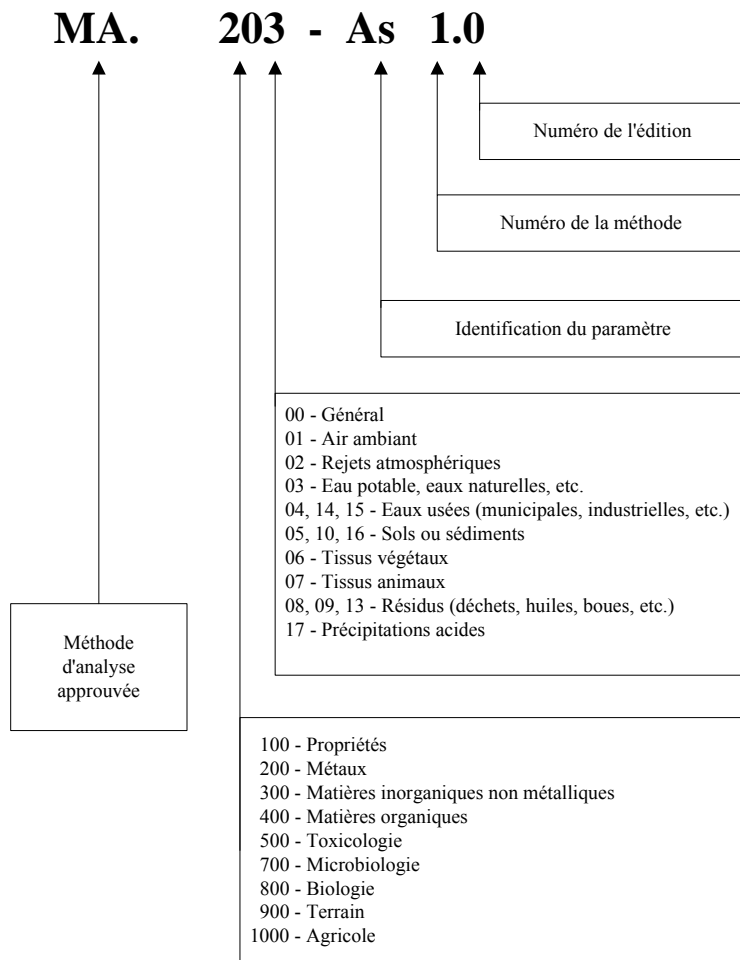


MA. 700 – Ec-tm 1.0
Édition : 2004-01-12
Révision : 2005-05-11(1)

Méthode d'analyse
Dénombrement de *Escherichia coli* : méthode par
tubes multiples employant un milieu de culture à
substrats enzymatiques

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, Dénombrement de *Escherichia coli* : méthode par tubes multiples employant un milieu de culture à substrats enzymatiques, MA. 700 – Ec-tm 1.0, Rév. 1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2005, 19 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	6
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. FIABILITÉ	8
3.1. Interférence	8
3.2. Limite inférieure de quantification	8
3.3. Limite supérieure de quantification	8
3.4. Fidélité	9
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	9
5. APPAREILLAGE	9
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	10
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	13
7.1. Préparation de l'échantillon	13
7.2. Analyse de l'échantillon	14
7.3. Observation des résultats	14
7.4. Détermination de la siccité pour les échantillons solides	15
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	15
8.1. Échantillons solides	15
8.2. Échantillons liquides	17
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	19
10. BIBLIOGRAPHIE	19

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 – Règlements environnementaux québécois qui présentent des normes pour les coliformes fécaux	6
Tableau 2 – Indices NPP par gramme ou millilitre d'échantillon et limites de confiance à 95 % (avec 3 séries de 5 tubes contenant 0,1, 0,01 et 0,001 g d'échantillon)	16
Tableau 3 – Exemples de déduction du NPP à partir du nombre de résultats positifs dans des séries de 5 tubes en utilisant le tableau 2	17
Tableau 4 – Indices NPP par 100 ml d'échantillon et limites de confiance à 95 % (avec 3 séries de 5 tubes contenant 10, 1,0 et 0,1 ml d'échantillon)	18

INTRODUCTION

Escherichia coli (*E. coli*) est une bactérie à Gram négatif qui fait partie de la flore intestinale normale des humains et des animaux. *E. coli* n'est pas pathogène; cette bactérie est en fait utilisée comme microorganisme indicateur. Sa présence dans l'environnement indique une pollution fécale et, en conséquence, un risque que des microorganismes pathogènes (virus entériques, protozoaires ou bactéries) provenant de l'intestin des humains ou des animaux à sang chaud soient aussi présents. *E. coli* fait partie du groupe des coliformes fécaux de même que du groupe des coliformes totaux, deux indicateurs bactériens bien connus.

