 ml de la solution commerciale de $NaOH$ 10 N (cf. 6.2) 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 m-Endo

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 51,0 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

| | |
|-------------|-------|
| Casitone | 3,7 g |
| Thiopeptone | 3,7 g |

| | |
|------------------------------------|--------|
| Extrait de levure | 1,2 g |
| Chlorure de sodium | 3,7 g |
| Lactose | 9,4 g |
| Tryptose | 7,5 g |
| Phosphate de potassium dibasique | 3,3 g |
| Phosphate de potassium monobasique | 1,0 g |
| Désoxycholate de sodium | 0,1 g |
| Lauryl sulfate de sodium | 0,05 g |
| Sulfite de sodium | 1,6 g |
| Fuschine basique | 0,8 g |
| Agar | 15,0 g |

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 51,0 g de milieu déshydraté, ajouter 1 000 ml d'eau contenant 20 ml d'éthanol à 95 % (cf. 6.1). Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique (ne pas laisser bouillir). Le pH doit être de $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7). Ne pas autoclaver. 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-cervelle

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 52,0 g/l et sa formulation tel 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 milieux non sélectifs 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. 6.3) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7). Répartir environ 8 ml dans des tubes de 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. 6.4) 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 réactif Colilert[®]

Verser le contenu d'un sachet de réactif Colilert[®] (cf. 6.6) 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 réactif Colilert[®]. Ce réactif 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 sur des 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 m-Endo (cf. 6.8). La fréquence de ce contrôle peut être augmentée lors de l'analyse d'eau fortement contaminée. En tout temps, les exigences prescrites par le document DR-12-SCA-02 doivent être respectées. Dans le cas où les analyses demandées sont combinées (coliformes totaux et coliformes fécaux), le témoin de stérilité peut être fait avec le milieu de culture pour les coliformes totaux.

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.

En ce qui concerne les échantillons de sols, de déchets solides, de sédiments ou de boues, 10 grammes d'échantillon sont prélevés et mis en suspension dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (cf. 6.12) (dilution 1 : 10) avant de procéder à l'analyse.

Les échantillons soupçonnés d'être fortement contaminés (eaux usées, boues municipales ou industrielles, sédiments contaminés, fumiers, etc.) doivent être traités de façon à obtenir, pour un volume donné d'échantillon, entre 20 et 80 colonies sur la membrane et ainsi permettre une lecture juste et rapide du nombre de colonies.

Pour cela, des dilutions sériées sont 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 même 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 dans l’entonnoir les volumes requis, selon la nature de l’échantillon analysé (voir le tableau qui suit). 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 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.

| Provenance de l’eau | Volumes en ml |
|---|--|
| – Eau potable traitée ou non traitée, eau souterraine (puits) | 100 ml |
| – Eaux de surface (rivières, lacs, plages, etc.) | 50, 10 et 1 ml |
| – Eaux usées domestiques, municipales, industrielles, etc. – Lixiviats de sites d’enfouissement sanitaire, etc. | 10 et 1 ml de chacune des dilutions* |
| – Boues d’eaux usées industrielles, municipales, domestiques, etc. – Sols, déchets solides et sédiments contaminés | 10 et 1 ml de chacune des dilutions effectuées à partir de la suspension dans l’eau tamponnée* |

* Des volumes supérieurs ou inférieurs pourraient être filtrés selon la turbidité de l’échantillon analysé.

- 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 m-Endo (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.

- Inscrire 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 typiques et au maximum de 200 colonies de toutes sortes. Les caractéristiques typiques des colonies de coliformes totaux sur gélose de type m-Endo sont :

- a) aspect vert métallique sur toute la surface de la colonie;
- b) aspect vert métallique au centre seulement de la colonie (auréole rouge);
- c) colonie de couleur vert mat très foncé;
- d) colonie de couleur rouge brun foncé avec léger reflet vert métallique.

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

Lorsque la caractérisation des colonies est problématique, identifier les membranes et les déposer sur un papier en laine de verre pour les faire sécher. Cette pratique permet de mieux visualiser l'aspect des colonies.

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.

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

7.4. CONFIRMATION

La technique décrite précédemment est une méthode de dénombrement et d'identification présomptive des coliformes totaux. Cette désignation signifie que les bactéries isolées sont reconnues comme la bactérie recherchée à l'aide d'une seule réaction biochimique caractéristique. Dans certains cas, cette unique réaction peut produire des faux positifs ou des faux négatifs qu'il faut vérifier à l'aide d'un dépistage biochimique plus complet. Cette étape de la méthode est celle de la confirmation. La confirmation établit la validité de la différenciation des colonies sur m-Endo par la coloration et supporte l'interprétation de cette coloration. De plus, la confirmation sert à vérifier le respect des conditions à atteindre pour correspondre à la définition des coliformes totaux.

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 au groupe des coliformes totaux avec l'épreuve de l'oxydase et de l'ONPG, ou être plus complète avec une identification à l'espèce à l'aide de systèmes d'identification biochimique que l'on peut se procurer dans le commerce (système API 20E[®], système BBL Crystal[®], système MicroScan[®], etc.).

