

MA. 700 – Ec-mTEC 1.0

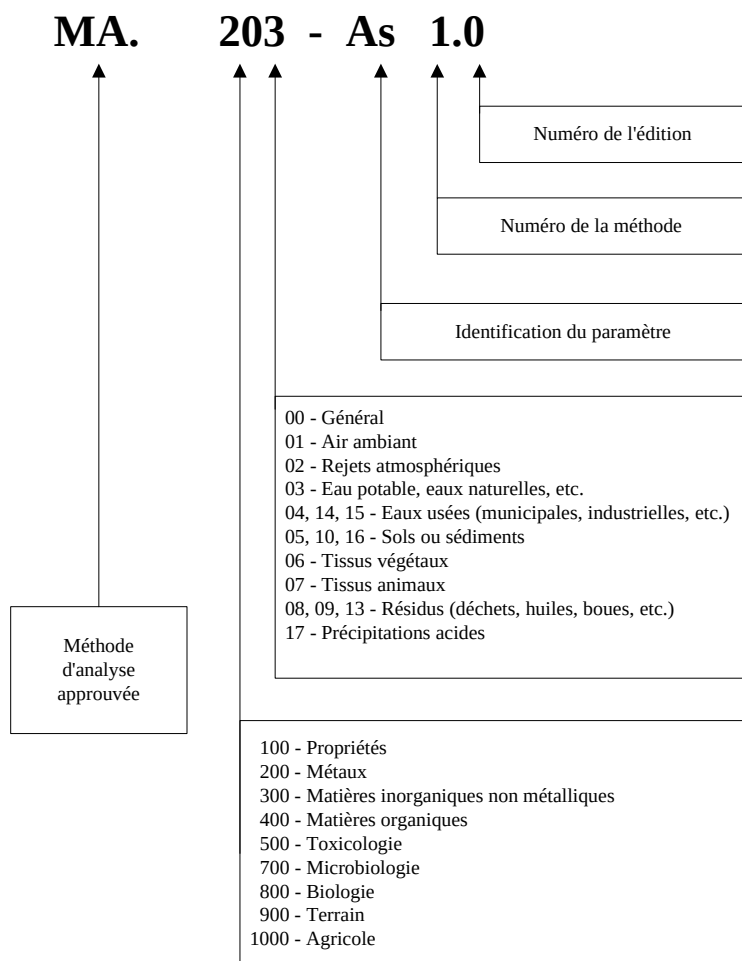
Édition : 2005-08-25

Révision : 2006-12-07 (2)

Méthode d'analyse

Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli*
thermotolérant : méthode par filtration sur membrane
utilisant le milieu de culture mTEC modifié

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC,
Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* thermotolérant : méthode par filtration sur membrane utilisant le milieu de culture mTEC modifié. MA. 700 – Ec-mTEC 1.0, Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, 2006, 20 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	6
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. FIABILITÉ	7
3.1. Interférence	7
3.2. Limite de détection	7
3.3. Limite de quantification	7
3.4. Fidélité	8
3.4.1. Répétabilité	8
3.5. Sélectivité	8
3.6. Taux de faux positifs et de faux négatifs	8
3.7. Comparaison « <i>E. coli</i> » (ma.700 – Ec-mtec 1.0) avec « coliformes fécaux confirmés » (MA.700 – Fec.Ec 1.0)	8
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	9
5. APPAREILLAGE	9
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	10
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	12
7.1. Préparation des échantillons	13
7.2. Analyse de l'échantillon	13
7.3. Observation des résultats	15
7.4. Confirmation	15
7.4.1. Propagation des souches suspectes	15
7.4.2. Épreuve de l'activité cytochrome-oxydase	15
7.4.3. Identification d' <i>E. coli</i>	15
7.4.4. Pourcentage de confirmation	16

8.	CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	16
8.1.	Échantillons d'eau de surface et d'eaux usées	16
8.2.	Échantillons solides (boues, sols et déchets)	16
8.3.	Exemples de dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	17
8.4.	Exemples de dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	18
8.4.1.	Dénombrement lorsque le nombre de colonies isolées sur les membranes est inférieur à la limite de quantification	18
8.4.2.	Dénombrement lorsque aucune colonie n'a été isolée sur les membranes correspondant à plusieurs volumes filtrés d'un échantillon	18
8.4.3.	Dénombrement lorsque tous les résultats de plusieurs volumes filtrés d'un échantillon sont au-delà de la limite supérieure de quantification	18
9.	CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	19
10.	BIBLIOGRAPHIE	19

INTRODUCTION

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est un bâtonnet à Gram négatif asporulé. Elle est aérobie ou anaérobie facultative. Sa température optimale de croissance avoisine les 35-37 °C, mais elle est aussi capable de croître à une température de 44,5 °C. Elle est capable de fermenter le lactose et possède les enzymes β -galactosidase et β -glucuronidase.