Le principal avantage de l'utilisation de *E. coli* comme indicateur par rapport aux deux groupes coliformes est sa meilleure spécificité. En effet, il est bien connu que certains coliformes totaux ou fécaux détectés avec les méthodes d'analyse traditionnelles ne sont pas toujours d'origine fécale. Le meilleur exemple est la bactérie coliforme *Klebsiella pneumoniae*. Cette dernière peut être présente en grande quantité dans les résidus organiques même si ceux-ci n'ont pas été en contact avec des matières fécales. Bien que les techniques traditionnelles de recherche de coliformes fécaux aient été conçues pour viser la bactérie *E. coli*, elles ont l'inconvénient de détecter également d'autres bactéries comme *K. pneumoniae*. Ce manque de spécificité entraîne une surestimation du risque réel de contamination fécale. Puisque *E. coli* est exclusivement d'origine fécale, son utilisation comme indicateur dans certains types d'environnements permet une meilleure estimation du risque sanitaire réel que l'utilisation des coliformes fécaux comme indicateur.

Plusieurs sources potentielles de rejet de *E. coli* sont trouvées dans l'environnement. Les égouts municipaux, les boues d'épuration municipales, certains égouts industriels et les installations septiques défectueuses en sont des exemples. Certaines pratiques agricoles comme l'entreposage et l'épandage de lisiers et de fumiers peuvent aussi contribuer à la présence de *E. coli* dans l'environnement. Cette bactérie a aussi été trouvée dans des composts domestiques et des biosolides provenant d'usines de pâtes et papiers. Les animaux sauvages constituent également une source de *E. coli* en milieu naturel.

Plusieurs règlements québécois sur l'environnement contiennent des normes concernant la présence de *E. coli* ou des coliformes fécaux. Le tableau 1 présente des normes pour lesquelles la méthode actuelle pourrait être utilisée. Il est à noter que le document *Critères provisoires pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes* (MENV, 2002) est en révision. Les normes de coliformes fécaux deviendront des normes de *E. coli*.

Tableau 1 – Règlements environnementaux québécois qui présentent des normes pour les coliformes fécaux

Règlements ou critères	Coliformes fécaux
– Article 30 du <i>Règlement sur les déchets solides</i> (Q-2, r. 3.2)	200 par 100 ml
– Article 21 du <i>Règlement sur les fabriques de pâtes et papiers</i> (Q-2, r. 12.1)	2 400 par 100 ml
– <i>Critères provisoires pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes</i>	P1 : < 1 000 NPP/g (b.s.) P2 : < 2 000 000 NPP/g (b.s.)

L'approche employée dans cette méthode s'apparente à celle présentée dans le document *Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge* (USEPA, 1999) dans la section *Appendix F – Sample Preparation for Fecal Coliform Tests and Salmonella sp. Analysis*. Dans ce document, l'USEPA réfère à la méthode 9221E du manuel de référence *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA et WEF, 1998), qui utilise le milieu de culture A1 pour la détection directe des coliformes fécaux par la technique des tubes multiples. La technique employée pour la détermination de la siccité¹ (pourcentage de matière sèche) s'appuie sur la méthode 2540B du même ouvrage de référence.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode sert à estimer la quantité d'*Escherichia coli* dans les matrices liquides ou solides. Elle est particulièrement utile pour analyser les échantillons qui peuvent aussi contenir la bactérie *K. pneumoniae* de même que pour analyser les échantillons solides ou trop turbides pour être analysés par la technique de la membrane filtrante.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Cette méthode utilise la technique des tubes multiples avec le milieu de culture à substrats enzymatiques Colilert®. Ce milieu de culture contient deux substrats enzymatiques : l'ONPG (ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside) et le MUG (4-méthyl-umbélliféryl-β-D-glucoronide).

