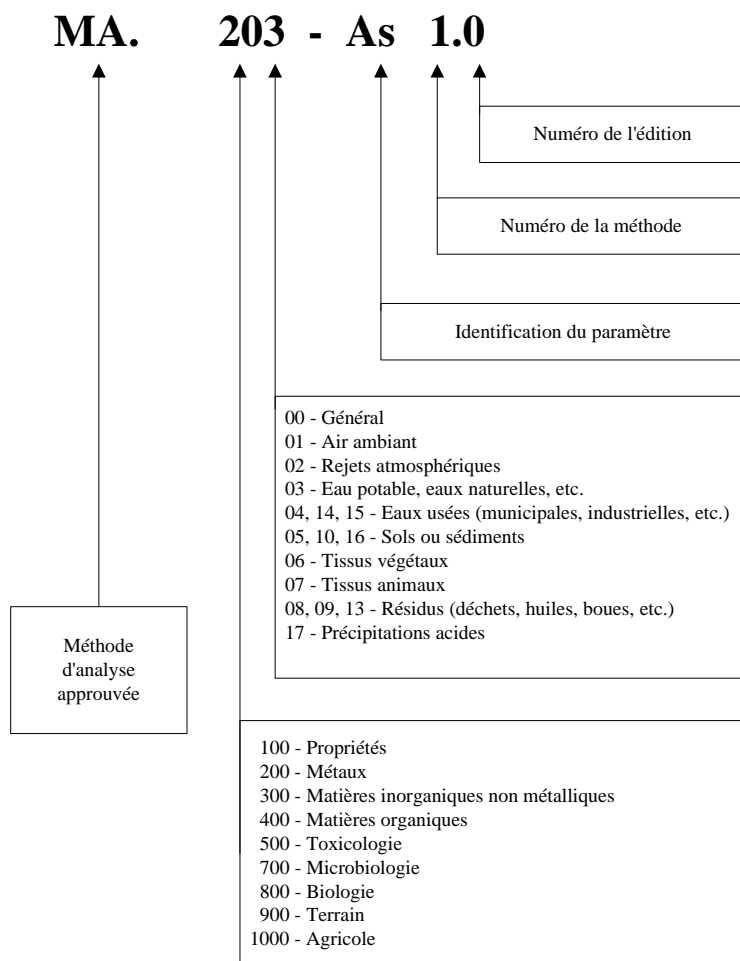


MA. 700 – Ent 1.0
Édition : 2000-04-06
Révision : 2006-10-25 (3)

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

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 des entérocoques : méthode par filtration sur membrane,
MA. 700 – Ent 1.0, Rév. 3, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des
Parcs du Québec, 2006, 23 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	6
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. FIABILITÉ	6
3.1. Interférence	6
3.2. Limite de détection	7
3.3. Limite de quantification	7
3.4. Fidélité	7
3.5. Sélectivité	7
3.6. TAux de faux positifs et de faux négatifs	7
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	8
5. APPAREILLAGE	8
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	9
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	13
7.1. Préparation des échantillons	14
7.2. Analyse de l'échantillon	14
7.3. Observation des résultats	15
7.4. Confirmation	16
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	19
8.1. Échantillons d'eau potable, d'eau de surface et d'eaux usées	19
8.2. Échantillons solides (boues, sols et déchets)	19
8.3. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	20
8.4. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	20
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	22
10. BIBLIOGRAPHIE	22
Figure 1 – Schéma du protocole de confirmation des colonies d'entérocoques	23

INTRODUCTION

Il a été reconnu dans les années quatre-vingt-dix que le genre *Streptococcus* est en réalité composé de trois genres distincts : *Streptococcus*, *Enterococcus* et *Lactococcus*.

Ce développement des connaissances entraîne des changements au niveau de l'ancienne nomenclature du groupe des streptocoques fécaux, comprenant les streptocoques du groupe D de la sérologie de Lancefield divisé en deux sous-groupes, les entérocoques et les non-entérocoques. Le sous-groupe des entérocoques est désormais considéré comme un nouveau genre dans la nomenclature bactérienne, celui des *Enterococcus*. Le sous-groupe des non-entérocoques demeure avec le genre *Streptococcus*.