E. coli est un habitant normal de l'intestin des humains et des animaux à sang chaud. Par exemple, les matières fécales humaines contiennent environ 10^8 *E. coli* par gramme. Cette bactérie joue un rôle utile dans l'intestin en participant, entre autres, à la synthèse de vitamines. Cependant, certaines souches particulières d'*E. coli* présentent un pouvoir pathogène important. Ainsi, la maladie du hamburger est causée par une souche pathogène d'*E. coli*, le sérotype O157:H7, qui était aussi le principal microorganisme pathogène responsable de l'épidémie de Walkerton (Ontario). Malgré certains cas tragiques d'éclosions liées à des souches pathogènes d'*E. coli*, ces dernières sont rarement transmises par l'eau. Il est à noter que les méthodes utilisées pour les analyses de routine d'*E. coli* dans l'eau ne permettent pas de distinguer les souches pathogènes de celles qui ne le sont pas.

En raison de sa capacité de croître à la température de 44,5 °C, *E. coli* fait partie du groupe des coliformes thermotolérants (aussi appelés « coliformes fécaux »), qui est lui-même inclus dans le groupe des coliformes totaux. Cette bactérie est utilisée comme indicateur de contamination fécale. La présence d'*E. coli* dans l'environnement indique de manière presque certaine une contamination fécale plus ou moins récente et la possibilité d'y trouver également d'autres microorganismes pathogènes tels des bactéries, des virus ou des parasites. *E. coli* présente une meilleure spécificité en tant qu'indicateur de contamination fécale que les coliformes thermotolérants, puisque généralement, toutes les bactéries *E. coli* trouvées dans l'environnement ont une origine fécale, contrairement à certaines bactéries du groupe des coliformes thermotolérants, qui peuvent être de provenance environnementale ou industrielle. Par exemple, la bactérie *Klebsiella pneumoniae* est souvent présente en concentration élevée dans les effluents des usines de pâtes et papiers et elle donne un résultat positif avec les tests de coliformes thermotolérants. Dans ce cas cependant, *K. pneumoniae* n'est pas d'origine fécale.

En soi, la bactérie *E. coli* a probablement peu d'incidence sur l'environnement. Toutefois, la contamination fécale qu'elle indique peut être responsable de la transmission de plusieurs maladies aux humains et aux animaux. La baignade, le canotage et les autres activités récréatives de même que l'utilisation de l'eau comme source d'eau potable sont autant d'usages qui sont compromis par la pollution fécale.

Les rejets d'eaux usées domestiques ainsi que certaines activités agricoles telles que l'épandage de fumier ou de lisier sont des sources des *E. coli* trouvés dans l'environnement. Les animaux sauvages ou domestiques sont également une source non négligeable d'*E. coli*.

Sur le plan des diverses recommandations et réglementations touchant les pollutions fécales ailleurs dans le monde, *E. coli* tend de plus en plus à remplacer les coliformes thermotolérants (fécaux). Au Québec, les règlements et les programmes administrés par le ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec parlent encore de coliformes fécaux, mais nous devrions y voir *E. coli* de plus en plus dans le futur. Par exemple, le Programme Environnement-Plage contient des critères pour les coliformes fécaux,

qui pourraient, après un examen approprié, être remplacés par des critères pour *E. coli*. Cette bactérie est également considérée comme critère de qualité de l'eau dans la révision du Règlement sur les pataugeoires et les piscines publiques.