Par souci de commodité, d'efficacité, de rapidité et de coût, nous privilégions la méthode de confirmation décrite ci-dessous et schématisée à la figure 1. Cette confirmation devrait être effectuée sur au moins 5 colonies suspectes ou selon un nombre de colonies évalué à 10 % des colonies présentes sur la membrane filtrante.

7.4.1. Propagation des souches suspectes

Prélever une colonie bien isolée sur la gélose m-Endo 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. 6.5). Les coliformes totaux ne possèdent pas l'enzyme appelé cytochrome-oxydase, et produisent une réaction négative. Pour l'utilisation des bandelettes, voir les instructions du fabricant.

7.4.3. Épreuve de l'ONPG

L'épreuve de l'ONPG s'effectue à l'aide du réactif Colilert® (cf. 6.13).

Inoculer un tube de réactif 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.

Un milieu incolore correspond à une réaction négative et confirme une colonie de bactéries non coliformes. Il est cependant possible d'effectuer l'observation des tubes après 4 heures d'incubation. En cas de réaction négative, il faut poursuivre l'incubation jusqu'à 24 heures.

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. 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 m-Endo 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. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1. ÉCHANTILLONS D'EAU POTABLE, D'EAUX DE SURFACE, D'EAUX USÉES, ETC.

De façon générale, choisir la ou les membranes avec le nombre de colonies acceptables, de préférence à l'intérieur des limites de quantification, et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 ml d'échantillon selon l'équation générale suivante :

$$UFC/100 \text{ ml} = \frac{\text{Nombre de colonies de coliformes totaux}}{\text{Volume d'échantillon analysé en ml}} \times 100$$

Dans le cas où une confirmation est effectuée, il faut appliquer le pourcentage de confirmation (cf. 7.4.4) au résultat précédent :

$$UFC/100 \text{ ml confirmées} = UFC/100 \text{ ml présumées} \times \% \text{ de confirmation}$$

8.2. ÉCHANTILLONS SOLIDES (BOUES, SOLS, DÉCHETS, ETC.)

De façon générale, choisir la ou les membranes avec le nombre de colonies acceptables, de préférence à l'intérieur des limites de quantification, et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 g d'échantillon humide ou UFC par g d'échantillon humide, selon les équations générales suivantes :

$$UFC/g \text{ (poids humide)} = \frac{\text{Nombre de colonies de coliformes totaux}}{\text{Poids de l'échantillon humide en grammes}}$$

$$UFC/100 \text{ g (poids humide)} = \frac{\text{Nombre de colonies de coliformes totaux}}{\text{Poids de l'échantillon humide en grammes}} \times 100$$

Le poids de l'échantillon analysé correspond à la relation suivante :

- la filtration de 1 ml de la dilution de 10 grammes d'échantillon dans 90 ml d'eau tampon correspond à 0,1 g d'échantillon analysé. Les dilutions sériées effectuées par la suite correspondent à 0,01 g, 0,001 g, 0,0001 g, etc. d'échantillon analysé.

Dans certains contextes réglementaires ou de gestion par critère, il peut être nécessaire d'exprimer le résultat en fonction du poids sec de l'échantillon. Dans ces cas, le résultat se calcule comme suit :

$$\text{Résultat en UFC/g (poids sec)} = \frac{\text{Résultat en UFC/g (poids humide)}}{\% \text{ de matières sèches}}$$

Dans le cas où une confirmation est effectuée, il faut appliquer le pourcentage de confirmation (cf. 7.4.4) au résultat précédent :

$$\text{UFC/g (poids sec) confirmées} = \text{UFC/g (poids sec) présumées} \times \% \text{ de confirmation}$$

8.3. 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 :

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

- 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 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) :

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

8.4. DÉNOMBREMENT À L'EXTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

8.4.1. 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'échantillon ensemencés, 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 :

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

8.4.2. 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 :

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

8.4.3. 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 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 UFC/100 ml

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

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

La température de l'incubateur doit être maintenue à 35 °C ± 0,5 °C 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

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 20th Edition, 1998.

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.

DIRECTION DES LABORATOIRES, MENVIQ, Dénombrement et confirmation des colonies atypiques lors de l'analyse microbiologique d'échantillons d'eau potable et d'eaux usées, Document interne, 1991.

IDEXX LABORATORIES[®], Access Analytical Systems Colilert P/A reagent, Brandford, CT., 1988.

SANTÉ ET BIEN-ÊTRE SOCIAL CANADA, Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada, Centre d'édition du Gouvernement du Canada, Approvisionnement et Services Canada, 1978.

Tableau 1 - Liste des espèces bactériennes appartenant au groupe des coliformes totaux et des coliformes fécaux

| Genre et espèce | Coliformes totaux | Coliformes fécaux |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| <i>Arizona sp.</i> | X | |
| <i>Cedecea sp.</i> | X | |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> | X | |
| <i>Citrobacter diversus</i> | X | |
| <i>Citrobacter freundii</i> | X | |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | X | |
| <i>Enterobacter agglomerans</i> | X | |
| <i>Enterobacter cloacae</i> | X | |
| <i>Enterobacter gergoviae</i> | X | |
| <i>Enterobacter intermedium</i> | X | |
| <i>Enterobacter sakasakii</i> | X | |
| <i>Escherichia coli</i> | X | X |
| <i>Hafnia alvei</i> | X | |
| <i>Klebsiella oxytoca</i> | X | |
| <i>Klebsiella ozanae</i> | X | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | X | |
| <i>Kluyvera sp.</i> | X | |
| <i>Serratia ficaria</i> | X | |
| <i>Serratia fonticola</i> | X | |
| <i>Serratia liquefaciens</i> | X | |
| <i>Serratia marcescens</i> | X | |
| <i>Serratia odorifera</i> | X | |
| <i>Serratia plymuthica</i> | X | |
| <i>Serratia rubideae</i> | X | |
| <i>Yersinia sp.</i> | X | |

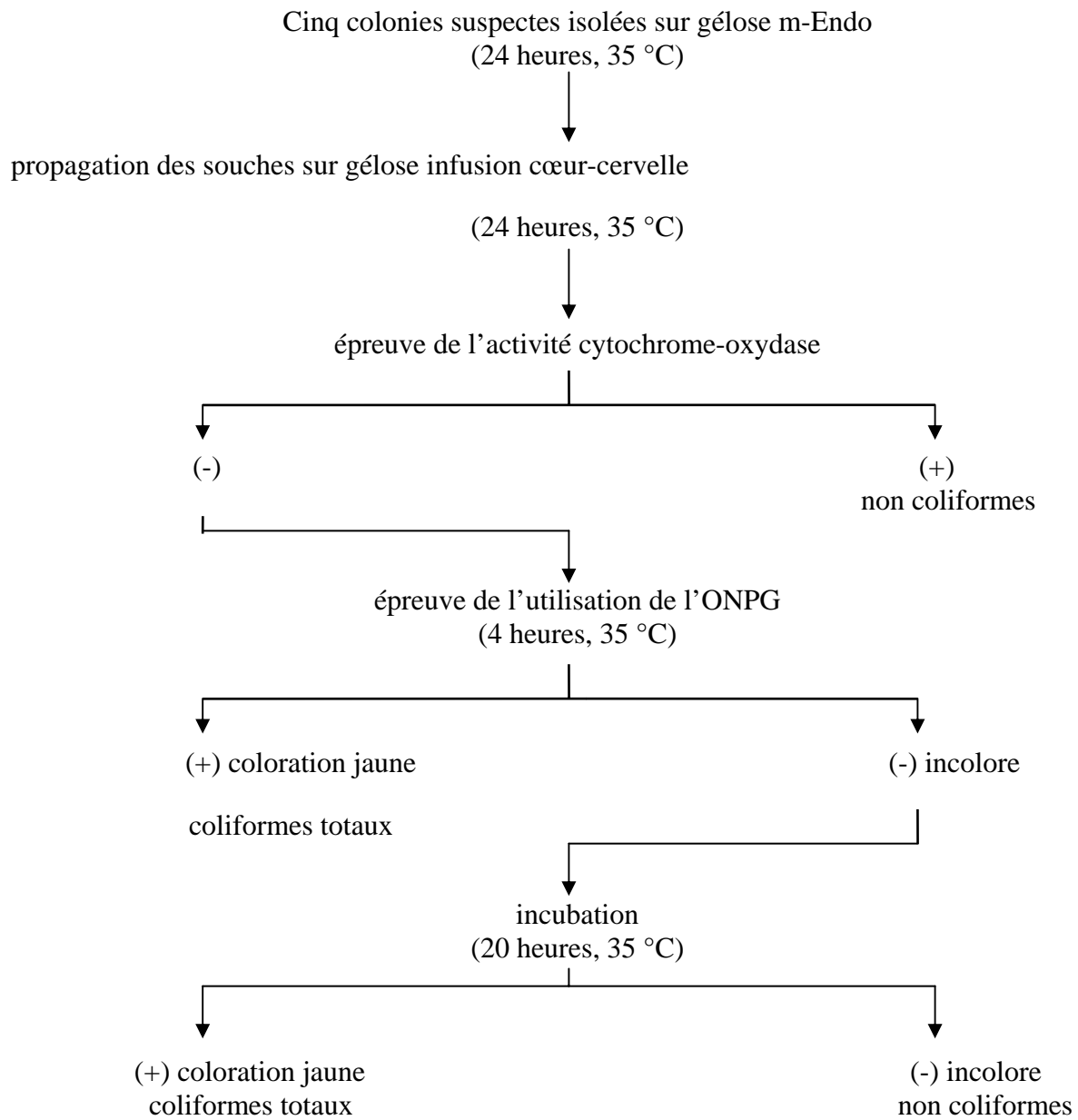


Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation des colonies de coliformes totaux