La présente méthode analytique permet de dénombrer et d'identifier les mêmes bactéries qu'auparavant, c'est-à-dire le genre *Enterococcus*.

Les bactéries du genre *Enterococcus* du groupe D font partie de la classification sérotypique de Lancefield. Elles se ressemblent du point de vue biochimique, immunologique ou génétique, même si elles ont une origine fécale ou non fécale.

Les entérocoques sont des bactéries sphériques, en paire ou en chaîne, à Gram positif, catalase négative et anaérobies facultatives. Ils ne forment pas d'endospores et certaines espèces font preuve de mobilité. Les entérocoques se développent en 48 heures à 35 °C sur un milieu de culture m-*Enterococcus* et forment des colonies variant de rose pâle à rouge vin. De plus, tous les entérocoques hydrolysent l'esculine en présence de bile. Ce test est caractéristique des bactéries du groupe D de Lancefield. Ils ont la capacité de croître à 10 °C et 45 °C, à pH 9,6 ou en présence de NaCl 6,5 %. Cette capacité de se multiplier en milieu salin les distingue de *Streptococcus bovis* et *Streptococcus equinus* (Streptocoques du groupe D de Lancefield).

Les espèces suivantes sont actuellement reconnues comme entérocoques : *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*, *E. gallinarum*, *E. cecorum*, *E. hirae*, *E. casseliflavus*, *E. malodoratus*, *E. mundtii*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* et *E. solitarius*.

La présence des entérocoques d'origine fécale est généralement associée à celle des coliformes fécaux, bien que ces derniers soient moins résistants au milieu naturel et à la désinfection.

Il existe également des entérocoques d'origine non fécale provenant de matières végétales, du sol et des insectes. Ces espèces ne sont pas associées à la présence de coliformes fécaux. Étant donné qu'il est difficile de discriminer les entérocoques d'origine fécale et les entérocoques d'origine non fécale, ils doivent être perçus comme un indicateur de pollution d'origine organique au même titre que les coliformes totaux.

Cette méthode correspond à la méthode 9230C du manuel de référence *Standard Methods for the Examination of Water and Wasterwater* (APHA, AWWA et WEF, 1998). Le milieu de culture employé est le m-*Enterococcus*. La procédure de confirmation correspond à celle qui est décrite dans la méthode 9230C à la section 5.

1. DOMAINE D'APPLICATION

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

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La méthode de filtration sur membrane consiste à recueillir, identifier et dénombrer, à la surface d'une membrane filtrante stérile, les bactéries recherchées dans un échantillon. Les eaux usées doivent faire l'objet de dilutions et les solides doivent être mis en suspension et dilués dans un tampon phosphate. Pour les entérocoques, un volume déterminé de l'échantillon est filtré à travers une membrane de porosité de 0,45 µm et incubé pendant 48 heures ± 3 heures à 35,0 °C ± 0,5 °C sur un milieu sélectif tel que m-*Enterococcus*. La sélectivité du milieu m-*Enterococcus* est liée à la présence d'azoture de sodium, qui inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif. Les entérocoques forment des colonies caractéristiques roses ou rouges, résultant de la réduction du chlorure de triphényltétrazolium en un composé rouge foncé et insoluble appelé triphénylformazan. Cette réaction permet de les dénombrer et de les identifier de façon présomptive. La présence d'entérocoques est par la suite confirmée par une réaction négative à l'épreuve de la catalase, par des réactions positives de croissance en bouillon à 45 °C, en milieu NaCl 6,5 % à 35 °C et par l'hydrolyse de la bile esculine en milieu gélosé.