Par ailleurs, *E. coli* peut dès maintenant être employé pour effectuer des vérifications en relation avec l'article 20 de la Loi sur la qualité de l'environnement. En effet, il est mentionné dans cet article que nul ne peut émettre dans l'environnement un contaminant « susceptible de porter atteinte à la vie, à la santé, à la sécurité, au bien-être ou au confort de l'être humain ». *E. coli* est un paramètre qui permet de démontrer l'existence d'une pollution fécale en infraction avec l'article 20 de la Loi sur la qualité de l'environnement.

La présente méthode pour la détection d'*E. coli*, rapide (résultats en 24 heures) et peu coûteuse, est une adaptation de la méthode USEPA 1603 (USEPA, 2002). La version originale de cette méthode, version dans laquelle la membrane filtrante devait être transférée sur un tampon imbibé d'urée, a été publiée par Dufour *et al.*, en 1981. L'USEPA a publié la version officielle de cette méthode originale en 1985 (USEPA, 1985). La modification qui introduisit le BCIG dans le milieu mTEC a été publiée pour la première fois par l'USEPA, en 2000 (USEPA, 2000). En juillet 2006, l'USEPA a publié une nouvelle version de la méthode 1603 (USEPA, 2006). Cette nouvelle version inclut les données d'une validation interlaboratoire et permet d'employer cette méthode pour vérifier la présence d'*E. coli* dans les eaux usées désinfectées.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode permet le dénombrement d'*Escherichia coli* thermotolérant dans les échantillons liquides et les échantillons solides dilués. Elle est particulièrement adaptée à l'analyse des eaux de surface et des eaux usées. Elle n'est pas validée pour la recherche d'*E. coli* dans les échantillons d'eau potable. Cette méthode ne permet pas la mise en évidence des sérotypes pathogènes d'*E. coli*.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La technique de filtration sur membrane consiste à recueillir, identifier et dénombrer les bactéries recherchées à la surface d'une membrane filtrante stérile. Les eaux usées doivent faire l'objet de dilutions et les solides sont mis en suspension et dilués dans une solution tampon avant l'analyse. La méthode consiste à filtrer, à travers une membrane de porosité de 0,45 µm, un volume déterminé de l'échantillon et d'incuber ensuite cette membrane sur une gélose mTEC modifiée d'abord pendant $2 \pm 0,5$ heures à 35 °C pour faciliter la réactivation des bactéries endommagées, puis pendant 22 ± 2 heures à 44,5 °C. Dans ces conditions, *E. coli* forme des colonies allant du rouge au magenta, alors que quelques autres espèces bactériennes forment des colonies blanches ou incolores.

La sélectivité du milieu est assurée par la présence de deux inhibiteurs souvent trouvés dans les milieux de culture pour les coliformes – le lauryl sulfate de sodium et le désoxycholate de sodium –, qui inhibent la croissance de la majorité des organismes à Gram positif. La température élevée d'incubation (44,5 °C) est aussi un élément sélectif de la méthode, car elle ne permet pas la croissance de la majorité des bactéries coliformes. Seul *E. coli* et quelques souches des autres

espèces de bactéries coliformes arrivent à se multiplier sur le milieu de culture mTEC modifié à cette température.

Le milieu mTEC modifié permet la différenciation d'*E. coli* parce qu'il contient du BCIG (5-Bromo-6-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide), un substrat enzymatique qui devient rouge ou magenta lorsqu'il est catabolisé par l'enzyme β -D-glucuronidase, présente chez *E. coli*. Cette enzyme scinde le BCIG en acide glucuronique ainsi qu'en un composé de couleur rouge ou magenta.

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. D'ailleurs, le rejet d'une portion de l'échantillon au laboratoire risquerait de modifier la concentration initiale des bactéries par unité de volume de l'échantillon et de fausser le résultat. L'analyse d'échantillons de ce genre doit donc 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 d'*E. coli*. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée afin de filtrer le volume d'échantillon requis. L'utilisation d'une autre méthode doit être envisagée si l'emploi de plusieurs membranes ne constitue pas une solution valable pour remédier à ces interférences.

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.

Les boîtes de Pétri doivent être mises en incubation dans un délai maximal de 30 minutes après la filtration, car la température d'incubation est un facteur important de sélectivité de la méthode.