L'ONPG est un substrat enzymatique servant à mettre en évidence l'enzyme β-galactosidase, qui est présente chez des coliformes totaux. La bactérie *E. coli* contient cette enzyme. L'utilisation

¹ Siccité : Rapport exprimé en pourcentage, entre la masse restante après dessiccation et la masse au moment du prélèvement, dans les conditions de l'essai normalisé.

de l'ONPG par la bactérie *E. coli* entraîne l'apparition d'une coloration jaune dans le milieu de culture.

Le MUG est un substrat enzymatique servant à mettre en évidence l'enzyme β -glucuronidase, qui est présente chez la plupart des souches de *E. coli*, mais rarement chez d'autres espèces bactériennes. L'utilisation du MUG par *E. coli* entraîne l'apparition d'une fluorescence bleutée dans le milieu de culture. Cette fluorescence est visible sous un éclairage ultraviolet à une longueur d'onde de 366 nm.

Le milieu de culture Colilert[®] contient aussi d'autres substances qui inhibent la croissance des bactéries non coliformes.

L'apparition de la coloration jaune et de la fluorescence après la période d'incubation est nécessaire pour vérifier la présence de *E. coli* dans un échantillon analysé avec le milieu de culture Colilert[®].

La technique des tubes multiples, aussi appelée technique du nombre le plus probable (NPP), sert à estimer le nombre de bactéries dans un échantillon. Elle est particulièrement utile pour analyser les échantillons solides ou les échantillons liquides qui sont turbides et qui peuvent difficilement être analysés par la technique des membranes filtrantes. Dans le protocole présenté dans cette méthode, l'échantillon est d'abord dilué en série. Six tubes contenant le milieu Colilert[®] sont inoculés avec un minimum de trois dilutions consécutives de l'échantillon, pour un total de dix-huit tubes. Pour chacune des dilutions, cinq tubes servent à l'analyse proprement dite et le sixième sert de contrôle de matrice, puisqu'il est inoculé avec une culture de *E. coli*. Ces tubes de milieu de culture sont ensuite incubés pendant 24 heures à une température de 44,5 °C pour faire croître les bactéries. Après la période d'incubation, il s'agit de vérifier la présence de *E. coli* dans les tubes et de noter le nombre de tubes positifs selon les dilutions. Le contrôle de la matrice sert à vérifier si l'échantillon ne contient pas des substances qui pourraient interférer avec la détection de *E. coli*.

Une table du nombre le plus probable est ensuite utilisée pour obtenir une estimation de la quantité de bactéries présentes dans l'échantillon de départ. Les tables de NPP donnent une estimation de la concentration en bactéries dans l'échantillon de départ par rapport au nombre de tubes positifs par dilution. Les tables de NPP ont été élaborées à l'aide d'une approche statistique basée sur la loi de Poisson. Dans cette technique, les tubes qui ne montrent pas de croissance sont réputés ne contenir aucune des bactéries visées.

La température d'incubation recommandée dans cette méthode (44,5 °C) est différente de la température d'incubation recommandée par le fabricant du milieu Colilert[®] (35 °C). Des travaux menés dans notre laboratoire suggéraient que l'élévation de la température d'incubation permettait d'améliorer la récupération de la méthode. Il est possible que la diminution de l'interférence par les bactéries qui ne sont pas thermotolérantes soit responsable de l'amélioration de la récupération.

Pour les échantillons solides, les résultats sont donnés sur une base sèche plutôt que sur une base humide afin d'être conforme aux normes du Ministère (2002) pour les matières résiduelles fertilisantes. Les normes de l'USEPA (1999) sont aussi exprimées sur une base sèche. Il faut

donc déterminer la siccité (pourcentage de matière sèche) des échantillons solides lorsque nous en faisons l'analyse.

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

3. FIABILITÉ

3.1. INTERFÉRENCE

Les échantillons doivent être en suspension dans l'eau stérile (suspension de départ) le moins longtemps possible, de préférence moins de 10 minutes, car il peut en résulter un changement de la population bactérienne initiale.

Une bonne agitation de la suspension de départ et des tubes contenant l'échantillon est importante pour éviter une sous-évaluation du résultat final.

Le substrat Colilert[®] déshydraté se conserve jusqu'à la date d'expiration du fabricant inscrite sur la boîte.

Dans le cas d'échantillons liquides, 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 d'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.

Pour chaque échantillon, un tube de chacune des dilutions de l'échantillon est inoculé avec des concentrations variant entre 20 et 100 UFC (unités formant des colonies) viables d'une souche de référence d'*Escherichia coli* afin de vérifier la présence de substances inhibitrices (contrôle de matrice).

3.2. LIMITE INFÉRIEURE DE QUANTIFICATION

La limite inférieure de quantification est de 2 NPP/g (base humide). Cependant, puisque les résultats sont exprimés en NPP/g (base sèche), cette limite peut varier. Par exemple, un échantillon qui a une siccité de 30 % a une limite inférieure de quantification de 7 NPP/g (base sèche).

3.3. LIMITE SUPÉRIEURE DE QUANTIFICATION

La limite supérieure de quantification est de 1 600 NPP/g (base humide) lorsque des dilutions correspondant à des masses de 0,1, 0,01 et 0,001 g d'échantillon dans chaque série de tubes multiples sont analysées. Cependant, puisque les résultats sont exprimés en NPP/g (base sèche), cette limite peut varier. Par exemple, un échantillon qui a une siccité de 30 % a une limite

supérieure de quantification de 5 300 NPP/g (base sèche). La limite supérieure de quantification peut cependant être plus grande si le nombre de dilutions est augmenté.

3.4. FIDÉLITÉ

3.4.1. Répétabilité

La répétabilité (une seule technicienne) de l'étape de la détermination de la siccité d'un échantillon a été déterminée sur un échantillon frais de biosolide papetier. La moyenne des déterminations des siccités des 10 replica a été de 30,5 % et le coefficient de variation (rapport de l'écart type sur la moyenne) a été de 4 % (ne pas confondre les deux types de %).

La répétabilité (une seule technicienne) de la méthode a été déterminée sur un échantillon frais de biosolide papetier en utilisant un mélangeur pour homogénéiser la première dilution. La moyenne des déterminations de *E. coli* dans les 10 replica a été de 56 000 NPP/g (base sèche) et le coefficient de variation a été de 57 %.

La répétabilité (une seule technicienne) de la méthode a été déterminée sur un échantillon de compost ensaché depuis plusieurs mois en utilisant un mélangeur pour homogénéiser la première dilution. La moyenne des déterminations de *E. coli* dans les 10 replica a été de 103 000 NPP/g (base sèche) et le coefficient de variation a été de 73 %.

4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Prélever un échantillon représentatif dans un contenant de polypropylène stérile de 1 l. Pour les échantillons liquides, il est important de laisser un espace d'environ 3 cm entre l'échantillon et le bouchon du contenant de prélèvement afin de permettre une bonne agitation. Conserver l'échantillon à environ 4 °C. Le délai de conservation entre le prélèvement et l'analyse ne doit pas excéder 48 heures. Il est recommandé de transmettre les échantillons au laboratoire dans un délai de 24 heures après le prélèvement. Lors de la réception au laboratoire, les échantillons qui ne peuvent être analysés dans les 4 heures suivant leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse.

5. **APPAREILLAGE**

Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

5.1. Lampe ultraviolette (366 nm)

5.2. Pipettes stériles de 10,0 ml et 1,0 ml de type TD

5.3. Tubes à essais de 18 mm × 150 mm non fluorescents sous rayons ultraviolets, avec bouchons

- 5.4. Autoclave
- 5.5. Bain-marie ajusté à $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$
- 5.6. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.7. Agitateur au Vortex
- 5.8. Réfrigérateur maintenant une température entre 1 °C et 4 °C
- 5.9. Récipient en aluminium
- 5.10. Étuve réglée à 105 °C
- 5.11. Dessiccateur
- 5.12. Mélangeur (blender) de marque Sunbeam à 10 vitesses, modèle B-85, avec récipient en acier inoxydable.
- 5.13. Plateau autoclavable en acide inoxydable
- 5.14. Spatules autoclavables
- 5.15. Bouteilles de 150 ml avec bouchon
- 5.16. Bouteille de 1 l avec bouchon
- 5.17. Cylindre gradué

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. Milieu de culture Colilert[®], format P/A 100 ml, Idexx Laboratories
- 6.2. Phosphate de potassium, KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)
- 6.3. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)
- 6.4. Acide chlorhydrique, HCl (CAS n° 7647-01-0)
Solution commerciale 1 N
- 6.5. Sulfate de calcium anhydre (« Drierite »), comme dessiccant

- 6.6. Souche viable d'*Escherichia coli*
- 6.7. Eau de dilution (eau déionisée, sans sel ni tampon)

ATTENTION – Il ne faut pas utiliser d'eau tamponnée ou d'eau peptonée stérile comme diluant car le milieu de culture Colilert® contient déjà un tampon. L'utilisation d'un autre tampon pourrait fausser les résultats.