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.) dans l'échantillon peut nuire à la filtration en colmatant la membrane. Les matières en suspension accumulées sur la membrane peuvent également entraver l'observation des colonies en masquant ou en inhibant la croissance des entérocoques. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée afin de filtrer le volume d'échantillon requis. La technique de fermentation en tubes multiples (TFTM) doit être utilisée si l'emploi de plusieurs membranes ne constitue pas une solution valable pour remédier à ces interférences.

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

Le milieu *m-Enterococcus* ne doit pas être stérilisé à l'autoclave et doit être rapidement refroidi après ébullition. Un milieu qui a une teinte rosée ou un précipité doit être rejeté.

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 sont respectivement de 20 et 100 UFC en entérocoques. 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 juin 2004. Six techniciens ont analysés chacun 5 réplicats de 1 ml des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} d'un échantillon d'eau usée municipale. Le coefficient de variation (rapport de l'écart type sur la moyenne) a été de 17 % à une concentration moyenne de 547 000 UFC/100 ml (n = 30).

Un autre test de répétabilité intertechniciens a été réalisé dans notre laboratoire en juin 2006 avec de l'eau de rivière à laquelle on a ajouté quelques entérocoques en laboratoire. Six techniciennes ont analysé chacune 5 réplicats de cet échantillon. Le coefficient de variation pour les 30 réplicats a été de 16 % pour un résultat moyen de 305 UFC/100 ml.

3.5. SÉLECTIVITÉ

L'expérience démontre que presque toutes les colonies observées sur le milieu *m-Enterococcus* sont typiques. L'observation des colonies atypiques est très rare et, pour cette raison, la sélectivité de ce milieu de culture tend vers 100 %.

3.6. TAUX DE FAUX POSITIFS ET DE FAUX NÉGATIFS

Lors de la confirmation de 110 colonies dans 18 échantillons d'eaux usées analysés dans notre laboratoire, le taux de colonies classées faussement positives sur le milieu *m-Enterococcus* a été de 43 %. Aucune colonie atypique n'a été confirmée pendant la période étudiée et l'observation

de colonies atypiques est très rare sur ce milieu. Il n'est donc pas possible de déterminer le taux de colonies classées faussement négatives.

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

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

De plus, les contenants utilisés pour le prélèvement des échantillons d'eau probablement chlorée doivent contenir une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dont la concentration finale est d'au moins 100 mg/l dans l'échantillon. Pour obtenir ce résultat, introduire 2,5 ml d'une solution de thiosulfate de sodium à 1 % (1 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ par 100 ml d'eau) dans un contenant de 250 ml avant de le stériliser. Le thiosulfate de sodium agit comme agent neutralisant du chlore résiduel qui pourrait être présent dans l'eau. Il empêche ainsi le chlore d'agir entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse et permet donc d'obtenir une estimation juste du nombre de microorganismes présents dans l'eau au moment du prélèvement.

Une étude réalisée dans nos laboratoires sur les eaux de consommation a permis d'établir que le délai maximal admissible pour l'analyse était de 48 heures après le prélèvement et que l'échantillon 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. Brûleur à gaz
- 5.3. Boîtes de Pétri d'environ 49 mm × 9 mm et 100 mm × 15 mm
- 5.4. Membranes filtrantes stériles quadrillées de porosité de 0,45 µm et de 47 mm de diamètre
- 5.5. Pincettes en acier inoxydable à bouts plats
- 5.6. Pipettes stériles de 10,0 ml et 1,0 ml de type TD
- 5.7. Thermomètres permettant une lecture à 0,5 °C
- 5.8. Tubes à essais de 16 mm × 125 mm avec bouchons

- 5.9. Fil à boucle et fil droit
- 5.10. Stéréoscope
- 5.11. Autoclave
- 5.12. Incubateur dont la température est ajustée à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
- 5.13. Incubateur dont la température est ajustée à $45\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
- 5.14. Lames porte-objet
- 5.15. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.16. Rampe de filtration avec entonnoirs et supports de filtres
- 5.17. pH-mètre
- 5.18. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.19. Réfrigérateur maintenant une température entre 2 et 6 °C
- 5.20. Pompe à vide
- 5.21. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.22. Bouteilles de 150 ml avec bouchons