3.2. LIMITE DE DÉTECTION

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

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification pour cette méthode se situent entre 20 et 80 UFC. 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 avec un échantillon d'eau de surface (rivière Cap-Rouge). Six techniciens ont analysé chacun six réplicats de cet échantillon. Des volumes de 100 et de 50 ml ont été filtrés pour chaque réplicat. L'échantillon avait été prélevé depuis environ 30 heures au moment de l'analyse. Le coefficient de variation pour l'ensemble des 36 réplicats a été de 15 % pour un résultat moyen de 61 UFC/100 ml.

3.5. SÉLECTIVITÉ

Quatre-vingt-dix-sept colonies provenant de 4 échantillons d'eau de surface ont été employées pour déterminer la sélectivité du milieu de culture mTEC modifié. Quatre-vingt-onze colonies avaient une coloration rouge ou magenta typique d'*E. coli* sur ce milieu alors que 6 colonies étaient incolores. La sélectivité de ce milieu dans les eaux de surface a donc été de 94 %.

3.6. TAUX DE FAUX POSITIFS ET DE FAUX NÉGATIFS

Quatre-vingt-quatorze des 97 colonies mentionnées à la section 3.5 ont été identifiées à l'espèce à l'aide de galeries biochimiques d'identification, les 3 colonies manquantes n'ayant pas poussé après leur isolement primaire sur le milieu mTEC modifié. Quatre-vingt-neuf colonies rouges ou magenta ont été identifiées à l'espèce *E. coli* (vrai positif), 2 colonies incolores ont été identifiées comme étant des bactéries *E. coli* (faux négatif), 3 colonies incolores n'étaient effectivement pas des *E. coli* (vrai négatif) et aucune colonie rouge ou magenta qui n'était pas des bactéries *E. coli* (faux positif) n'a été observée. Deux des colonies incolores appartenaient à l'espèce *Klebsiella pneumoniae* et la troisième appartenait à l'un ou l'autre des genres *Klebsiella*, *Enterobacter* ou *Serratia*, l'identification ayant été peu concluante.

Le taux de faux positifs obtenu dans le laboratoire du CEAEQ a donc été de 0 % et le taux de faux négatifs a été de 2 %, pour une efficacité générale de 98 %.

3.7. COMPARAISON « E. COLI » (MA.700 – EC-MTEC 1.0) AVEC « COLIFORMES FÉCAUX CONFIRMÉS » (MA.700 – FEC.EC 1.0)

Soixante et un échantillons d'eau de surface et trente-cinq échantillons d'eaux usées ont été analysés en parallèle avec la présente méthode pour *E. coli* et avec la méthode MA.700 – Fec.Ec 1.0 pour les « coliformes fécaux confirmés ». Les résultats des deux méthodes ont été comparés à l'aide d'un test statistique non paramétrique de comparaison pour échantillons appariés (Wilcoxon Signed Rank Test). En considérant l'ensemble des résultats (eaux de surface et eaux usées), il n'y a pas de différence significative ($P = 0,257$). En considérant séparément les eaux de surface et les eaux usées, il n'y a pas non plus de différence significative ($P = 0,169$ et $P = 0,902$). Par conséquent, les résultats des deux méthodes sont équivalents pour les eaux de surface et les eaux usées.

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 entre la surface du liquide et le bouchon.

De plus, les contenants utilisés pour le prélèvement des échantillons d'eau potentiellement chlorée, notamment les eaux de piscines et de bassins artificiels, 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. Une telle concentration est suffisante pour neutraliser jusqu'à environ 15 mg/l de chlore résiduel (APHA, 2005). 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 doit être protégé contre les effets de la température à l'aide d'un isolant thermique ou 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. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.2. pH-mètre
- 5.3. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.4. Autoclave
- 5.5. Stérilisateur à rayons ultraviolets
- 5.6. Rampe de filtration avec entonnoirs et supports de filtres
- 5.7. Pompe à vide
- 5.8. Boîtes de Pétri d'environ 49 mm x 9 mm
- 5.9. Membranes filtrantes stériles quadrillées de porosité de 0,45 μm et de 47 mm de diamètre

- 5.10. Pincettes en acier inoxydable à bouts plats
- 5.11. Pipettes stériles de type TD de 10,0 et 1,0 ml
- 5.12. Thermomètre permettant une lecture à 0,1 °C
- 5.13. Incubateur dont la température est ajustée à $35 \pm 0,5$ °C
- 5.14. Bain-marie dont la température est ajustée à $44,5 \pm 0,2$ °C
- 5.15. Sacs de polyéthylène
- 5.16. Scelleur à sacs de polyéthylène
- 5.17. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.18. Bouteilles de 150 ml avec bouchon
- 5.19. Fil à boucle
- 5.20. Microscope à faible grossissement ($< 15\times$)

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité ACS, 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 ultrapure. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

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

Solution commerciale 10 N.

