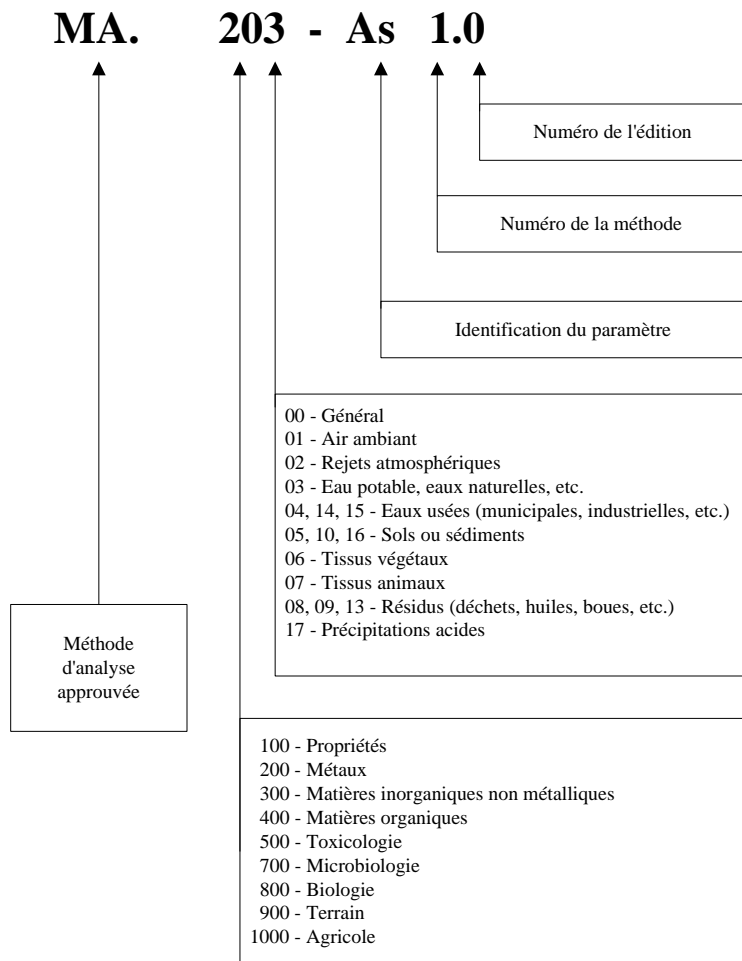


MA. 700 – PSE 1.0
Édition : 2000-04-06
Révision : 2005-09-16 (2)

Méthode d'analyse

Recherche et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* :
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 de *Pseudomonas aeruginosa* : méthode par filtration sur membrane. MA. 700 – PSE 1.0, Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2005, 18 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	5
3. FIABILITÉ	6
3.1. Interférence	6
3.2. Limite de détection	6
3.3. Limite de quantification	6
3.4. Fidélité	7
3.5. Sélectivité	7
3.6. Spécificité	7
3.7. Pourcentage de récupération	7
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	8
5. APPAREILLAGE	8
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	9
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	11
7.1. Préparation des échantillons	12
7.2. Analyse de l'échantillon	12
7.3. Observation des résultats	13
7.4. Confirmation	14
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	15
8.1. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	15
8.2. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	16
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	17
10. BIBLIOGRAPHIE	17
Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation des colonies d'entérocoques	18

INTRODUCTION

Le microorganisme *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie de la famille des *Pseudomonadaceae* en forme de bâtonnet, aérobie stricte, Gram négatif, non sporogène, cytochrome-oxydase positive, mobile par cils polaires produisant les pigments de fluorescéine et de pyocyanine.

P. aeruginosa est un indicateur valable pour les eaux à vocation récréative car il permet de vérifier l'efficacité du traitement de désinfection. Ce paramètre est en effet utilisé comme critère dans la réglementation concernant les pataugeoires et les piscines publiques. De plus, l'absence de *P. aeruginosa* est importante non seulement du point de vue de son rôle en tant qu'indicateur, mais également parce qu'il est un pathogène opportuniste dont la transmission est souvent associée à l'eau.

Cette méthode correspond à la méthode 9213E du *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA et WEF, 1998). L'étape facultative de confirmation des colonies emploie des galeries biochimiques d'identification bactérienne.

1. DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode s'applique à l'analyse d'échantillons d'eaux présentant une ou plusieurs des caractéristiques suivantes :

- eaux ne contenant pas ou peu de substances en suspension (alumine, argile et substances ferrugineuses);
- eaux très minéralisées;
- eaux qui contiennent des substances toxiques provoquant de fausses réactions avec la méthode du nombre le plus probable (NPP);
- eaux fortement contaminées et diluées aseptiquement au laboratoire à des fins d'analyse.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La méthode de la membrane filtrante consiste à recueillir, identifier et énumérer à la surface d'une membrane filtrante stérile de porosité 0,45 µm les *P. aeruginosa* présents dans un échantillon d'eau. Les résultats sont exprimés en UFC/100 ml (unités formant des colonies).

Pour ce faire, il s'agit de filtrer à travers la membrane un volume déterminé de l'échantillon et d'incuber ensuite cette membrane pendant 72 heures \pm 4 heures à 41,5 °C \pm 0,2 °C sur la gélose m-PA-C. Étant donné la température élevée et la présence d'inhibiteurs, il en résulte une croissance sélective des *P. aeruginosa* caractérisée par des colonies beige orangée ou beige-brun avec ou sans centre vert-brun. La coloration vert-brun, qui différencie les colonies de certains *P. aeruginosa*, résulte de la production des pigments de fluorescéine et de pyocyanine.

La présence des antibiotiques kanamycine et acide nalidixique inhibe la croissance d'une variété d'organismes autre que *P. aeruginosa*.

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 (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 *P. aeruginosa*. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée afin de filtrer le volume d'échantillon recommandé. 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-PA-C doit être conservée à 4 °C à l'abri de la lumière pendant une période d'entreposage maximale de une semaine. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une diminution appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu.

Les boîtes de Pétri doivent être incubées dans un délai maximal de 30 minutes après la filtration en raison de l'importance de la température d'incubation comme facteur de sélectivité de la méthode.

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.

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 se situent respectivement à 20 et 100 colonies de *P. aeruginosa*. 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. Il 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 août 2005 avec un échantillon fabriqué à partir d'une culture laboratoire de *Pseudomonas aeruginosa*. Quatre techniciens ont analysé chacun 8 replica de cet échantillon. Le coefficient de variation (rapport de l'écart type sur la moyenne) pour les 32 replica a été de 10 % pour un dénombrement moyen de 67 UFC/100 ml.

3.5. SÉLECTIVITÉ

Les observations de 198 colonies typiques et de 33 colonies atypiques sur les géloses m-PA-C indiquent un indice de sélectivité égal à 0,86 pour ce milieu lors de l'analyse de 17 échantillons.

La sélectivité d'un milieu augmente lorsque cet indice se rapproche de l'unité (1).

3.6. SPÉCIFICITÉ

L'erreur causée par la présence de faux positifs résulte de la numérotation présomptive et erronée des colonies beige orangée ou beige-brun avec ou sans centre vert-brun identifiées comme étant des *P. aeruginosa* et provenant, dans ce cas, de 69 colonies présumées typiques prélevées sur des échantillons filtrés d'eaux embouteillées.

L'identification biochimique indique que 17 colonies isolées sur les 69 colonies beige orangée ou beige-brun avec ou sans centre vert-brun ne sont pas des *P. aeruginosa*. Le facteur 1 de l'indice de spécificité ou erreur de faux positifs est donc de $17/69 = 0,25$.

L'erreur causée par la présence de faux négatifs résulte de la croissance de colonies d'apparence atypique qui sont en réalité des *P. aeruginosa*. L'identification biochimique montre que 0 colonie atypique sont des *P. aeruginosa*. Le facteur 2 de l'indice de spécificité ou erreur liée aux faux négatifs est donc de 0,00 (0 colonie cible atypique non décelée divisée par la somme de 52 (69 - 17) colonies cibles typiques décelées et de 0 colonie cible atypique non décelée).

L'indice de spécificité est donc de 0,25 en additionnant les facteurs 1 et 2. La spécificité d'un milieu de culture augmente lorsque l'indice s'approche de 0.