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. Solution de la coloration de Gram
Solution commerciale.
- 6.4. Phosphate de potassium anhydre, KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)

6.5. Peroxyde d'hydrogène 30 %, H₂O₂ (CAS n° 7722-84-1)

6.6. Chlorure de sodium, NaCl (CAS n° 7647-14-5)

6.7. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

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

6.8. Gélose m-Enterococcus

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 42,0 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Tryptose	20,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Dextrose	2,0 g
Phosphate de potassium dibasique	4,0 g
Azoture de sodium	0,4 g
Agar	10,0 g
Chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium	0,1 g

Dans un erlenmeyer de 1 000 ml, peser 42,0 g du milieu de culture gélose m-*Enterococcus* et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition à l'aide d'une plaque chauffante munie d'un agitateur magnétique (ne pas laisser bouillir). Refroidir rapidement à 45 °C - 50 °C pour éviter que certains composés précipitent. Le milieu m-*Enterococcus* ne doit pas être stérilisé à l'autoclave et doit être rapidement refroidi après ébullition. Répartir aseptiquement en volumes de 4 ml dans des boîtes de Pétri de 49 mm × 9 mm et laisser solidifier. Le pH final doit être de 7,2 ± 0,2 à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (*cf.* 6.2) ou de NaOH 1 N (*cf.* 6.7). Un milieu ayant une teinte rosée ou un précipité doit être rejeté.

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant une durée maximale de trois semaines.

6.9. Gélose infusion cœur-cervelle

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

Formule en grammes par litre d'eau

Infusion de cervelle de veau	200,0 g
Infusion de cœur de bœuf	250,0 g
Protéose peptone	10,0 g

Bacto dextrose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Agar	15,0 g

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

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 52,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète, à feu moyen, en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.2) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7). Répartir environ 8 ml dans des tubes de 16 mm × 125 mm pour former des géloses inclinées. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

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

6.10. Gélose bile esculine

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 64,0 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Extrait de bœuf	3,0 g
Peptone	5,0 g
Esculine	1,0 g
Oxgall	40,0 g
Citrate ferrique	0,5 g
Agar	15,0 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 64,0 g du milieu gélose bile esculine déshydraté et le dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition à l'aide d'une plaque chauffante munie d'un agitateur magnétique. Répartir en volumes de 100 ml dans des bouteilles à bouchon vissant. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de $6,6 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.2) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7).

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant une durée maximale de six à huit semaines.

Au moment de la confirmation, faire fondre la gélose dans un bain d'eau bouillante. Répartir aseptiquement dans des boîtes de Pétri de 100 mm × 15 mm.

6.11. Bouillon infusion cœur-cervele

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 37,0 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
Dextrose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate de disodique	2,5 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 37,0 g du milieu bouillon infusion cœur-cervelle déshydraté et le dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition à l'aide d'une plaque chauffante munie d'un agitateur magnétique. Répartir en volumes de 5 ml dans des tubes de 16 mm × 25 mm avec bouchons. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.2) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7).

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant une durée maximale de quatre à six semaines.

6.12. Bouillon infusion cœur-cervelle avec NaCl 6,5 % (P/V)

Ce milieu sans NaCl est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 37,0 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
Dextrose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate de disodique	2,5 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 37,0 g du milieu bouillon infusion cœur-cervelle déshydraté, ajouter 65 g de NaCl et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition à l'aide d'une plaque chauffante munie d'un agitateur magnétique. Répartir en volumes de 5 ml dans des tubes de 16 mm × 125 mm avec bouchons. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes. Le pH doit être de $7,4 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.2) ou de NaOH 1 N (cf. 6.7).

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant une durée maximale de quatre à six semaines.

6.13. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH_2PO_4 anhydre (cf. 6.4) dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.7) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.14. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.13) 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.