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

Solution commerciale 1 N.

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

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

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

- 6.5. 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.

6.6. Solution d'hydroxyde de sodium 0,2 N

Ajouter 100 ml de la solution de NaOH 1 N (cf. 6.5) dans environ 300 ml d'eau et compléter à 500 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à la température ambiante.

6.7. Gélose mTEC modifiée

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 45,6 g/litre et sa formulation telle que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Protéose peptone n° 3	5,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Lactose	10,0 g
Chlorure de sodium	7,5 g
Phosphate de potassium dibasique	3,3 g
Phosphate de potassium monobasique	1,0 g
Lauryl sulfate de sodium	0,2 g
Désoxycholate de sodium	0,1 g
5-Bromo-6-chloro-3-indolyl-β-D-glucoronide	0,5 g
Agar	15,0 g

Dissoudre 45,6 g de milieu déshydraté dans 1 000 ml d'eau. Bien homogénéiser et ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.2) ou de NaOH 1 N (cf. 6.5) si nécessaire. Chauffer sur une plaque chauffante jusqu'à l'ébullition. Faire bouillir pendant une minute pour dissoudre complètement la poudre. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes. Répartir en volumes de 4 ml dans des boîtes de Pétri de 49 mm x 9 mm et laisser solidifier. Le pH final doit être de $7,3 \pm 0,2$ à 25 °C.

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

6.8. Gélose infusion cœur-cervele

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

Formule en grammes par litre d'eau

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

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

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. 6.5). 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 4 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. 6.5) 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) pour chaque 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.

6.11. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate pour chaque litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de 90 ± 2 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 tous les entonnoirs et supports de filtre soient lavés et stérilisés aux rayons ultraviolets après toute série d'analyses et interruption de travail supérieure à 15 minutes. La stérilisation aux rayons ultraviolets est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau.

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

L'absence d'*E. coli* 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 20 ml à 30 ml d'eau de

rinçage (cf. 6.10), filtrer sur une membrane stérile et incuber sur le milieu mTEC modifié selon les temps et les températures indiqués à la section 7.2. 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.

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 g d'échantillon sont prélevés et mis en suspension dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (cf. 6.11) (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 en série sont effectuées de la façon suivante :

- en conditions aseptiques, pipetter 10 ml d'échantillon liquide dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (10^{-1}) ou encore 10 ml de la dilution 10^{-1} d'un échantillon solide dans 90 ml d'eau tamponnée (10^{-2});
- 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 (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc.);
- changer de pipette entre chaque dilution.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- Stériliser 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 recommandés selon la nature de l’échantillon analysé (voir le tableau ci-dessous). Pour les volumes de 10 ml ou moins, introduire de 20 à 30 ml d’eau tamponnée 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	Volumes en ml
- Eaux souterraines (puits ou piézomètre)	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 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 mTEC modifiée (cf. 6.7).

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. Il faut les éliminer si possible.

- 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 incubent à $35 \pm 0,5$ °C pendant $2 \pm 0,5$ heures en position inversée.
- Ensuite, poursuivre l’incubation des boîtes de Pétri à une température de $44,5 \pm 0,2$ °C pendant 22 ± 2 heures en les immergeant complètement en position inversée dans un bain-marie.

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.

La couleur caractéristique des colonies d'*Escherichia coli* sur la gélose mTEC modifiée varie du rouge au magenta. Choisir les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 80 colonies d'*E. coli* et au maximum 200 colonies de toutes sortes.

Effectuer les observations à l'aide d'un microscope à faible pouvoir de grossissement lorsque la lecture des colonies est difficile.

Inscrire sur la feuille de travail le nombre de colonies d'*E. coli* 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 d'*E. coli*. Les taux de faux positifs et de faux négatifs (cf. 3.6) de cette méthode sont excellents, mais dans certains cas il peut être souhaitable de confirmer que les colonies obtenues appartiennent bien à l'espèce *E. coli*.