Répartir de l'eau déionisée dans des bouteilles de 150 ml (cf. 5.15) en volume suffisant pour obtenir un volume final de 90 ml ± 2 ml après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

Stériliser de l'eau déionisée à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Mesurer 450 ml ± 10 ml d'eau déionisée stérile à l'aide d'un cylindre gradué préalablement stérilisé et verser dans une bouteille de 1 l (cf. 5.16) préalablement stérilisée.

- 6.8. Préparation des tubes de milieu Colilert®

Verser le contenu d'un sachet de milieu Colilert® (cf. 6.1) dans 100 ml d'eau stérile. Répartir en volume de 10 ml dans des tubes à essais stériles de 18 mm x 150 mm non fluorescents sous rayons ultraviolets avec bouchons. Le milieu Colilert® réhydraté se conserve pendant une semaine à 4 °C.

ATTENTION – Il ne faut pas autoclaver le milieu Colilert®.

- 6.9. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

Dissoudre 40,0 g de NaOH (cf. 6.3) dans environ 800 ml d'eau, laisser refroidir et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à la température ambiante.

- 6.10. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH₂PO₄ anhydre (cf. 6.2) dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.9) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

- 6.11. 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 volume suffisant pour obtenir un volume final de 90 ml ± 2 ml après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

6.12. Bouillon infusion coeur-cervele (disponible dans le commerce)

Formule en gramme par litre d'eau :

Infusion de cervelle de veau	200 g
Infusion de coeur de boeuf	250 g
Protéose peptone	10 g
Dextrose	2 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate disodique	2,5 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 37,0 g du milieu complet déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Mélanger le milieu sur une plaque chauffante en remuant avec un agitateur magnétique jusqu'à dissolution complète. Répartir en volumes de 50 ml dans des bouteilles de verre. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Au besoin, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.4) ou de NaOH 1 N (cf. 6.9). Le bouillon se conserve pendant 4 à 6 semaines à 4 °C.

6.13. Gélose R2A (disponible dans le commerce)

Formule en gramme par litre d'eau :

Extrait de levure	0,5 g
Protéose peptone n° 3	0,5 g
Acides casamino	0,5 g
Dextrose	0,5 g
Amidon soluble	0,5 g
Pyruvate de sodium	0,3 g
Phosphate de potassium dibasique	0,3 g
Sulfate de magnésium	0,05 g
Agar	15 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, ajouter les composants mentionnés précédemment ou peser 18,2 g du milieu complet déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Répartir dans des bouteilles de verre. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C. Au besoin, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.4) ou de NaOH 1 N (cf. 6.9). Les bouteilles de milieu se conservent pendant un mois à 4 °C.

6.14. Suspension d'*Escherichia coli*

Inoculer un volume de 50 ml de bouillon infusion coeur-cervele (cf. 6.12) avec une souche d'*Escherichia coli* (cf. 6.6) et incuber à 35 °C pendant 18-24 heures.

Diluer la culture obtenue dans de l'eau tamponnée stérile (cf. 6.11). Inoculer les tubes de milieu de culture Colilert® contenant l'échantillon (contrôles de matrice) ainsi que le tube de contrôle positif. Viser l'addition de 20 à 100 UFC de *E. coli*.

Il est recommandé d'effectuer un dénombrement en triplicata par incorporation dans la gélose R2A (cf. 6.13) de la culture diluée (à environ 10^{-6} à 10^{-8}) pour s'assurer que les contrôles ont été inoculés avec environ 20 à 100 UFC d'*E. coli*. Incuber les géloses à 35 °C pendant 24 heures.

Il est aussi recommandé de constituer une historique des dénombrements de la suspension d'*Escherichia coli* afin d'être en mesure de connaître le volume et la dilution à employer pour inoculer les tubes avec 20 à 100 UFC d'*E. coli*.

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

7.1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

ATTENTION – Afin d'améliorer la fidélité de la méthode, il est important de respecter rigoureusement les étapes de préparation des échantillons.