6.15. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.13) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de 90 ml \pm 2 ml après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

6.16. Solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % (V/V)

Diluer 10 ml de H_2O_2 30 % (cf. 6.5) dans environ 60 ml d'eau et compléter à 100 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C pendant une semaine.

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 interruption de travail supérieure à 15 minutes. La stérilisation aux rayons ultraviolets est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau.

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

L'absence d'entérocoques 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 20 ml à 30 ml d'eau de rinçage (cf. 6.14), filtrer sur une membrane stérile et incuber pendant 48 heures \pm 3 heures à 35 °C \pm 0,5 °C sur le milieu m-*Enterococcus*. La fréquence de ce contrôle dépend 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 d'eau ou les échantillons très liquides doivent être homogénéisés en agitant vigoureusement les bouteilles d'un mouvement vertical.

En ce qui concerne les échantillons de sols, de déchets solides, de sédiments ou de boues, 10 grammes d'échantillon sont prélevés et mis en suspension dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (*cf.* 6.15) (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 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 (1 : 10) ou encore 10 ml de la dilution 1 : 10 d'un échantillon solide dans 90 ml d'eau tamponnée (1 : 100);
- bien agiter la bouteille d'eau tamponnée de dilution afin d'homogénéiser son contenu;
- répéter cette même opération jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (1 : 100, 1 : 1 000, 1 : 10 000, etc.);
- changer de pipette entre chaque dilution.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- Placer les entonnoirs et les supports dans le stérilisateur à rayons ultraviolets pendant 2 minutes.
- Mettre les supports et les entonnoirs sur la rampe de filtration.
- Mettre en fonction l'appareil à vide.
- Prendre une membrane filtrante stérile près du bord à l'aide d'une pincette stérilisée par flambage à l'alcool et la déposer ensuite sur le support de filtre.
- Placer l'entonnoir sur le support et le fixer fermement.
- Verser dans l'entonnoir les volumes requis, selon la nature de l'échantillon analysé (voir le tableau qui suit). Pour les volumes de 10 ml ou moins, introduire de 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (*cf.* 6.14) dans l'entonnoir de filtration. Ensuite, prélever à l'aide d'une pipette stérile le volume désiré. Laisser couler l'échantillon en appuyant le bout de la pipette sur l'épaulement interne de l'entonnoir. Enlever la dernière goutte de la pipette à l'aide de la poire.

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

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

- Faire le vide pour filtrer l'échantillon
- Rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 ml à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile (utiliser un flacon laveur). Rincer davantage s'il y a possibilité de forte contamination.
- Retirer l'entonnoir et déposer la membrane filtrante à l'aide d'une pince stérile sur une gélose m-*Enterococcus* (cf. 6.8).

NOTE - Déposer la membrane en la déroulant pour obtenir un contact étroit avec la gélose. La présence de bulles d'air est signalée par des taches blanches.

- Inscrire sur la boîte de Pétri le numéro de l'échantillon et le volume filtré.
- Placer les boîtes de Pétri en position inversée dans un incubateur 35 °C ± 0,5 °C pendant 48 heures ± 3 heures le plus tôt possible après la filtration. 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. L'observation des membranes s'effectue le plus tôt possible après leur sortie de l'incubateur.
- Choisir les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 100 colonies typiques et au maximum 200 colonies de toutes sortes. Les caractéristiques typiques des colonies entérocoques sur gélose de type m-*Enterococcus* sont les suivantes :
 - a) aspect rouge sur toute la surface de la colonie;
 - b) aspect rose sur toute la surface de la colonie;
 - c) aspect rouge au centre et auréolé de rose;
 - d) dimensions variant de 0,5 mm à 3 mm.

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

7.4. CONFIRMATION

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

Le degré de certitude avec lequel l'analyste doit préciser l'identification de la bactérie isolée détermine l'ampleur que prendra la confirmation. Elle peut être sommaire, indiquant l'appartenance ou non au groupe des entérocoques avec les épreuves combinées de la catalase, de la croissance en bouillon BHI à 45 °C, de la croissance en bouillon BHI avec NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C et de l'hydrolyse de la bile esculine. Une identification plus complète à l'espèce est réalisable à l'aide de systèmes d'identification biochimique que l'on peut se procurer dans le commerce (système API Rapid Strep[®], système MicroScan[®], etc.). Toutefois, ces systèmes ne sont pas en mesure d'identifier toutes les espèces d'entérocoques ni de déterminer s'ils sont d'origine fécale.