3.7. POURCENTAGE DE RÉCUPÉRATION

Le pourcentage de récupération a été établi à partir d'une souche de référence (*P. aeruginosa*) dont la numération a été réalisée sur un milieu non sélectif incubé à 41,5 °C. Les bactéries ont été mises en suspension dans des échantillons environnementaux, prérépétés et stabilisés à 4 °C pendant 24 heures.

Dans l'eau potable, le pourcentage de récupération est d'environ 83 % tandis qu'au niveau de l'eau de surface, on trouve environ 84 % des *P. aeruginosa* présents.

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 possiblement 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 est de 48 heures après le prélèvement et que l'échantillon devrait 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 peuvent être 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 et 100 mm x 15 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. Thermomètres permettant une lecture à 0,1 $^{\circ}\text{C}$
- 5.7. Fil à boucle
- 5.8. Tubes à essais de 16 mm x 125 mm avec bouchons
- 5.9. Autoclave
- 5.10. Bain-marie dont la température est ajustée à 41,5 $^{\circ}\text{C} \pm 0,2 ^{\circ}\text{C}$

- 5.11. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.12. Rampe de filtration avec entonnoirs et supports de filtres
- 5.13. pH-mètre
- 5.14. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.15. Réfrigérateur maintenant une température entre 2 et 6 °C
- 5.16. Pompe à vide
- 5.17. Scelleur à sacs de polyéthylène
- 5.18. Sacs de polyéthylène
- 5.19. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.20. Bouteilles de 150 ml avec bouchons
- 5.21. Incubateur dont la température est ajustée à 35 °C ± 0,5 °C
- 5.22. Stéréoscope à lampe de type « Daylight » fluorescente

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, KH₂PO₄ (CAS n° 7778-77-0)
- 6.4. Bandelettes pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase
Pathotec® cytochrome-oxydase, Remel®.
- 6.5. Galerie d'identification biochimique MicroScan® « Gram negative »

6.6. 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.

6.7. Gélose m-PA-C

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 35 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Extrait de levure	2,00 g
L-Lysine HC	15,00 g
Chlorure de sodium	5,00 g
Xylose	1,25 g
Sacharose	1,25 g
Lactose	1,25 g
Rouge phénol	0,08 g
Citrate ferrique ammoniacal	0,80 g
Thiosulfate de sodium	5,00 g
Sulfate de magnésium	1,50 g
Kanamycine	0,008 g
Acide nalidixique	0,037 g
Agar	12,0 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 35,0 g de milieu déshydraté et ajouter 1 000 ml d'eau. Bien mélanger. Chauffer sous agitation fréquente et laisser bouillir pendant 1 minute de manière à dissoudre complètement la poudre. 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.* 6.2) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.6). 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 une semaine au maximum. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une diminution appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu.

6.8. 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 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. 6.2) ou de NaOH 1 N (cf. 6.6). Répartir environ 8 ml dans des tubes de 16 mm x 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.

6.9. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH_2PO_4 anhydre (cf. 6.3) dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.6) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.10. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.9) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de polypropylène ou des flacons laveurs et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 20 minutes. L'eau tamponnée de rinçage se conserve deux mois à 4 °C.

6.11. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de $90 \text{ ml} \pm 2 \text{ ml}$ après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois 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 les supports de filtre soient lavés et stérilisés aux rayons ultraviolets après toute 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, eaux de lixiviation, etc.) et avant de poursuivre l'analyse sur des échantillons peu contaminés (eau de consommation).

L'absence de *P. aeruginosa* dans chaque entonnoir et support de filtre doit être vérifiée avant chaque série d'analyses d'eau. Procéder en rinçant la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ de 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (cf. 6.10), filtrer sur une membrane stérile et incubé pendant 24 heures \pm 2 heures à 41,5 °C \pm 0,2 °C sur le milieu m-PA-C. La fréquence de ce contrôle peut dépendre de la qualité de l'eau analysée. En tout temps, les exigences prescrites par le DR-12-SCA-02 doivent être respectées.

7.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Tous les échantillons doivent être homogénéisés en agitant vigoureusement les bouteilles d'un mouvement vertical. Avant d'effectuer l'analyse, laisser reposer l'échantillon pendant 2 minutes afin de stabiliser le mélange de microorganismes.