7.1.1. Échantillons liquides

- Bien homogénéiser l'échantillon en l'agitant d'un mouvement vertical vigoureux 25 fois. Mesurer 50,0 ml de l'échantillon dans un cylindre gradué prérépété (cf. 5.17) et l'incorporer dans 450 ml d'eau de dilution stérile (cf. 6.7). Agiter vigoureusement de façon à homogénéiser le plus possible la dilution. Cette préparation constitue la dilution 10^{-1} .
- Pipetter 10 ml de la dilution 10^{-1} dans 90 ml d'eau de dilution stérile. Cette préparation constitue la dilution 10^{-2} .
- Pipetter 10 ml de la dilution 10^{-2} dans 90 ml d'eau de dilution stérile. Cette préparation constitue la dilution 10^{-3} .
- En utilisant le même principe, effectuer d'autres dilutions lorsque nécessaire.

7.1.2. Échantillons solides ou semi-solides

- Étaler la totalité de l'échantillon dans un plateau en acier inoxydable stérile.
- À l'aide de spatules stériles, défaire les amas de particules le plus possible et mélanger de façon à bien homogénéiser l'échantillon.
- De manière aseptique, peser 50 g de l'échantillon et l'incorporer dans le récipient stérile d'un mélangeur (cf. 5.12) contenant 450 ml d'eau stérile (cf. 6.7). Autant que possible, la partie analysée de l'échantillon devrait être représentative de la totalité de l'échantillon. Ainsi, les particules solides qui sont relativement petites devraient faire partie de l'échantillon analysé, mais pas les plus gros morceaux tels que les copeaux de bois.
- Agiter le mélange 2 minutes à « mélanger » (blend). Cette préparation constitue la dilution 10^{-1} . Laisser reposer 30 secondes.

- Pipetter 10 ml de la dilution 10^{-1} et transférer dans 90 ml d'eau dilution stérile. L'emploi de pipettes à bout cassant est recommandé. Cette préparation constitue la dilution 10^{-2} .
- Diluer autant de fois que nécessaire. L'analyse de la dilution 10^{-7} peut être requise pour vérifier le critère de 2 000 000 NPP/g (base sèche).

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- Pipetter 1,0 ml de la dilution 10^{-1} dans 6 tubes de 10 ml de milieu Colilert® (cf. 6.8) et agiter au Vortex. Chacun des 6 tubes de cette première série contient 0,1 g d'échantillon.
- Pipetter 1,0 ml de la dilution 10^{-2} dans 6 tubes de 10 ml de milieu Colilert® et agiter au Vortex. Chacun des 6 tubes de cette deuxième série contient 0,01 g d'échantillon.
- Pipetter 1,0 ml de la dilution 10^{-3} dans 6 tubes de 10 ml de milieu Colilert® et agiter au Vortex. Chacun des 6 tubes de cette troisième série contient 0,001 g d'échantillon.
- Il est possible de faire d'autres dilutions (10^{-4} , 10^{-5} , etc.) et d'inoculer d'autres séries de tubes en utilisant le même principe si l'échantillon est très contaminé ou pour obtenir une limite de quantification plus élevée.
- Inoculer 1 tube de chacune des 3 séries avec la suspension diluée d'*Escherichia coli* (cf. 6.14) et agiter au Vortex. Ce sont les contrôles de matrice.
- Inoculer 1 tube de milieu de culture Colilert® avec la suspension diluée d'*Escherichia coli* (cf. 6.14) et agiter au Vortex. Il s'agit du contrôle positif.
- Incuber les tubes dans un bain-marie à $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ pendant 24 heures. Le niveau d'eau dans le bain-marie doit permettre l'immersion totale du liquide contenu dans les tubes.
- Incuber également un tube de milieu Colilert® sans échantillon. Ceci est le contrôle négatif.

7.3. OBSERVATION DES RÉSULTATS

- Après la période d'incubation, sortir et ranger les tubes par ordre de numéro d'échantillon et de dilution.
- Examiner les contrôles de matrice et les contrôles négatif et positif. Les contrôles de matrice doivent être jaunes et présenter une fluorescence sous rayons ultraviolets, tandis que le contrôle négatif doit être translucide et non fluorescent sous rayons ultraviolets.
- Examiner sous une lumière ultraviolette (366 nm) les tubes qui ont une coloration jaune. Les tubes de coloration jaune présentant une fluorescence sous rayons ultraviolets sont considérés comme positifs pour la présence d'*Escherichia coli*.

7.4. DÉTERMINATION DE LA SICCITÉ POUR LES ÉCHANTILLONS SOLIDES

- En duplicata, peser 10 g ou plus d'échantillon humide dans un récipient en aluminium ou dans tout autre contenant approprié. Noter le poids.
- Sécher l'échantillon à l'étuve à 105 °C pendant la nuit et laisser refroidir au dessiccateur.
- Les résultats sont exprimés d'après l'équation suivante :

$$S = \frac{A}{B} \times 100$$

où

S : siccité (% de matière sèche);
A : poids de l'échantillon sec (g);
B : poids de l'échantillon humide (g).

- La siccité d'un échantillon est la moyenne des duplicata.

8. **CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**

8.1. ÉCHANTILLONS SOLIDES

Noter le nombre de tubes positifs dans chaque série de tubes. Consulter la table NPP (tableau 2), afin d'obtenir le nombre le plus probable.

NOTE – Les résultats du tableau 2 s'appliquent lorsque 3 séries de 5 tubes contenant 0,1, 0,01 et 0,001 g d'échantillon sont utilisées. Faire les ajustements nécessaires si d'autres séries de tubes sont utilisées.

Tableau 2 – Indices NPP par gramme (base humide) ou millilitre d'échantillon et limites de confiance à 95 % (avec 3 séries de 5 tubes contenant 0,1, 0,01 et 0,001 g d'échantillon)

Combinaison de tubes positifs	NPP/g	Limite de confiance à 95 %		Combinaison de tubes positifs	NPP/g	Limite de confiance à 95 %	
		inférieure	supérieure			inférieure	supérieure
0-0-0	< 2	-		4-3-0	27	12	67
0-0-1	2	1,0	10	4-3-1	33	15	77
0-1-0	2	1,0	10	4-4-0	34	16	80
0-2-0	4	1,0	13				
				5-0-0	23	9,0	86
1-0-0	2	1,0	11	5-0-1	30	10	110
1-0-1	4	1,0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-0	4	1,0	15	5-1-0	30	10	120
1-1-1	6	2,0	18	5-1-1	50	20	150
1-2-0	6	2,0	18	5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1,0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2,0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2,0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3,0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3,0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5,0	29	5-3-2	140	60	360
				5-3-3	170	80	410
3-0-0	8	3,0	24				
3-0-1	11	4,0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4,0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6,0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6,0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7,0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5,0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7,0	45	5-5-1	300	100	1 300
4-1-0	17	7,0	46	5-5-2	500	200	2 000
4-1-1	21	9,0	55	5-5-3	900	300	2 900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1 600	600	5 300
4-2-0	22	9,0	56	5-5-5	≥ 1 600	-	-
4-2-1	26	12	65				

Lorsque plus de trois séries de tubes ont été utilisés, choisir la plus petite quantité d'échantillon qui donne un certain nombre de résultats positifs ainsi que les deux séries de tubes précédents (voir exemples A et B, tableau 3). Multiplier l'indice lu dans la table NPP par le facteur de dilution utilisé pour obtenir l'estimation du nombre d'organismes présents dans le volume de référence.

Lorsque cela est possible, utiliser des séries de tubes pour lesquelles les résultats sont ni tous positifs, ni tous négatifs. Lorsque cela n'est pas possible, choisir les séries de tubes qui comportent des résultats positifs plutôt que des résultats négatifs (exemple C, tableau 3).

Si moins de trois séries de tubes donnent des résultats positifs, utiliser la série qui comporte la plus forte concentration en échantillons et les deux suivantes (exemple D, tableau 3). Même situation si aucune série de tubes n'est positive.

Si une seule des séries de tubes donne un résultat positif, utiliser cette dilution de même que celle qui précède et celle qui suit immédiatement (exemple E, tableau 3).

Tableau 3 – Exemples de déduction du NPP à partir du nombre de résultats positifs dans des séries de 5 tubes en utilisant le tableau 2

Exemple dans le texte	Quantité d'échantillon dans la série de tubes				NPP/g
	0,1 g	0,01 g	0,001 g	0,0001 g	
A	5*	3*	2*	0	140
B	5	5*	3*	2*	1 400
C	5*	5*	2*	0	500
D	3*	1*	0*	0	11
E	0*	1*	0*	0	2

* Résultats servant à déterminer les indices NPP.