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

NOTE – Les tests de confirmation des entérocoques doivent être faits avec précaution. Les milieux de confirmation doivent être inoculés avec des cultures jeunes, vigoureuses et en croissance (Mundt, 1986).

7.4.1. Propagation des souches suspectes

Prélever une colonie bien isolée sur la gélose m-*Enterococcus* et effectuer une propagation de la colonie par étalement sur gélose inclinée infusion cœur-cerveille (cf. 6.9). Incuber les géloses infusion cœur-cerveille à 35,0 °C ± 0,5 °C pendant 18 à 24 heures.

7.4.2. Épreuve de la catalase

À partir de la croissance présente sur la gélose de propagation, prélever aseptiquement un faible inoculum à l'aide d'un bâtonnet de bois ou d'un fil à boucle et l'étendre sur une lame de verre propre. Ajouter 1 ou 2 gouttes d'une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 % (V/V) (cf. 6.16). L'apparition d'effervescence est causée par la décomposition du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en

eau et en oxygène et elle démontre la présence de l'enzyme catalase. Une réaction négative à l'épreuve de la catalase indique la présence possible d'entérocoques.

7.4.3. Préparation d'un inoculum en bouillon infusion cœur-cervelle

Inoculer un tube de bouillon infusion cœur-cervelle (cf. 6.11) à partir de la croissance présente sur la gélose de propagation (cf. 7.4.1). Incuber à $35,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pendant 24 heures.

Les épreuves de l'hydrolyse de la bile esculine, de la croissance en bouillon infusion cœur-cervelle à 45 °C et de la croissance en bouillon infusion cœur-cervelle avec NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C doivent être inoculées avec une culture fraîche.

7.4.4. Épreuve de l'hydrolyse de la bile esculine

À partir du bouillon infusion cœur-cervelle de 24 h (cf. 7.4.3), prélever un inoculum de manière aseptique à l'aide d'un fil à boucle. Procéder à l'étalement sur une gélose bile esculine (cf. 6.10) et incuber à $35,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pendant 18 à 24 heures. Une coloration brune ou noire des colonies ou de leurs zones périphériques indique l'hydrolyse de la bile esculine et démontre la présence possible d'entérocoques.

7.4.5. Épreuve de croissance en bouillon infusion cœur-cervelle à 45 °C

À partir du bouillon infusion cœur-cervelle de 24 h (cf. 7.4.3), prélever un inoculum de manière aseptique à l'aide d'un fil à boucle. Inoculer 5 ml d'un bouillon infusion cœur-cervelle (cf. 6.11). Incuber à $45,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pour une durée de 48 heures ± 3 heures. Une augmentation notable de la turbidité indique qu'il y a croissance et démontre la présence possible d'entérocoques.

7.4.6. Épreuve de croissance en bouillon infusion cœur-cervelle avec NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C

À partir du bouillon infusion cœur-cervelle de 24 h (cf. 7.4.3), prélever un inoculum de manière aseptique à l'aide d'un fil à boucle. Inoculer 5 ml d'un bouillon infusion cœur-cervelle avec NaCl 6,5 % (P/V) (cf. 6.12). Incuber à $35,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pour une durée de 48 heures ± 3 heures. Une augmentation notable de la turbidité indique qu'il y a croissance et démontre la présence possible d'entérocoques.

7.4.7. Interprétation des tests de confirmation (7.4.2 à 7.4.6)

Une colonie est confirmée entérocoque si elle répond aux quatre critères suivants :

- 1) l'épreuve de la catalase est négative;
- 2) l'épreuve de l'hydrolyse de la bile esculine est positive (preuve de l'appartenance au groupe D de Lancefield);
- 3) l'épreuve de croissance en bouillon infusion cœur-cervelle à 45 °C est positive;

- 4) l'épreuve de croissance en bouillon infusion cœur-cerveille avec NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C est positive.

Une colonie est confirmée Streptocoque du groupe D de Lancefield si elle répond aux trois premiers critères des enterocoques cités précédemment, mais qu'elle produit une réaction négative à l'épreuve de croissance en bouillon infusion cœur-cerveille avec NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C. *S. bovis* et *S. equinus* répondent à ces critères. Une coloration de Gram est nécessaire pour les colonies répondant aux quatre critères suivants :

- 1) l'épreuve de la catalase est négative;
- 2) l'épreuve de l'hydrolyse de la bile esculine est positive;
- 3) l'épreuve de croissance en bouillon infusion cœur-cerveille à 45 °C est négative;
- 4) l'épreuve de croissance en bouillon infusion cœur-cerveille avec NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C est négative.

7.4.8. Coloration de Gram

NOTE - Suivre les instructions du fabricant pour effectuer la coloration de Gram. Ce test n'est pas utilisé de façon routinière au laboratoire.

Effectuer l'observation microscopique à un grossissement de 1 000 X à l'aide d'huile à immersion.

7.4.9. Galerie d'identification biochimique

La confirmation se complète en utilisant une galerie biochimique lorsque la présence de coques Gram positif disposées en forme de chaînettes est observée. Puisque cette étape ne permet pas d'identifier un entérocoque, elle n'est pas effectuée de façon routinière, à moins qu'elle fasse l'objet d'une demande spéciale du client.

Certaines souches de *E. avium* font partie du groupe D de Lancefield mais possèdent des antigènes du groupe Q, qui empêchent ou ralentissent la croissance en bouillon à 45 °C et en bouillon salin à 35 °C. Si la nature de l'échantillon (proximité de poulaillers, d'élevages de poules, etc.) permet de soupçonner la présence de cette espèce, l'utilisation d'une galerie d'identification biochimique est recommandée.

7.4.10. Pourcentage de confirmation

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

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

8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

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

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 :

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

Dans le cas où une confirmation est effectuée, il faut appliquer le pourcentage de confirmation (cf. 7.4.10) 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 le nombre de colonies acceptables, de préférence à l'intérieur des limites de quantification, et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 g d'échantillon humide ou UFC par g d'échantillon humide, selon les équations générales suivantes :

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

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

Le poids d'échantillon analysé correspond à la relation suivante :

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

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

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

Dans le cas où une confirmation est effectuée, il faut appliquer le pourcentage de confirmation (cf. 7.4.10) au résultat précédent :

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

8.3. DÉNOMBREMENT À L'INTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

Calculer le résultat en ne retenant que les membranes sur lesquelles il y a de 20 à 100 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 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) :

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

8.4. DÉNOMBREMENT À L'EXTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

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

Additionner toutes les colonies sur l'ensemble des membranes, tout en tenant compte des volumes de l'échantillon ensemencé, 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 volume d'échantillon filtré le plus grand.

Exemples :

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

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

Transmettre ce résultat comme étant :

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

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

Calculer le résultat à l'aide de la limite de quantification et du plus 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 tous au-delà de la limite supérieure de quantification. Estimer le résultat à l'aide de la limite de quantification (100 pour les entérocoques) 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 d'entérocoques ou de tout autre microorganisme.

La température de l'incubateur doit être maintenue à 35 °C ± 0,5 °C pendant toute la durée de l'incubation.

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

10. BIBLIOGRAPHIE

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

KNUDTSON, Linda M. and Paul A. HARTMAN, Routine Procedures for Isolation and Identification of Enterococci and Fecal Streptococci, *Applied and Environmental Microbiology*, 58 (9): 3027-3031, 1992.

MUNDT, J.O. *Enterococci* in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2, 1st Edition, William and Wilkins, 1986, p. 1063-1065.

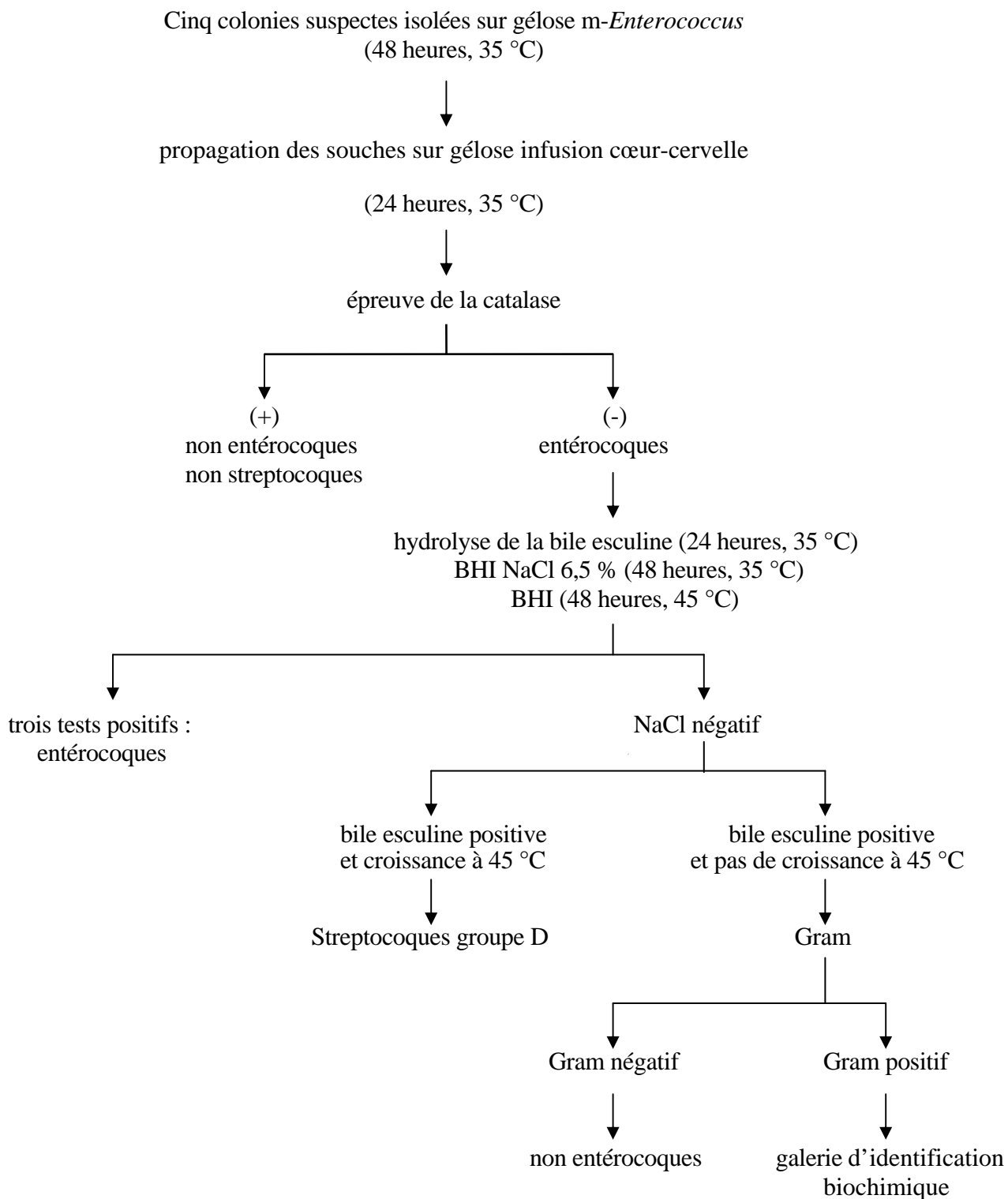


Figure 1 – Schéma du protocole de confirmation des colonies d'entérocoques