Les échantillons soupçonnés d'être fortement contaminés (eaux usées, etc.) doivent être traités de façon à obtenir, pour un volume donné d'échantillon, entre 20 et 100 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 d'eau dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (cf. 6.11) (1 : 10);
- bien agiter la bouteille d'eau tamponnée afin de disperser l'échantillon;
- 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 de rinçage (cf. 6.10) 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’épaule interne de l’entonnoir. Enlever la dernière goutte de la pipette à l’aide de la poire.

Provenance de l’eau	Volume en ml*
Aqueduc privé ou municipal non traité	100 ou 50 ml
Aqueduc privé ou municipal traité	100 ml
Puits de surface, artésien, tubé ou foré	100 ou 50 ml
Rivière, ruisseau ou lac	50, 10 et 1 ml
Piscine	100 ml

* : 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 à 30 ml d’eau 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-PA-C.

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.
- Le plus rapidement possible après la filtration, placer les boîtes de Pétri dans des sacs en polyéthylène, les fermer avec le scelleur, puis les immerger complètement en position inversée dans un bain-marie à $41,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ pendant 72 heures \pm 4 heures. L’inversion des boîtes de Pétri empêche la condensation de se déposer 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.

Effectuer l’observation des membranes le plus tôt possible après la période d’incubation à l’aide d’un stéréoscope réglé à un grossissement de 10 X à 15 X. L’aspect des colonies de *P. aeruginosa* sur gélose m-PA-C est de couleur beige orangée ou beige-brun avec ou sans centre

vert-brun (en raison de la présence des pigments de fluorescéine et de pyocyanine). Choisir les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 100 colonies typiques et au maximum 200 colonies de toutes sortes. Une confirmation biochimique est nécessaire pour s'assurer de la présence de *P. aeruginosa*.

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

7.4. CONFIRMATION

La méthode décrite précédemment est une méthode de dénombrement et d'identification présumée de *P. aeruginosa*. Cette désignation signifie que les bactéries isolées sont reconnues comme la bactérie cible recherchée à l'aide de réactions biochimiques caractéristiques. Dans certains cas, ces réactions peuvent produire des faux positifs ou des faux négatifs qu'il faut éliminer 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 le milieu m-PA-C par la coloration beige orangée ou beige-brun avec ou sans centre vert-brun et supporte l'interprétation de cette coloration. Cette confirmation devrait être effectuée sur au moins 5 colonies suspectes ou selon un nombre de colonies évaluées à 10 % des colonies présentes sur la membrane filtrante.

7.4.1. Propagation des souches suspectes

Prélever, à l'aide d'un fil à boucle, une colonie bien isolée sur la gélose m-PA-C et effectuer une propagation de la souche par étalement sur gélose cœur-cerveille inclinée (cf. 6.8). Placer dans l'incubateur à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ 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). *P. aeruginosa* possède l'enzyme appelé cytochrome-oxydase (réaction positive). Pour l'utilisation des bandelettes, voir les instructions du fabricant.

7.4.3. Identification avec les galeries d'identification biochimique

Pour obtenir l'identification de la colonie à confirmer, inoculer une galerie d'identification biochimique MicroScan® « Gram negative » (cf. 6.5) à partir de la croissance présente sur la gélose de propagation. Pour l'utilisation des galeries d'identification biochimique, voir les instructions du fabricant.

7.4.4. Pourcentage de confirmation

Inscrire sur la feuille de travail le nombre et le pourcentage de colonies qui, selon la confirmation précédente, sont reconnues *P. aeruginosa*. 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-PA-C ont été soumises aux étapes de confirmation et si 3 de ces colonies se sont révélées être *P. aeruginosa*, selon les critères du test le pourcentage de confirmation est le suivant :

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

8. **CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**

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 :

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

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

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

8.1. 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 100 colonies.