Puisque les résultats des tableaux 1 et 2 sont exprimés en NPP/g sur une base humide, faire le calcul pour obtenir un résultat final en NPP/g sur une base sèche (b.s.) selon la formule suivante :

$$\text{Résultat en NPP/g (base sèche)} = \frac{\text{Résultat en NPP/g (base humide)}}{\text{siccité (\%)}} \times 100$$

Exemple : un échantillon qui a une siccité de 32 % et un dénombrement d'*Escherichia coli* de 140 NPP/g (base humide).

$$\frac{140}{32} \times 100 = 438 \text{ NPP/g (base sèche)}$$

8.2. ÉCHANTILLONS LIQUIDES

Noter le nombre de tubes positifs dans chaque série de tubes. Consulter la table NPP (tableau 4), afin d'obtenir le nombre le plus probable.

NOTE – Les résultats du tableau 1 s'appliquent lorsque 3 séries de 5 tubes contenant 10, 1,0 et 0,1 ml d'échantillon sont utilisées. Faire les ajustements nécessaires si d'autres séries de tubes sont utilisées.

Tableau 4 – Indices NPP par 100 ml d'échantillon et limites de confiance à 95 % (avec 3 séries de 5 tubes contenant 10, 1,0 et 0,1 ml d'échantillon)

Combinaison de tubes positifs	NPP/100 ml	Limite de confiance à 95 %		Combinaison de tubes positifs	NPP/100 ml	Limite de confiance à 95 %	
		inférieure	supérieure			inférieure	supérieure
0-0-0	< 2	-		4-3-0	27	12	67
0-0-1	2	1,0	10	4-3-1	33	15	77
0-1-0	2	1,0	10	4-4-0	34	16	80
0-2-0	4	1,0	13				
				5-0-0	23	9,0	86
1-0-0	2	1,0	11	5-0-1	30	10	110
1-0-1	4	1,0	15	5-0-2	40	20	140
1-1-0	4	1,0	15	5-1-0	30	10	120
1-1-1	6	2,0	18	5-1-1	50	20	150
1-2-0	6	2,0	18	5-1-2	60	30	180
2-0-0	4	1,0	17	5-2-0	50	20	170
2-0-1	7	2,0	20	5-2-1	70	30	210
2-1-0	7	2,0	21	5-2-2	90	40	250
2-1-1	9	3,0	24	5-3-0	80	30	250
2-2-0	9	3,0	25	5-3-1	110	40	300
2-3-0	12	5,0	29	5-3-2	140	60	360
				5-3-3	170	80	410
3-0-0	8	3,0	24				
3-0-1	11	4,0	29	5-4-0	130	50	390
3-1-0	11	4,0	29	5-4-1	170	70	480
3-1-1	14	6,0	35	5-4-2	220	100	580
3-2-0	14	6,0	35	5-4-3	280	120	690
3-2-1	17	7,0	40	5-4-4	350	160	820
4-0-0	13	5,0	38	5-5-0	240	100	940
4-0-1	17	7,0	45	5-5-1	300	100	1 300
4-1-0	17	7,0	46	5-5-2	500	200	2 000
4-1-1	21	9,0	55	5-5-3	900	300	2 900
4-1-2	26	12	63	5-5-4	1 600	600	5 300
4-2-0	22	9,0	56	5-5-5	≥ 1 600	-	-
4-2-1	26	12	65				

Il faut se conformer aux règles données à la section 8.1 pour le choix des tubes et des dilutions à considérer pour utiliser le tableau 4. Il ne faut pas tenir compte de la siccité pour les échantillons liquides.

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les contrôles de matrice, le contrôle positif et le contrôle négatif doivent donner les résultats attendus.

La température du bain-marie doit être maintenue à $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ pendant toute la durée de l'incubation.

Les prescriptions applicables trouvées dans le document DR-12-SCA-02, intitulé « Lignes directrices concernant l'application des contrôles de la qualité en microbiologie », devront être réalisées et se révéler conformes.

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.

MINISTÈRE DE L'ENVIRONNEMENT, Critères provisoires pour la valorisation des matières résiduelles fertilisantes, Service de l'assainissement agricole et des activités de compostage, novembre 2002.

USEPA, Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge, EPA/625/R-92/013, rev. October 1999.