Lorsque la confirmation est requise, il est recommandé de procéder d'abord à un test de l'oxydase, puis à l'identification des colonies oxydase négatives à l'aide d'un système d'identification biochimique (système API 20E[®], système BBL Crystal[®], système MicroScan[®], etc.). Cette confirmation doit 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 mTEC modifiée et effectuer une propagation de la souche par étalement sur gélose infusion cœur-cerveille inclinée (cf. 6.8). Placer dans un incubateur à 35,0 ± 0,5 °C pendant 18 à 24 heures.

7.4.2. Épreuve de l'activité cytochrome-oxydase

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

7.4.3. Identification d'*E. coli*

Suivre les indications du fabricant pour l'identification des souches suspectes à l'aide d'un système biochimique d'identification.

7.4.4. Pourcentage de confirmation

Inscrire sur la feuille de travail le nombre et le pourcentage de colonies qui, selon la procédure de confirmation, appartiennent à l'espèce *E. coli*. Établir le pourcentage de confirmation comme suit :

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

Exemple :

Si 5 colonies sur le milieu mTEC modifié ont été soumises aux étapes de confirmation et si 3 de ces colonies se sont révélées être des colonies d'*E. coli*, le pourcentage de confirmation est le suivant :

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

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1. ÉCHANTILLONS D'EAU DE SURFACE ET D'EAUX USÉES

De façon générale, choisir la ou les membranes avec un nombre de colonies 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 :

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

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 ET DÉCHETS)

De façon générale, choisir la ou les membranes avec un nombre de colonies 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 :

$$UFC/g \text{ (poids humide)} = \frac{\text{Nombre de colonies d' } E. coli}{\text{Poids de l'échantillon humide en grammes}}$$

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

Le poids de l'échantillon analysé est déterminé de la façon suivante :

- la filtration de 1 ml de la dilution de 10 g 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 dans l'application de gestion par critère, il peut être nécessaire d'exprimer le résultat en fonction du poids sec de l'échantillon. Dans ce 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 :

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

8.3. EXEMPLES DE 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) :

$$\frac{55 + 30}{1,0 + 0,1} \times 100 = 7\,700 \text{ UFC/100 ml}$$

NOTE – Le résultat final est arrondi.

8.4. EXEMPLES DE 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'échantillonensemencés, et exprimer le résultat par 100 ml.

Exemples :

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

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

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

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

8.4.2. 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 plus grand volume d'échantillon filtré.

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

8.4.3. 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 faible volume d'échantillon utilisé.

Exemple :

Si des volumes de 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml produisent respectivement les résultats TNI, 150 et 110 colonies, tous ces dénombrements sont au-delà de la limite supérieure de quantification. Estimer le résultat à l'aide de la limite de quantification (80 pour *E. coli*) 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 d'*E. coli* ou de tout autre microorganisme.

La température du bain-marie doit être maintenue à $44,5 \pm 0,2$ °C pendant toute la durée de la seconde phase 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, 21st Edition, 2005.

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.

DUFOUR, A.P., E.R. STRICKLAND, and V.J. CABELLI, Membrane Filter Method for Enumerating *Escherichia coli*, *Applied and Environmental Microbiology*, 41(5): 1152-1158, 1981.

USEPA, Test Method for *Escherichia coli* and Enterococci in water by the membrane filter procedure, Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH, EPA-600/4-85/076, 1985.

USEPA, Ambient Water Quality Criteria for Bacteria, EPA-440/5-84/002, 1986, 18 p.

USEPA, Improved Enumeration Methods for the Recreational Water Quality Indicators: Enterococci and *Escherichia coli*, Office of Science and Technology, Washington, DC, EPA/821/R-97/004, 2000.

USEPA, Method 1603: *Escherichia coli* (*E. coli*) in Water by Membrane Filtration Using Modified Membrane-Thermotolerant *Escherichia coli* Agar (Modified mTEC), EPA 821-R-02-023, September 2002.

USEPA, Method 1603: *Escherichia coli* (*E. coli*) in Water by Membrane Filtration Using Modified Membrane-Thermotolerant *Escherichia coli* Agar (Modified mTEC), EPA 821-R-02-023, July 2006.