Exemples :

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 :

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

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 en deçà de la limite inférieure de quantification

Additionner toutes les colonies sur l'ensemble des membranes tout en tenant compte des volumesensemencés de l'échantillon 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'un 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 UFC/100 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 faible volume d'échantillon 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 (100 pour *P. aeruginosa*) et du plus faible volume d'échantillon filtré (0,01 ml) :

$$\frac{100}{0,01} \times 100 = 1\,000\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

> 1 000 000 UFC/100 ml

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

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

La température du bain-marie doit être maintenue à 41,5 °C ± 0,2 °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.

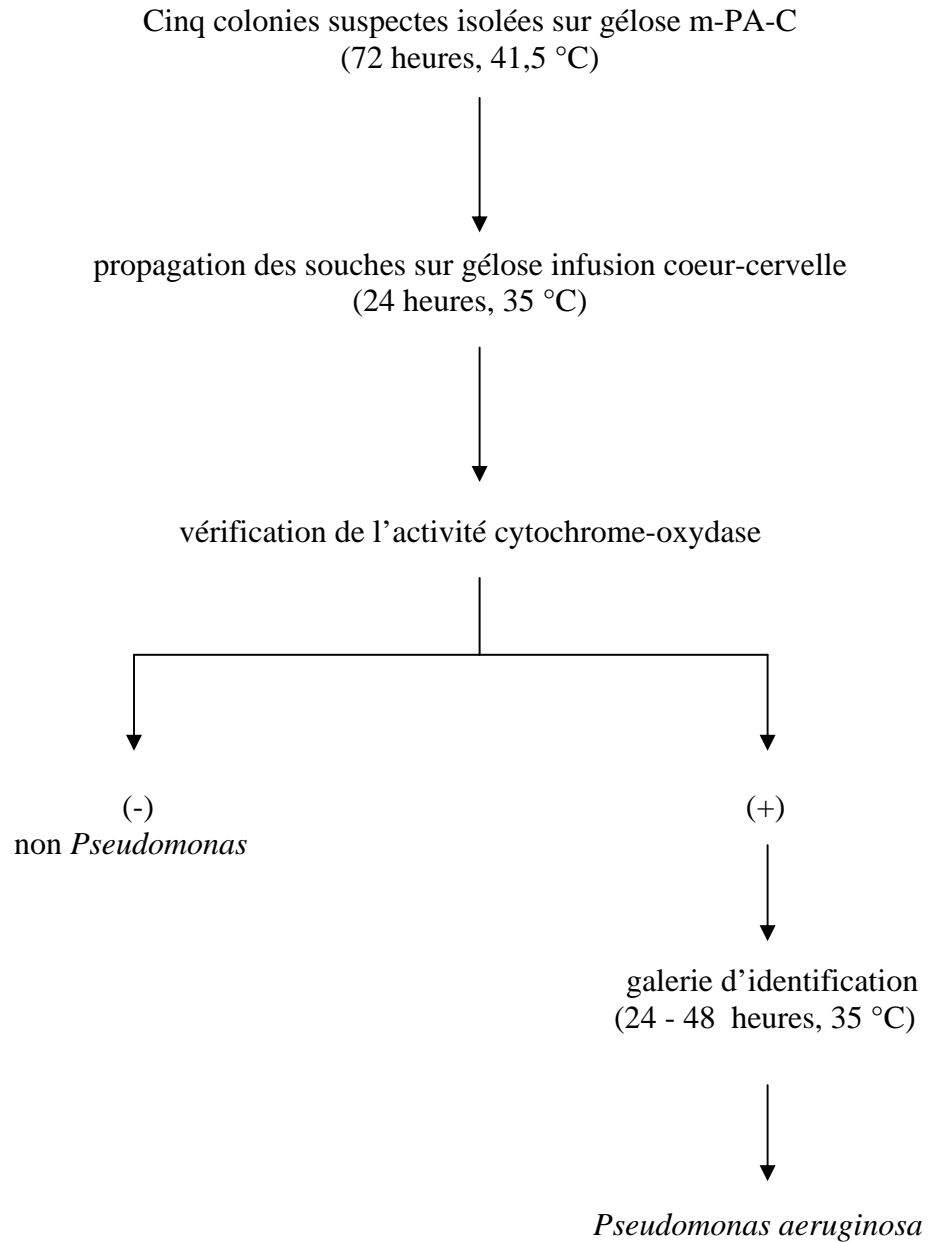


Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation