

51922

①

ROYAUME DU MAROC
OFFICE NATIONAL DE L' EAU POTABLE



المملكة المغربية
المكتب الوطني للماء الصالح للشرب

**MANUEL PRATIQUE DE METHODES D'ANALYSES
BACTERIOLOGIQUES UTILISEES DANS LE
PROJET 3-P-85-0183 RELATIF A LA QUALITE DES EAUX**

Décembre 1989

**ARCHIV
51922**

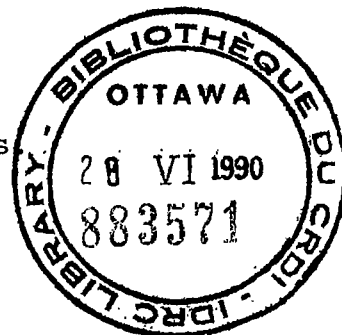
S O M M A I R E

51922
FINAL REPORT

FILE NO: 3-P-85-0183

IDRC-Lib

- I - INTRODUCTION
- II - MATERIELS ET METHODES
 - 1 - EQUIPEMENT DE LABORATOIRE DE BACTERIOLOGIE.
 - 2 - RECHERCHE DES COLIFORMES TOTAUX ET COLIFORMES FECAUX
 - 2 - 1 Milieux de culture et réactifs
 - 2 - 2 Méthodologie.
 - 2 - 2.1 Méthode par membrane filtrante
 - 2 - 2 - 1.1 Test présomptif
 - 2 - 2 - 1.2 Test confirmatif
 - 2 - 2 - 1.3 Identification
 - 2 - 2 - 1.4 Expression des resultats
 - 2 - 2.2 Methode par fermentation en tubes multiples (Methode MPN)
 - 2 - 2 - 2.1 Test présomptif
 - 2 - 2 - 2.2 Test confirmatif
 - 2 - 2 - 2.3 Expression de resultats
 - 2 - 2 - 2.4 Identification.
 - 2 - 2.3 Test presence- absence (P/A)
 - 3 - RECHERCHE DES STREPTOCOQUES FECAUX
 - 3 - 1 Milieux de cultures et réactifs
 - 3 - 2 Méthodologie.
 - 4 - METHODES D'ANALYSES DES COLIPHAGES
 - 4 - 1 Méthode classique.
 - 4 - 1.1 souches standards et milieux de culture.
 - 4 - 1.2 Mode operatoire
 - a) Préparation de l'hôte
 - b) Determination de coliphage
 - 4 - 2 Méthode par Membrane filtrante zeta plus 60 S
 - 4 - 2.1 Milieux de cultures et réactifs
 - 4 - 2.2 Préparation de l'hôte
 - 4 - 2.3 Mode operatoires.



ARCHIV

663.6 (64)

M 3

III - CONCLUSION

References Bibliographiques

IV - ANNEXES.

ANNEXES 1 : Milieux et réactifs pour les
recherches des coliformes
Totaux et fécaux

ANNEXES 2 : Milieux et réactifs pour la recherche
des streptocoques fécaux

ANNEXES 3 : Milieux pour la recherche des
coliphages

ANNEXES 4 : Milieux, réactifs et mode opératoire
pour la coloration de Gram.

ANNEXES 5 : Milieux et description du test IMVIC

BIBLIOGRAPHIE.

Introduction :

Les analyses bactériologiques de l'eau ont pour but de mettre en évidence la présence de bactéries qui modifient l'aptitude d'une eau à une utilisation donnée. Ainsi la recherche de bactéries pathogènes, des bactéries d'origine fécale, et l'étude de la protection contre les bactéries exogènes par la variation de la population bactérienne globale d'une eau sont les 3 grandes lignes des analyses bactériologiques des eaux. La présence de bactériophages fécaux dans une eau également considérée comme la preuve de sa contamination par des bactéries fécales.

L'examen bactériologique ne peut être valablement interprété que s'il est effectué sur un échantillon correctement prélevé dans un récipient stérilisé, selon un mode opératoire précis évitant toute contamination accidentelle, correctement transporté au laboratoire et analysé sans délai.

Un projet de recherche de techniques simples d'évaluation de la qualité bactériologique des eaux a été proposé par le Laboratoire Central de Contrôle de Qualité des Eaux de l'Office National de l'Eau Potable (O.N.E.P) au Centre Canadien de Recherche pour le Développement International (C.R.D.I). Ce thème concerne, l'évaluation, et la détermination des coliphages et du test présence-absence (P/A) en tant que tests rapides et économiques pour le contrôle de la qualité des eaux d'alimentation humaine et pour la classification sanitaires des ressources en eaux destinées à la production d'eau potable.

Pour la réalisation de ce travail nous avons effectué des séries de prélèvements des eaux différentes (eaux brutes et traitées) dans différents points du Maroc dont l'analyse bactériologique a été réalisée au niveau des laboratoires de l'ONEP.

Pour ce fait un manuel pratique de laboratoire a été établi afin que toutes les méthodes d'analyses soient pratiquées de la même manière, avec utilisation des mêmes milieux de culture et les mêmes réactifs.

MATERIELS ET METHODES

1 - Equipement de laboratoire de bactériologie

Les analyses bactériologiques sont effectuées dans le laboratoire central disposant de l'équipement suivant :

- Matériel de stérilisation Autoclave et Four à air chaud. (Etuve poupinel).
- Incubateur à 22°C, 37°C, et 44°C
- Bain marie.
- PH mètre.
- Balance.
- Refrigerateur, avec température comprise entre 0°C et 4°C
- Microscope binoculaire avec ses accessoires.
- Entonnoir de filtration en polycarbonate, en cuivre en acier inoxydable ou similaires.
- Pompe à vide.
- Bruleur à gaz.
- Anse d'ensemencement et support.
- Membrane filtrante en acetate de cellulose. ou similaire de diametre 47 mm et de Poresite 0,45 um.
- Spectrophotomètre à gamme spectrale contenant la longueur d'onde 520 nm
- Papier filtre whatman N° 1 ou équivalent
- Boîtes de petris stériles de diamètre 55 - 60 mm et 90 - 100 mm.
- tube à essai à visse.
- flacons stériles pour échantillonnage d'eau
- Membrane zeta 60S.
- Portes tubes à essais
- Erlenmeyer
- Pipettes graduées stériles
- tubes à essai steriles 220 x 22 mm et 160 x 16 mm (ou 180 x 18 mm)
- tubes à culture contenant des cloches à gaz (6 x 50 mm).

2 - Recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux. (cf fig A et B)

Les coliformes totaux sont des organismes en forme de bâtonnets, non sporogènes, Gram-négatif, oxydase négative, capables de croître en aérobiose à 37°C sur un milieu lactosé.

Les coliformes fécaux présentent les mêmes propriétés que les précédents à 44 °C.

2 - 1 Milieux de culture et reactifs (cf Annexe N° 1)

Les milieux dishydratés qu'on trouve dans le commerce simplifient la préparation des bouillons de culture et sont donc recommandés pour les travaux de laboratoire. Divers fabricants préparent ces milieux sous formes de poudre qu'il est facile de peser, de dissoudre dans de l'eau distillée et de repartir dans les tubes de culture avant la stérilisation. Pour l'épreuve de présomption, on dispose de milieux de culture comme, le laurylSulfate de Sodium, le milieu, both, la gelose lactosée au T.T.C, le milieu ENDO et mFc, le MTSA et P/A Broth. Pour l'épreuve de confirmation, on dispose du bouillon biliaire lactosé au vert brillant (BGB) pour les coliformes totaux, et EC medium pour les coliformes fécaux avec Mac Conkey agar N°1 pour l'isolement.

2 - 2 Méthodologie :

2 - 2.1 Méthode par membrane filtrante (cf shéma 1 (1 Bis))

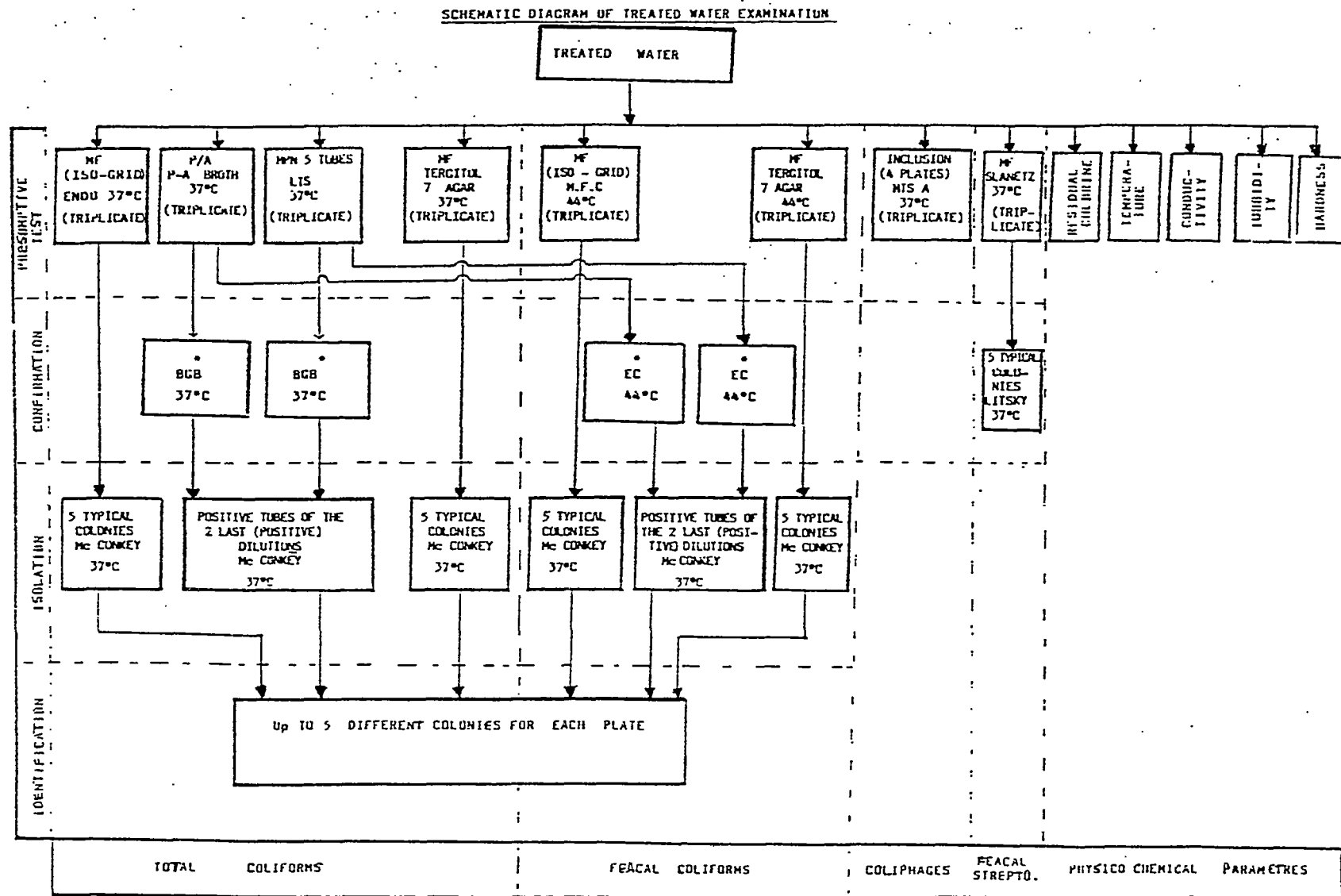
Cette méthode consiste à filtrer un volume connu d'eau à travers une membrane constituée d'un dérivé cellulosique ayant des pores uniformes de 0,45 u de diamètre. Les bactéries sont arrêtées à la surface de la membrane.

Etant donné que la zone filtrante est relativement peu étendue, elle ne peut entretenir la croissance que d'un nombre limité de colonies. Le nombre optimal est situé entre 20 et 80, le maximum peut atteindre 200. Le choix du volume d'échantillon à filtrer dépend de la nature de l'eau. (Voir Tableau 1)

2 - 2 - 1.1 Test présomptif (cf fig 1)

Dans cette technique nous avons utilisé d'une part le gélose lactosée au TTC à 37°C et le milieu type Endo à 37°C pour la numération des coliformes totaux, et d'autre part, la gélose lactosée au TTC à 44°C et le milieu mFc à 44°C pour la numération des coliformes fécaux. Tous ces milieux ont pour principe la fermentation du lactose qui permet de déceler les coliformes presumes, mais la réaction caractéristique varie selon le milieu. Le reflet métallique caractéristique des colonies qui poussent sur milieux de type Endo s'explique par la formation d'aldéhyde.

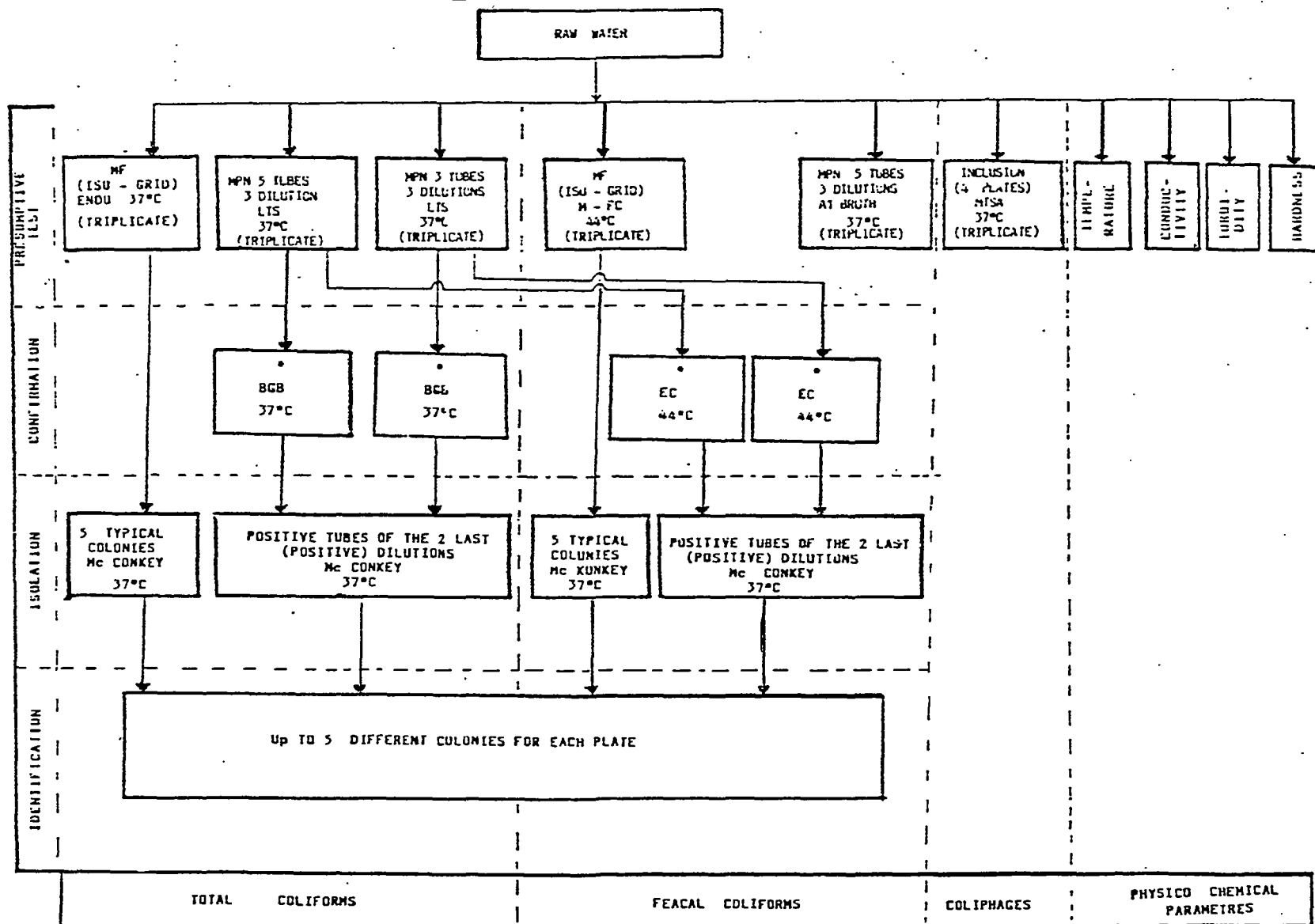
Fig N°A



• POSITIVE TUBES OF THE SAMPLE CORRESPONDING TO THE MEDIAN VALUE (POSITIVE TUBES OF THE POSITIVE SAMPLE WHEN ALONE).

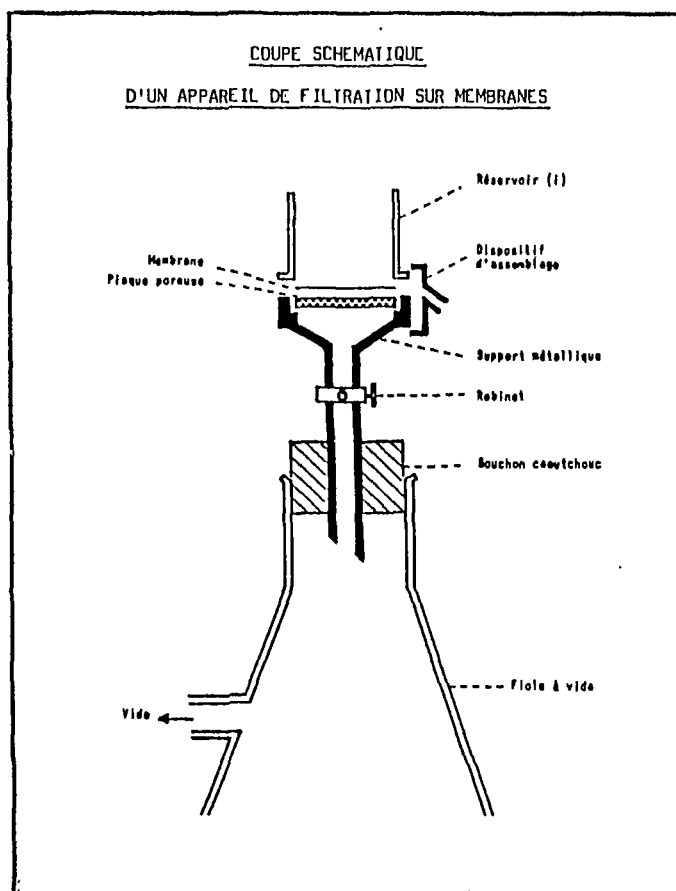
Fig No B

SCHEMATIC DIAGRAM OF RAW WATER EXAMINATION



* POSITIVE TUBES OF THE SAMPLE CORRESPONDING TO THE MEDIAN VALUE (POSITIVE TUBES OF THE POSITIVE SAMPLE WHEN ALONE).

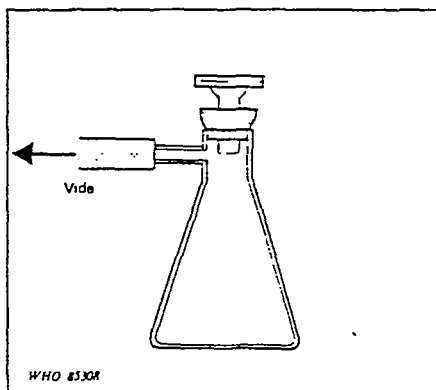
Schéma 1



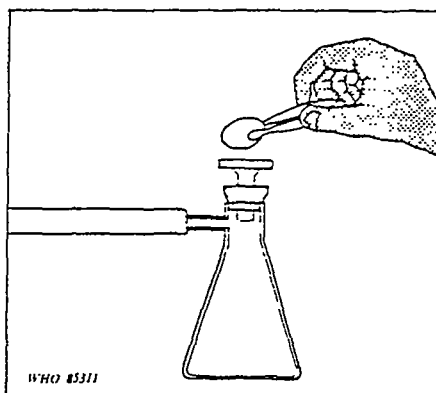
(Extrait du document F 286/5)

Schéma 1 Bis

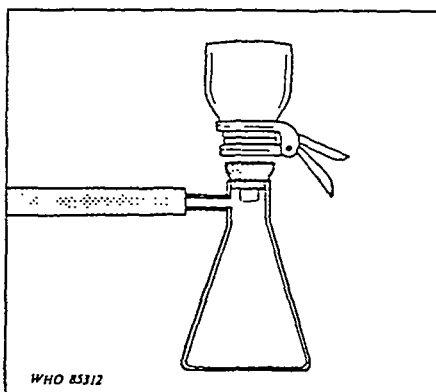
① Brancher l'erlenmeyer (à tubulure latérale) sur le vide (à l'arrêt) et mettre en place le support poreux.



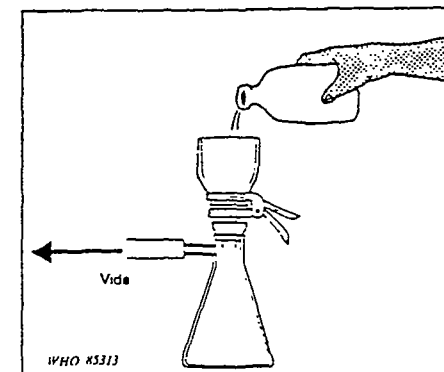
② Monter l'appareil de filtration en plaçant une membrane filtrante stérile sur le support poreux, à l'aide d'une pince stérilisée à la flamme.



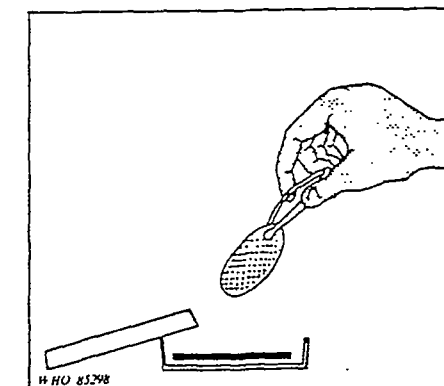
③ Mettre en place le récipient supérieur et le fixer au moyen du dispositif de verrouillage. (La nature de ce dispositif dépend du matériel employé).



④ Verser dans le récipient supérieur le volume d'échantillon choisi comme optimal compte tenu de la nature de l'eau. Si la prise d'essai est inférieure à 10 ml, ajouter dans le récipient supérieur au moins 20 ml d'eau stérile comme diluant, avant filtration.



⑤ Débrancher l'entonnoir et placer le filtre, en utilisant les pinces stériles, sur la plaque de gelose.



⑥ Incuber à 35 ou 37°C pendant 18-24 heures en atmosphère saturée d'humidité (pour cela, mettre dans l'incubateur un morceau d'ouate imbibé d'eau).

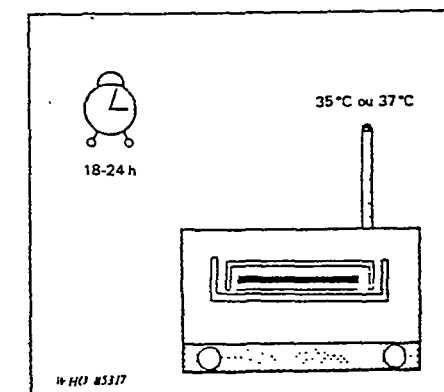
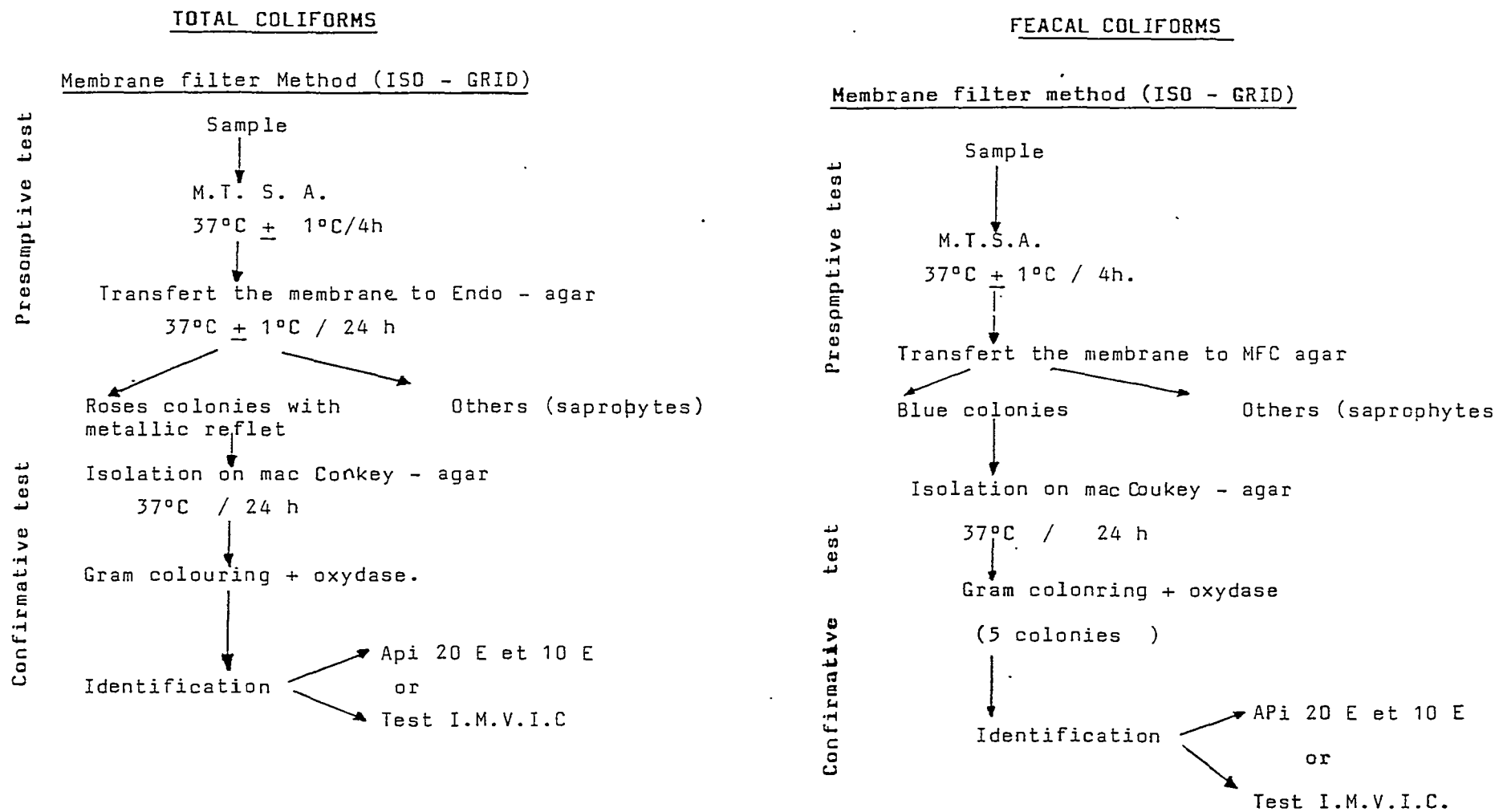


fig 1

RECAPITULATORY DIAGRAM



Une première lecture des boîtes de petri contenant les milieux correspondant au test presomptif est effectuée après 24 heures d'incubation. la fermentation du lactose provoque la formation d'un halo-jaune dans la couche de gélose sous-jacente à la membrane. De manière générale les colonies jaunes ou jaunes orangés avec holo-jaune sont présumées "Coliforme". Sur le milieu Endo, Les colonies de coliformes totaux sont de couleur rose à rouge et présentent un reflet jaune verdâtre ou métallique, il ne faut pas compter les autres types de colonies. Sur le milieu mfc les colonies de coliformes fécaux sont de couleur bleues, contrairement aux colonies de coliformes non fécaux qui sont gris ou crème.

Cette étape de présomption est poursuivie par un essai confirmatif pour vérifier l'appartenance au groupe coliforme (cf Tableau 1) et par une identification d'un coliforme (cf Tableau 2).

2-2 - 1.2 Test confirmatif (cf fig 1)

Les colonies coliformes présumées sur le milieu au tergitol 7 sont confirmées par l'absence d'oxydase et éventuellement par la fermentation du lactose dans les milieu kligler à 37°C et par la coloration de gram (-)

L'étude des caractères morphologiques et biochimiques des colonies isolées ne peut être significative que si l'on réalise les tests sur des cultures pures obtenues après isolement, si nécessaire sur gélose nutritive.

a) Test de l'oxydase

Repiquer une ou plusieurs colonies caractéristiques isolées soit directement sur tergitol 7, soit sur gélose EMB ou sur gélose nutritive et incubé à 37°C pendant 24 H. Emulsionner les colonies développées dans un peu de diluant stérile et déposer à l'aide, d'un enseigneur l'émulsion sur un papier filtre imprégné de 2 à 3 gouttes d'une solution aqueuse à 1 % de chlorydrate de tetramethylpara-phenylenediamine préparé extemporanément. En présence d'une oxydase, une coloration violet brun survenant immédiatement, dans le cas contraire la coloration reste inchangée.

b) Coloration de Gram (cf ANNEXE 4)

c) Recherche de la Catalase

- eau oxygénée à 30 volumes
- solution aqueuse de tween 80 à 10 %

Les deux réactifs sont mélangés à parties égales au moment de l'emploi. 1 ml du mélange est versé à la surface de la culture. dans le tube maintenu en position inclinée de façon à recouvrir toutes les colonies. Après 5 min de contact le dégagement d'oxygène se traduit par l'apparition d'une mousse + abondante.

TABLEAU 1

CHARACTERS OF THE COLIFORM BACTERIA

Test	<i>Esche- richia</i>	<i>Citro- bacter</i>	<i>Kleb- siella</i>	<i>Enterobacter</i>			
				<i>clo- acae</i>	<i>aero- genes</i>	<i>hafniae</i>	<i>lique- faciens</i>
Mannitol	A	A	A	A	A	A	A
Adonitol	O	O	A	A	A	A	A
Dulcitol	d	d	d	O	O	O	O
Inositol (gas)	O	O	O	O	+	O	+
Sucrose	d	d	A	A	A	A	A
Indole	+	O	O	O	O	O	O
Gelatin	O	O	O	(+)	X	O	X
H ₂ S	O	+	O	O	O	O	O
NH ₄ -citrate	O	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	O	O	+	+	+	+	d
Methyl red	+	+	O	O	O	O	d
Urease	O	O or X	+	O	O	O	O
Malonate	O	O	+	+	+	+	O
KCN	O	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine	O	O	O	O	O	O	O
Motility	+	+	O	+	+	+	+
Lysine decarboxylase	+	O	+	O	+	+	(+)
Arginine dihydrolase	d	+	O	+	O	O	O
Ornithine decarboxylase	d	+	O	+	+	+	+

A = acid, gas may or may not be produced.
d = differing strains, some with positive and some with negative reaction.
+ = positive within 2 days. (+) = delayed positive.
X = late irregular positive.
O = negative reaction of test.

(Extrait du document F 4232/3)

TABLEAU 2

INTERPRETATION OF IMViC REACTIONS

Organism	Indole	Methyl Red	Voges Proskauer	Citrate
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-	-
<i>Shigella</i> sp	+ or -	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	-	+	-	+
<i>Citrobacter diversus</i>	+	+	-	+
<i>Klebsiella-Enterobacter</i> group*	+ or -	-	+	+

* See HOMoC series (Section 911C) for further separation of this group.

(Extrait du document F 534/5)

l'absence des bulles est caractéristique des souches à catalase négative

On peut procéder aussi par étalement sur une lame porte objet d'une suspension bactérienne prélevée d'un milieu solide, gélose nutritive à laquelle on ajoute de l'eau oxygénée, la réaction positive se traduit par l'apparition d'une mousse d'où dégagement d'oxygène.

d) Fermentation du lactose (Milieu kligler)

On ensemence le culot par piqûre et la surface inclinée par stries serées et parallèles pour avoir une culture en nappe, l'incubation est faite à 37°C.

Ce milieu donne 3 réponses en 24 heures maximum.

- 1 - Le culot inchangé, le glucose n'est pas fermenté, s'il y a produit de gaz, on peut avoir soit seulement quelques bulles, soit une poche gazeuse qui décolle complètement le milieu du fond du tube.
- 2 - Si la surface inclinée reste inchangée, le lactose n'est pas fermenté, la couleur vire au jaune dans le cas contraire.
- 3 - La production de H₂S se traduit par un noircissement du milieu dans la zone joignant le culot à la pente.

2 - 2 - 1.3 Identification (cf annexe 5)

L'identification des germes coliformes est réalisée soit à l'aide de galerie API (API 10E, API 20E), soit par le test I.M.V.I.C.

I : production d'indole (dans le tube d'eau peptonée).

M : réaction de rouge de méthyle.

V : réaction de Voges Proskauer (recherche de l'acétone) produit de métabolisme bactérien).

C : citrate de sodium ou citrate de Simmons.

l'interprétation de ce test IMVIC est donnée dans le tableau 2.

2 - 2 - 1.4 Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par la formule suivante :

coliforme totaux

ou

coliformes fecaux./ 100 ml = $A/B \times 100/F$.

A = Nombre total de colonies coliformes caractéristiques (confirmées et identiques) comptées sur toutes les membranes.

B = La somme des quantité filtré exprimée en (ml).

F = Facteur de dilution.

2 - 2.2 Méthodes par fermentation en tubes multiples (Méthodes MPN.)

Le principe de la méthodes MPN consiste à incuber un certain nombre de tubes contenant, comme milieu de culture un bouillon approprié à concentration normale et à double concentration. Au bout d'une durée d'incubation précise à une température donnée on considère comme tube positif chaque tube où il y a un développement bacterien (trouble) et un dégagement de gaz, Ce phénomène peut traduire la présence de coliforme. (Cf fig 2).

2 - 2 - 2.1 Test présomptif

Au moyen d'une pipette stérile de 10 ml, on inocule 10 ml d'échantillon dans chacun des 5 tubes contenant (10 ml) de bouillon au lauryl sulfate de sodium à double concentration, ensuite on répartit 1 ml d'échantillon dans 5 tubes de milieu simple et 1 ml de la dilution d'échantillon au 1/10 dans les 5 autres tubes de milieu simple. L'ensemble est incubé à 37°C pendant 48 heures parallèlement à cette série dans 5 tubes, une série de 3 tubes est inoculée de la même manière que précédement (cf schéma 2)

2 - 2 - 2.2 Test confirmatif (cf fig3)

L'épreuve de confirmation consiste à repiquer les tubes positifs dans un milieu de culture plus sélectif milieu lactosé bilié au vert brillant (BGB) à 37°C/ 48 heures pour les coliformes totaux et milieu EC médium à 44°C pendant 24 heures pour les coliformes fecaux. Les tubes positifs sont caractérisés par la production de gaz.

2 - 2 - 2.3 Expression des résultats :

La concentration des bactéries dans l'échantillon peut alors être estimée d'après le nombre de tubes inoculés et le nombre de tubes positifs obtenus à l'aide de l'épreuve de confirmation. Le nombre le plus probable (MPN) de bacteries présentes peut être estimé en utilisant des tableaux statistiques spéciales. Cette technique est identifiée sous le nom de méthode MPN (Cf Tableau 3).

2 - 2 - 2.4 Identification :

Les tubes positifs des deux dilutions les plus grandes (5,5,5,4). du test confirmatif sont isolés sur Mac Coukey Agar n° 1 et sur chaque isolement au moins cinq colonies différentes fermentant le lactose sont à identifier soit par le test IMVIC soit par la galerie API (Voir ci-dessus).

Fig.2 Schéma indiquant la marche à suivre dans les épreuves de présomption ou de confirmation selon la méthode des tubes multiples

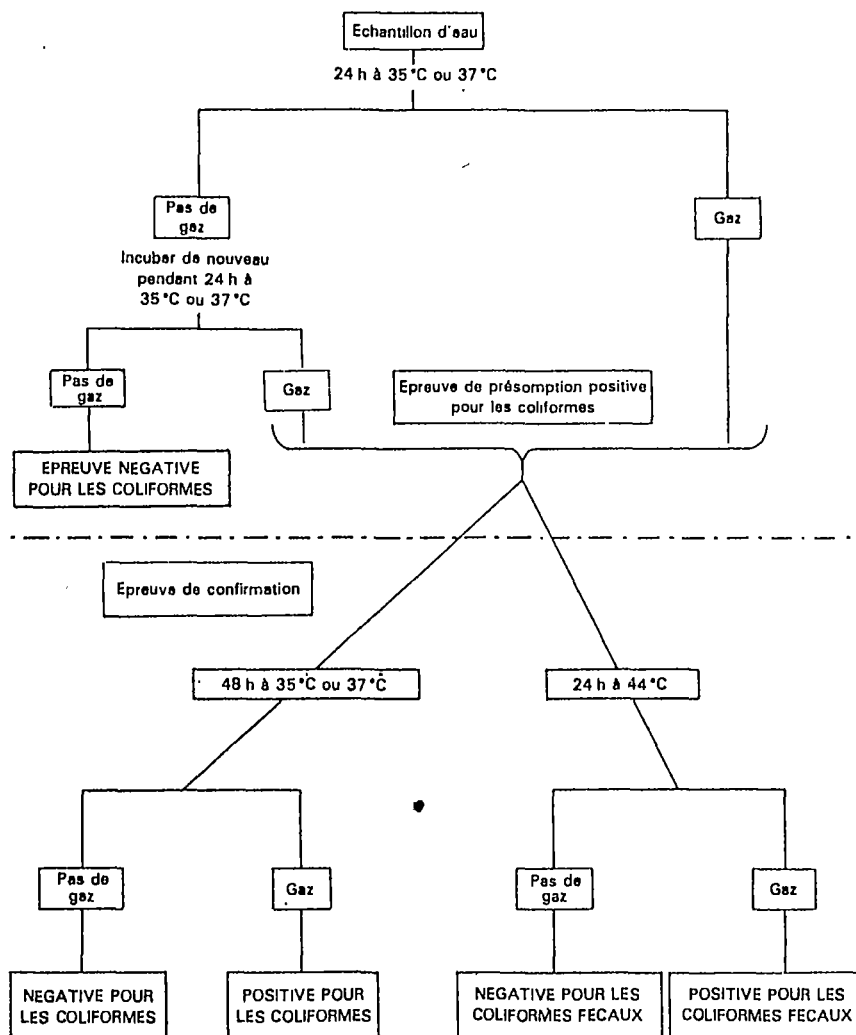
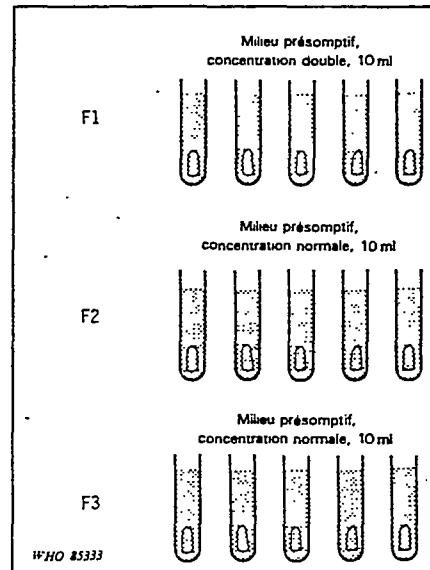
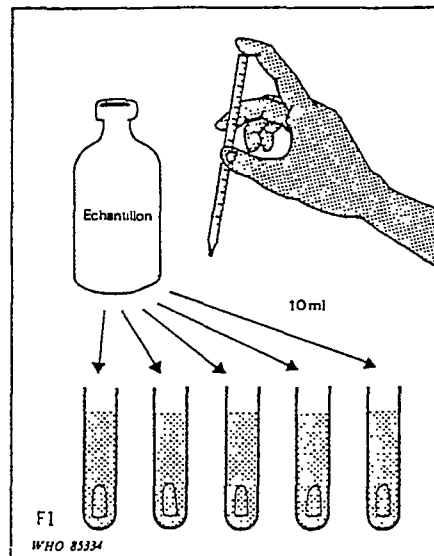


Schéma 2

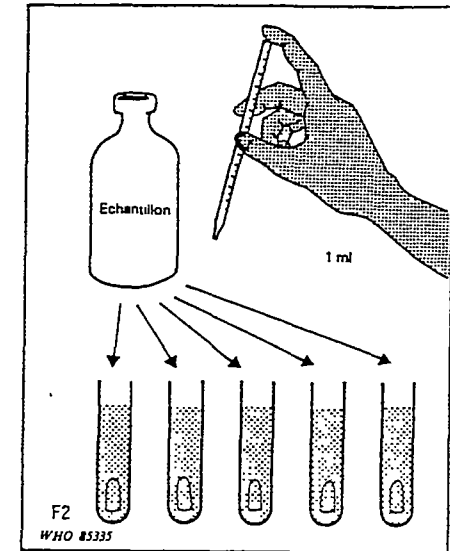
A. Disposer trois rangées de cinq tubes chacune dans un porte-tubes à essais. Les tubes de la première rangée (F1) contiennent 10 ml de milieu pour épreuve de présomption à concentration double tandis que les tubes de la deuxième et de la troisième rangée (F2, F3) contiennent 10 ml de milieu pour épreuve de présomption à concentration normale.



B. Avec une pipette stérile, ajouter 10 ml d'échantillon dans chacun des cinq tubes de la rangée F1.



C. Avec une pipette stérile, ajouter 1 ml d'échantillon dans chacun des cinq tubes de la rangée F2.



Δ Au moyen d'une autre pipette stérile, verser 1 ml de la dilution au 1/10 dans chacun des cinq tubes de la rangée F3.

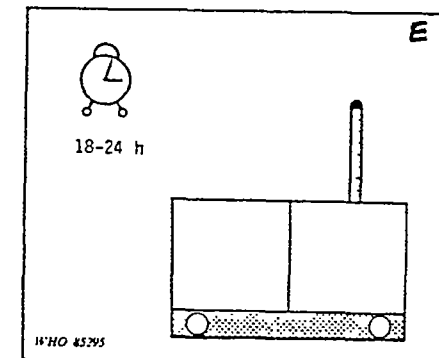
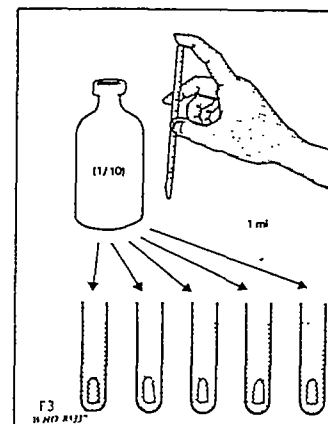
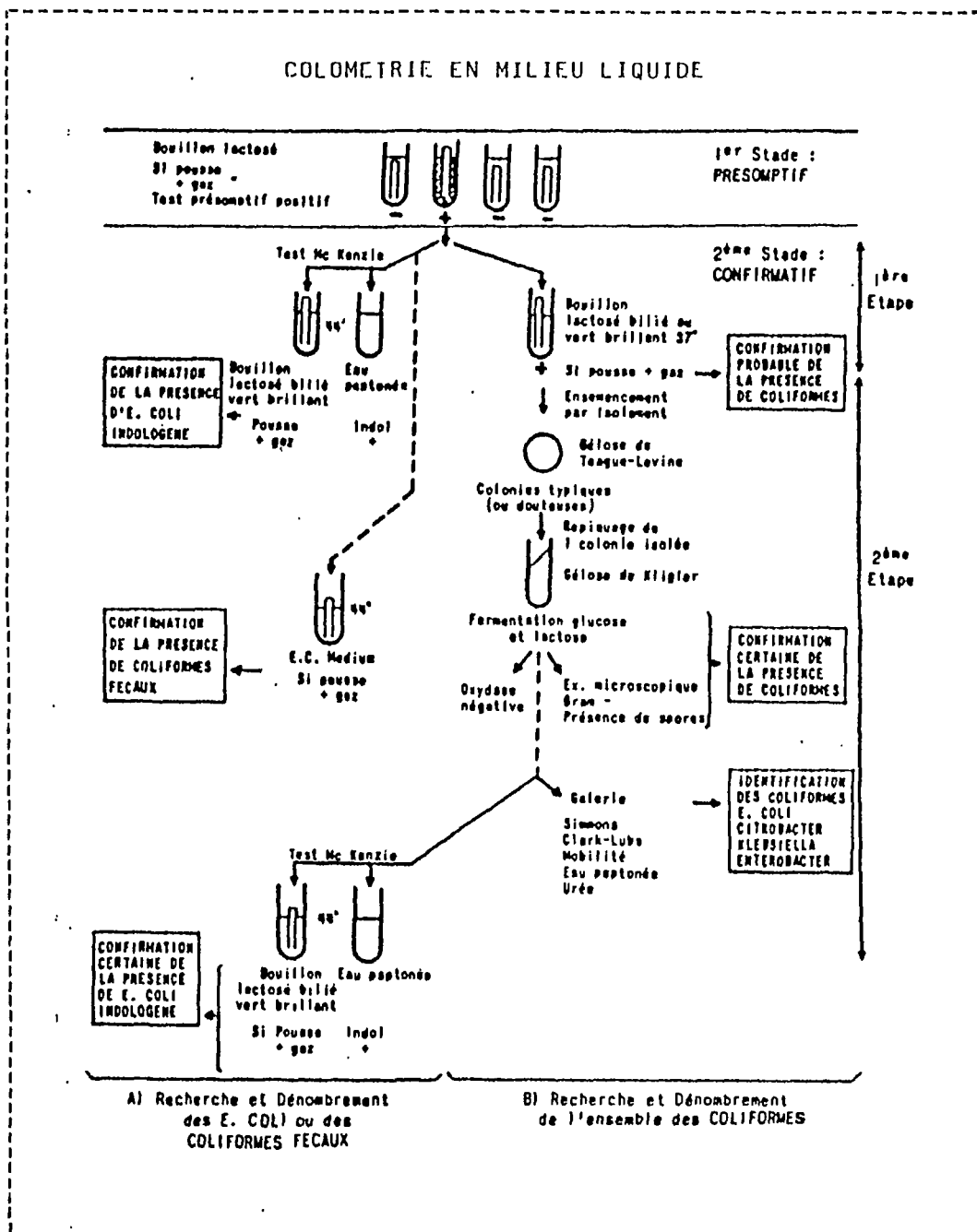


FIGURE -3-



(Extrait du document F 286/5)

NOMBRE LE PLUS PROBABLE ET INTERVALLE DE CONFIANCE
DANS LE CAS DU SYSTÈME D'ENSEMENCEMENT N° 1

Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			N.P.P. dans 100 ml	Limites de confiance à 95 %	
3 tubes de 10 ml	3 tubes de 1 ml	3 tubes de 0,1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	3	< 0,5	9
0	1	0	3	< 0,5	13
1	0	0	4	< 0,5	20
1	0	1	7	1	21
1	1	0	7	1	23
1	1	1	11	3	36
1	2	0	11	3	36
2	0	0	9	1	36
2	0	1	14	3	37
2	1	0	15	3	44
2	1	1	20	7	89
2	2	0	21	4	47
2	2	1	28	10	149
3	0	0	23	4	120
3	0	1	39	7	130
3	0	2	64	15	379
3	1	0	43	7	210
3	1	1	75	14	230
3	1	2	120	30	380
3	2	0	93	15	380
3	2	1	150	30	440
3	2	2	210	35	470
3	3	0	240	36	1 300
3	3	1	460	71	2 400
3	3	2	1 100	150	4 800

NOMBRE LE PLUS PROBABLE ET INTERVALLE DE CONFIANCE
DANS LE CAS DU SYSTÈME D'ENSEMENCEMENT N° 3

Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			N.P.P. dans 100 ml	Limites de confiance à 95 %	
5 tubes de 10 ml	1 tube de 1 ml	1 tube de 0,1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	0	2	0	5,9
0	1	0	2	0,050	13
1	0	0	2,2	0,050	13
1	1	0	4,4	0,52	14
2	0	0	5	0,54	19
2	1	0	7,6	1,5	19
3	0	0	8,8	1,6	29
3	1	0	12	3,1	30
4	0	0	15	3,3	46
4	0	1	20	5,9	48
4	1	0	21	6,0	53
5	0	0	38	6,4	330
5	0	1	96	12	370
5	1	0	240	12	3 700

NOMBRE LE PLUS PROBABLE ET INTERVALLE DE CONFIANCE
DANS LE CAS DU SYSTÈME D'ENSEMENCEMENT N° 2

Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			N.P.P. dans 100 ml	Limites de confiance à 95 %	
5 tubes de 10 ml	5 tubes de 1 ml	5 tubes de 0,1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	2	< 0,5	7
0	1	0	2	< 0,5	7
0	2	0	4	< 0,5	11
1	0	0	2	< 0,5	7
1	0	1	4	< 0,5	11
1	1	0	4	< 0,5	11
1	1	1	6	< 0,5	15
1	2	0	6	< 0,5	15
2	0	0	5	< 0,5	13
2	0	1	7	1	17
2	1	0	7	1	17
2	1	1	9	2	21
2	2	0	9	2	21
2	3	0	12	3	28
3	0	0	8	1	19
3	0	1	11	2	25
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	2	0	14	4	34
3	2	1	17	5	46
3	3	0	17	5	46
4	0	0	13	3	31
4	0	1	17	5	46
4	1	0	17	5	46
4	1	1	21	7	63
4	1	2	26	9	78
4	2	0	23	7	67
4	2	1	26	9	78
4	3	0	27	9	80
4	3	1	33	11	93
4	4	0	34	12	96
5	0	0	21	7	70
5	0	1	31	11	89
5	0	2	43	15	134
5	1	0	33	11	93
5	1	1	46	16	120
5	1	2	63	21	154
5	2	0	49	17	126
5	2	1	70	23	168
5	2	2	94	28	219
5	3	0	79	25	187
5	3	1	109	31	251
5	3	2	141	37	343
5	3	3	175	44	503
5	4	0	130	35	302
5	4	1	172	43	486
5	4	2	221	57	698
5	4	3	278	69	849
5	4	4	345	117	999
5	5	0	240	66	754
5	5	1	348	118	1 005
5	5	2	542	180	1 405
5	5	3	918	303	3 222
5	5	4	1 609	615	5 805

NOMBRE LE PLUS PROBABLE ET INTERVALLE DE CONFIANCE
DANS LE CAS DU SYSTÈME D'ENSEMENCEMENT N° 4

Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			N.P.P. dans 100 ml	Limites de confiance à 95 %	
1 tube de 50 ml	5 tubes de 10 ml	5 tubes de 1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	1	< 0,5	4
0	0	2	2	< 0,5	6
0	1	0	1	< 0,5	4
0	1	1	2	< 0,5	6
0	1	2	3	< 0,5	8
0	2	0	2	< 0,5	6
0	2	1	3	< 0,5	8
0	2	2	4	< 0,5	11
0	3	0	3	< 0,5	8
0	3	1	5	< 0,5	13
0	4	0	5	< 0,5	13
1	0	0	1	< 0,5	4
1	0	1	3	< 0,5	8
1	0	2	4	< 0,5	11
1	1	0	3	< 0,5	8
1	1	1	6	< 0,5	15
1	1	2	7	< 0,5	17
1	1	3	9	2	21
1	2	0	5	< 0,5	13
1	2	1	7	1	17
1	2	2	10	3	23
1	2	3	12	3	28
1	3	0	8	2	19
1	3	1	11	3	26
1	3	2	14	4	34
1	3	3	18	5	53
1	3	4	21	6	66
1	4	0	13	4	31
1	4	1	17	5	47
1	4	2	22	7	69
1	4	3	28	9	85
1	4	4	35	12	101
1	4	5	41	15	117
1	5	0	24	8	75
1	5	1	35	12	101
1	5	2	54	18	138
1	5	3	92	27	217
1	5	4	161	39	> 450

TABLEAU 3

(Extrait du document F 286/5)

2 - 2 - 3 Test Présence Absence P/A
(Cf fig 4)

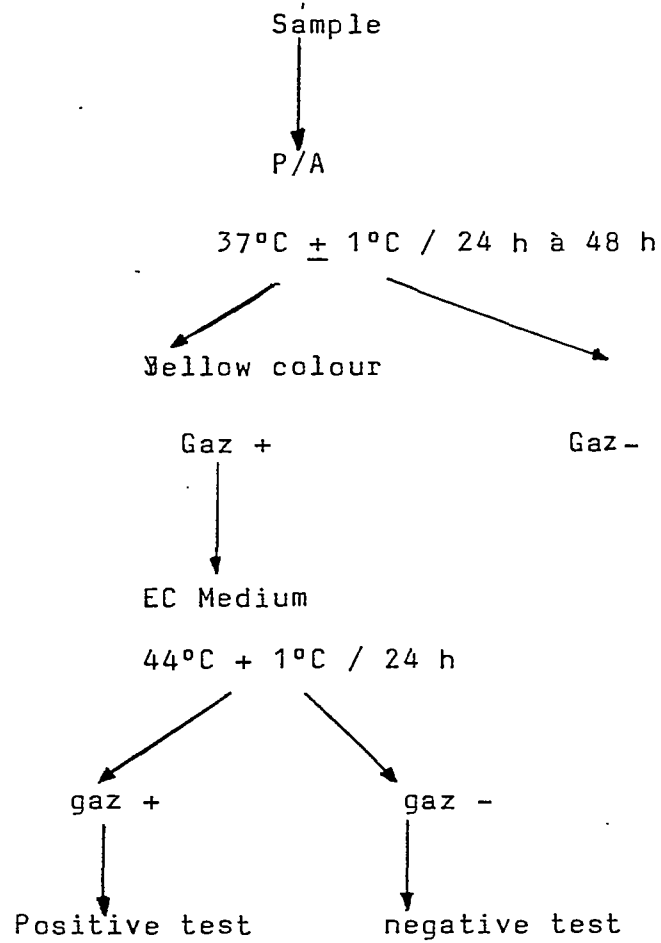
Le test P/A relatif au groupe de coliformes est une simple modification de la méthode MPN. Cette modification consiste à ensemençer dans un seul flacon contenant le milieu (Cf ANNEXE 1), un volume de 100 ml de l'échantillon à analyser. Ce test est justifié par le fait qu'aucun germe coliforme n'est toléré dans un volume de 100 ml d'eau de boisson.

Dans le test présomptif un flacon contenant le milieu P/A est inoculé par 100 ml d'échantillon, l'ensemble est incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures ; après ce temps d'incubation, la coloration jaune du milieu indique la présence d'acide dû à la fermentation du lactose. La lecture est complétée par la présence de gaz dans la cloche. Pour l'épreuve de confirmation les flacons positifs sont d'abord repiqués dans le bouillon vert brillant à 37°C pour les coliformes totaux, et ensuite dans Ec medium à 44°C pour les coliformes fécaux. La présence de gaz dans les tubes positifs confirme la présence de germes coliformes.

fig -4-

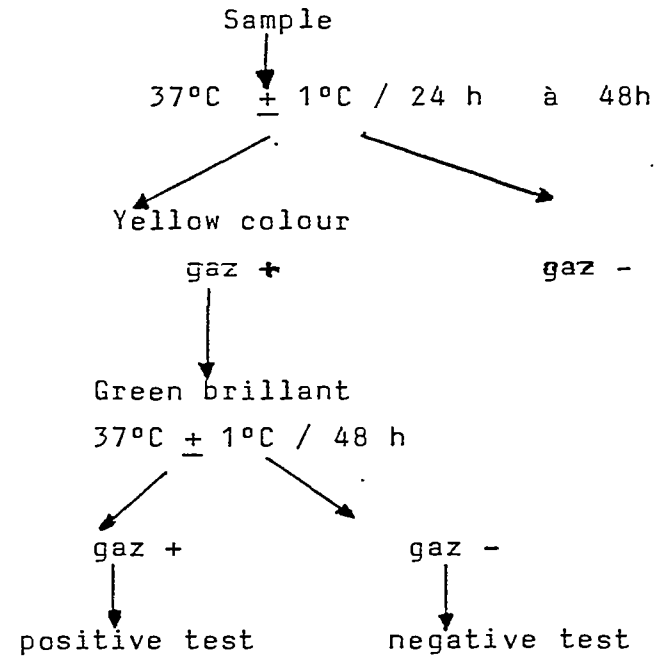
Presence - Absence Test

Presumptive test



Confirmative test

(P/A). Test



3 RECHERCHE DES STREPTOCOQUES FECAUX

Ce sont des bacteries cocci gram positif en chaînettes, catalase négative, regroupées sous le terme de "streptocoque fecaux", il faut entendre l'ensemble des streptocoques possédant la structure antigenique caracteristique du groupe D de lancefield (Cf fig 5). Un des caracteres communs à toutes les especes de ce groupe est une très forte resistance notamment vis à vis des inhibiteurs bacteriens. Parmi ceux ci l'azide de sodium, relativement toleré par les streptocoques fecaux, et fortement inhibiteur de croissance pour les enterobacteries.

3 - 1 Milieux de culture et réactifs

Les milieux déshydratés et réactifs utilisés sont décrits dans l'annexe 2. Parmi ces milieux ; le milieu de Roth normal et à double concentration, le milieu de Litsky, et le milieu de stanetz et Barteley.

3 - 2 Méthodologie (CF fig B)

Les deux méthodes d'analyses, filtration sur membrane (MF) ou ensemencement en milieu liquide (MPN) peuvent être pratiquées. Ainsi dans la méthode MPM, les tubes de milieu de Roth sont ensemencés par un volume d'échantillon et incubés à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les tubes présentant un trouble microbien pendant cette période sont présumés contenir un stréptocoque fecal et sont soumis au test confirmatif qui consiste à repiquer les tubes positifs dans un milieu de litsky à l'éthyl-violet et azide de sodium.

Après un temps d'incubation de 24 à 48 heures à 37°C l'apparition d'un trouble microbien confirme la présence d'un streptocoque fécal. Parfois la culture s'agglomère au fond du tube en fixant le colorant et en formant une pastille violette de signification identique à celle du trouble. Les résultats de dénombrement des streptocoques fecaux sont exprimés en nombre de germe par 100 ml.

Dans la méthode de dénombrement par membrane filtrante après filtration, la membrane est appliquée sur le milieu de slanetz. Après incubation pendant 48 heures à 37°C, on compte toutes les colonies rouges, violettes, ou roses visibles sur la boîte, les colonies de stréptocoques fecaux présumées sont confirmées dans le milieu de litsky. Une coloration de Gram avec recherche de catalase sont effectuées pour confirmer leur présence.

Les résultats sont exprimées en utilisant la formule suivante :

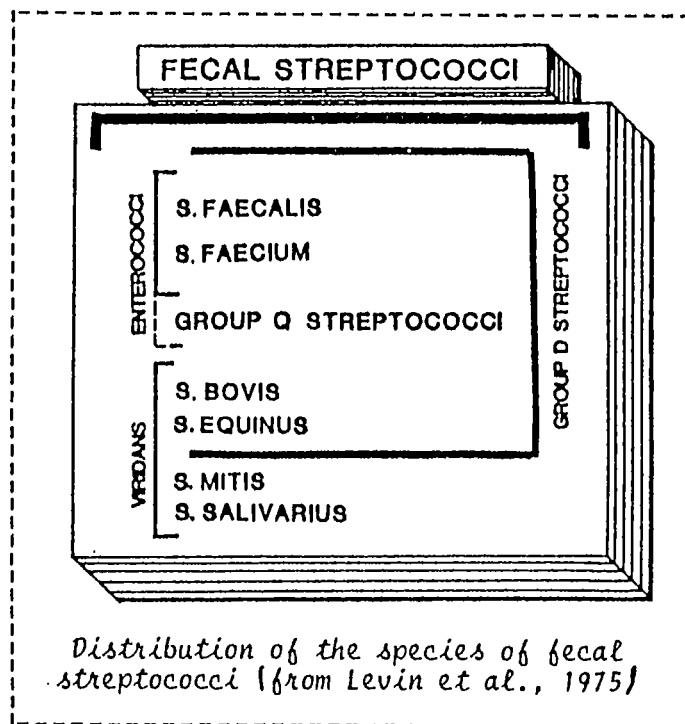
$$\text{streptocoques fecaux/ 100 ml} = A/B \times 100/F.$$

A = Nombre total de colonies streptocoques caracteristiques (confirmés et identiques) comptées sur toute les membranes.

B = la sommes des quantités d'eau filtrée en ml.

F = facteur de dilution.

FIGURE 5



(Extrait du document 66/50289)

4 Methode d'analyse des coliphages

Les coliphages sont des bactériophages qui infectent les coliformes et se trouvent là où il y a présence de ces germes.

Une corrélation entre les coliphages et les coliformes montre que les coliphages pourraient être utilisés comme indicateur de la présence de coliformes. Par le fait que les coliphages sont plus résistants au chlore que les germes coliformes, ils peuvent également être utilisés comme indicateur de l'efficacité de la désinfection.

4 - 1 Méthode classique

4 - 1.1 Souches standards et milieu de cultures (Cf ANNEX 3)

Une souche de collection d'E.coli ATCC n°13706, des milieux de culture comme, trypticase soy agar (TSA), trypticase soy broth (TSB) et trypticase soy agar modifié (MTSA) additionnée de TTC sont utilisés dans cette étude.

4 - 1.2 Mode opératoire : (cf fig 5)

a) préparation de l'hôte

- transférer une culture E.coli de TSA dans un tube contenant 10 ml de TSB (et 10 % N/N de glycerine).
- incubaer à 37°C pendant une nuit.
- transférer de nouveau la culture E.coli dans un flacon contenant 25 ml de TSB plus 10 % V/V de glycérine et incubé à 37°C jusqu'à ce que la densité optique soit de 0,5 à 520 nm (concentration bactérienne voisine de 1×10^8 E.Coli cellules/ml). Le Zéro optique étant le TSB plus glycérine à 10 % stérile.

- Distribuer aseptiquement par portion de 4,5 ml la suspension bactérienne et congeler à - 20°C. La durée de stockage ne doit pas dépasser 6 semaines.

b) Détermination des coliphages

- Pour les échantillons contenant plus de 5 coliphages/ 100 ml, la méthode est directement applicable.
- Si l'échantillon contient plus de 1000 coliphages/100 ml, procéder à des dilutions au 1/5 ou 1/10 avec de l'eau distillée stérile.
- Faire fondre des tubes de gélose de MTSA dans un bain marie à 44,4°C
- Ajouter 1,0 ml de la culture hôte à 5 ml de l'échantillon (ou de sa dilution) et 0,08 ml de TPTZ dans chacun des 4 tubes de MTSA.
- Mélanger et verser aseptiquement chaque tube dans une boîte de pétri de 100 x 15 mm.
- Laisser la gélose se solidifier.

Incubation

- incuber à 37°C pendant 4 à 6 heures.

Lecture

- compter les plaques apparues sur les 4 boîtes de Pétri et multiplier le résultat par 5.
- Donner le résultat en nombre de coliphages / 100 ml (en tenant compte du facteur de dilution)

Les bactériophages infectent et se développent au dépend des bactéries. Les plaques apparues sur la gélose sont dues à la lyse des cellules par les bactériophages. Le nombre des plaques correspond à celui des coliphages. En se basant sur le nombre de coliphages, déterminer le nombre de coliformes totaux et fécaux selon les formules suivantes :

Coliformes totaux :

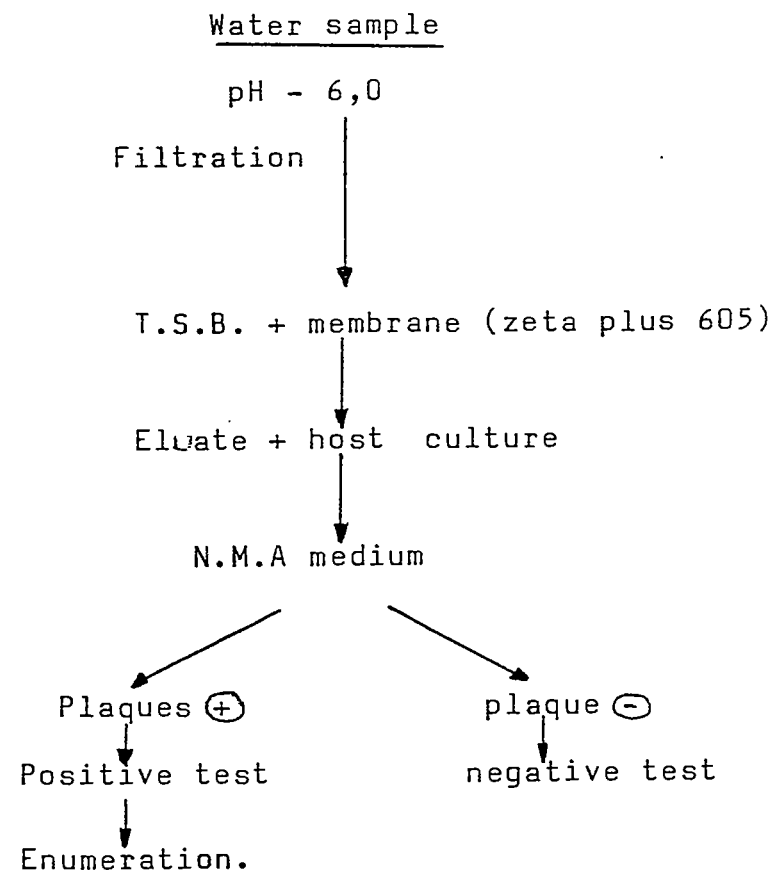
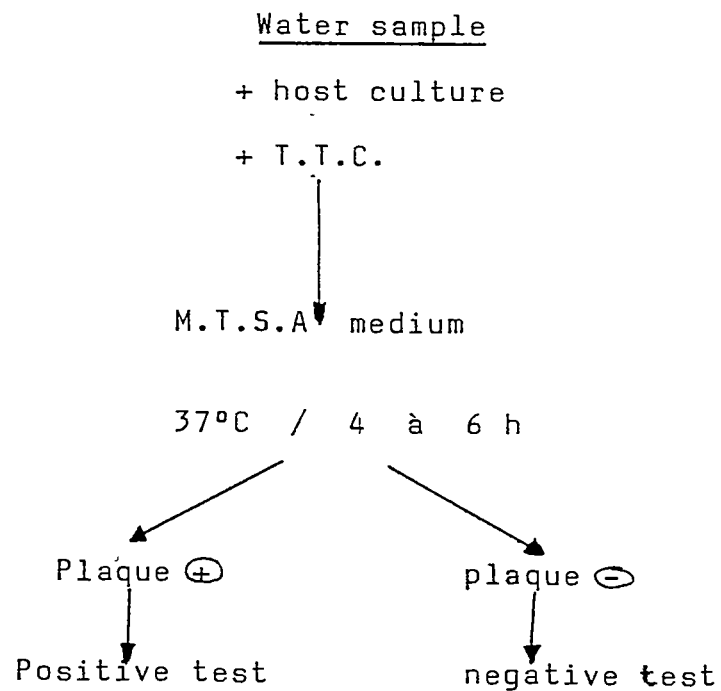
$$\begin{aligned} \log y &= 0,627 \log x + 1,864 \\ \text{où } y &= \text{coliformes totaux/100 ml} \\ x &= \text{coliphages /100 ml} \end{aligned}$$

Coliformes fécaux :

$$\begin{aligned} \log y &= 0,805 \log x + 0,895 \\ \text{où } y &= \text{coliformes fécaux/100 ml} \\ x &= \text{coliphages/100 ml} \end{aligned}$$

fig -6-

METHOD FOR DETECTING COLIPHAGES



4 - 2 Méthode de coliphages par filtration sur membrane zeta plus 60 S

Enfin de projet, parallèlement à la méthode classique une autre méthode de détection et denombrement de coliphages par utilisation d'une membrane filtrante zeta 60 S a été réalisée.

4 - 2.1 Milieux de culture et souches de collection

On utilise - Les mêmes milieux et réactifs que la méthode classique, à part le MTSA qui est remplacé par le MNA
- La même souche de collection d'E.coli A TTCC 13706.

4 - 2.2 Préparation de la culture Hôte

- 1.a - Inoculer un tube contenant 5 ml du milieu T.S.B avec E. coli 13706. incubé à 37°C pendant une nuit.
- 1.b - Transférer aseptiquement 5 ml de T.S.B de (1.a) dans un erlenmeyer de 125 ml contenant 50 ml de T.S.B stérile (contenant 10 % de glycérine) incubé à 35°C pour que la densité optique soit de 0,5 à 520 nm le zéro optique étant le T.S.B + 10 % de glycérine stérile.
- 1.c - Placer l'erlenmeyer de (1.b) dans un bain de glace pendant 15 mn
- 1.d - Pipeter 5 ml de la culture d'E.coli de (1.c) et mettre dans des fioles stériles.
- 1.e - Fermer les fioles et conserver à -20°C. La durée de conservation ne doit pas dépasser 9 semaines au freezer ou 14 jours au réfrigérateur ordinaire.

4 - 2.3 Mode opératoire

- 2.1 - Dégeler la fiole contenant la culture hôte au bain marie à 44,5°C pendant 15 mn (une fiole par échantillon)
- 2.2 - Ajuster le PH de l'échantillon à 6,0 avec HCl (0,1N ou 1N) (une fiole par échantillon) ou NaOH (0,1 N ou 1N)
- 2.3 - Faire fondre 4 tubes de M.N.A à 100°C, transférer les tubes à 44,5°C pendant 10 mn pour stabiliser la température.
- 2.4 - Filtrer l'échantillon (PH 6,0) à travers la membrane Zeta plus 60 s chargée positivement.
- 2.5 - Remplacer le stérifil avec la membrane sur un autre erlenmeyer sous vide stérile pour collecter l'éluat.

- 2.6 - Ajouter 10 ml du milieu T.S.B à pH 8,5 et laisser en contact avec la membrane pendant 10 mn avant, d'appliquer le vide ajouter une 2eme fois 10 ml de T.S.B. à la membrane et appliquer le vide puis laisser la membrane avec 1 à 3 ml d'eau distillée sterile et filtrer.
- 2.7 - Le volume total de l'eluât (2-6) sera de (20 à 23 ml) mélanger 5 ml de chaque aliquote d'eluât avec 5,5 ml du milieu M.N.A du (2-3) (4 tubes par échantillon)
- 2.8 - Ajouter 1,0 ml de la culture hôte dégelée à chaque tube contenant M.N.A et l'eluât d'échantillon.
- 2.9 - Agiter doucement les tubes et verser dans les boîtes de petri 100 mm (4 boîtes par échantillon)
- 2.10 - Couvrir les boîtes et laisser solidifier puis incubé à 35°C pendant 6 heures.

CONCLUSION

Les analyses bactériologiques avec essentiellement les dénombrements d'agents temoins de contamination fecales et d'agents pathogènes constituent le premier plan dans la surveillance microbiologiques des eaux.

Elles sont nécessaires à tous les niveaux d'utilisation de l'eau par l'homme.

- eau de boisson (eaux naturelles traitées ou non, eaux embouteillées)
- eau de loisirs (baignads en eau vive et piscines)
- eau de fabrication (surtout au niveau des aliments)
- eau à usage particulier (eaux des hôpitaux) etc...

Les méthodes d'analyses existants actuellement ne sont pas utilisables dans tous les laboratoires, cependant les méthodes, les plus classiques utilisent, un matériel relativement simple et peu onéreux.

des récipients courants de laboratoires
(bêchers tubes, flocons etc...)

- un matériel ordinaires comme boites de patris membrane filtrantes
- un microscope classique

Par contre les produits utilisés sont très divers et souvent onereux. Les milieux de cultures demandent des préparations très minitieuses

On outre, le personnel doit être compétent non sulement pour les manipulations mais aussi et surtout pour l'intrepretation des résultats d'analyses

Ces analyses doivent être effectuées en tenant compte evidement de l'interet qu'elles offrent et aussi du coût d'operation

Ces obligations et le pluralisme des missions imposées aux laboratoires ont servi de guide dans le choix de techniques decrites dans cette étude.

- 29 -
ANNEXE I
I

- Milieu d'Endo

m-Endo Medium^a

Ingredients	Quantity
Tryptone or polypeptone	10 g
Thiopeptone or thiotone	5 g
Casitone or trypticase	5 g
Yeast extract	1.5 g
Lactose	12.5 g
Sodium chloride	5 g
Dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	4.375 g
Potassium dihydrogen phosphate (KH ₂ PO ₄)	1.375 g
Sodium lauryl sulfate	0.05 g
Sodium deoxycholate	0.1 g
Sodium sulfite	2.1 g
Basic fuchsin	1.05 g
Distilled water containing 20 ml of ethanol	1.0 liter
Final pH 7.2 ± 0.1 (no autoclaving)	
Single-strength dehydrated medium, 48g/liter	

^aCommercial dehydrated medium is available from several media manufacturers. m-Endo agar may be prepared by adding 1.5% agar to the broth formulation.

(Extrait du document F 4344)

mFC Agar^a

Ingredient	Quantity
Tryptose or biosate	10.0 g
Proteose peptone No. 3 or polypeptone	5.0 g
Yeast extract	3.0 g
Sodium chloride	5.0 g
Lactose	12.5 g
Bile salts No. 3 or bile salts mixture	1.5 g
Aniline blue	0.1 g
Agar	15.0 g
Distilled water containing 10 ml of 1% rosolic acid sale reagent	1.0 liter
Final pH 7.4 ± 0.1 (no autoclaving)	
Single-strength dehydrated medium, 37 g/liter	

^aCommercial dehydrated medium is available from several media manufacturers.

(Extrait du document F 4344)

Milieu lactosé bilé au vert brillant

Composition

Peptone	10,0 g
Lactose	10,0 g
Bile de boeuf deshydratée ...	20,0 g
Vert brillant	0,0133 g
Eau distillée	1000 ml

Préparation

- Peser la quantité du milieu deshydraté indiquée par le fabricant ou les quantités des différents ingrédients composant le milieu.
 - Chauffer doucement jusqu'à la dissolution complète du milieu.
 - Répartir par portion de 10 ml environ dans des tubes de 160 x 16 mm (ou 180 x 18 mm) avec cloches à gaz.
 - Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à 120°C.
- Le pH du milieu doit être de $7,2 \pm 0,2$.

A. Broth

Composition

Lactose	5,0 g
Tryptone	20,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Salicium	0,5 g
Polyéthylène glycol p-iso-octyl phenyl ether	1,0 ml
Eau distillée	1000 ml

Préparation

- Chauffer jusqu'à la dissolution des ingrédients ajouter 1 ml du polyéthylène glycol p-iso-octyl phenyl ether et ajuster le pH à $6,9 \pm 0,1$.
 - Distribuer dans des tubes (160 x 16 ou 180 x 18) avec cloches à gaz.
 - Stériliser à l'autoclave à 121°C pendant 10 min.
 - Stocker à la chambre froide (à l'abri de la lumière) pour une période ne dépassant pas 7 jours.
- Pour les prises d'échantillon de 10 ml, préparer le milieu à double concentration.

Gélose lactosée de Mac Conkey :

Composition :

Peptone	10 g
Lactose	10 g
Sels biliaires	1 g
Chlorure de sodium	5 g
Rouge neutre	0,03 g
Gélose	15 g
Eau	1 000 ml
Cristal violet	0,001 g
pH	7,1

Milieu E.C. (ou milieu de Hajna et Perry)

Composition

Tryptose	20,0 g
Lactose	5,0 g
Sels biliaires	1,5 g
l'onoxyhydrogène-phosphate de sodium	4,0 g
Dihydrogène-phosphate de sodium	1,5 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Eau distillée	1000 ml

Préparation

- Peser la quantité du milieu deshydraté indiquée par le fabricant ou les quantités des différents ingrédients composant le milieu.
 - Dissoudre dans l'eau à l'ébullition.
 - Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à 120°C.
 - Répartir par portion de 10 ml en tubes de 160 x 16 mm (ou 180 x 18 mm) avec cloches à gaz.
- Le pH du milieu doit être de $6,9 \pm 0,2$.

Milieu au Tergitol 157.

Composition

Peptone de viande	5,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Lactose	10,0 g
Heptadecyl sulfate de sodium....	0,1 g
Bleu de Bromothymol	0,025g
Agar - Agar	12,0 g
Eau distillée	1000 ml

Préparation

- Peser la quantité du milieu deshydraté indiquée par le fabricant ou les quantités des différents ingrédients composant le milieu,
- Dissoudre dans l'eau à l'ébullition,
- Distribuer le milieu homogénéisé dans les ballons de 250 ml à fond plat,
- Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à 120°C.
- Ajouter, soit le volume d'une solution de chlorure de 2, 3, 5 - triphényl - tétrazolium (TTC) indiqué par le fabricant, soit 5 ml d'une solution à 0,05 stérilisée par filtration pour 1000 ml du milieu indiqué ci-dessus.
- Bien homogénéiser et distribuer dans des boîtes de Pétri stériles de 55 - 60 mm de diamètre à raison d'au moins 5 ml de milieu par boîte.

Le pH du milieu doit être de 7,2 ± 0,2.

P/A broth (Presence/ absence broth)

Composition

- Lactose broth (deshydraté) ..	13,0 g
- Lauryl tryptose broth.....	17,5 g
(deshydraté)	
- Promocriol puspale	0,0085g
- Eau distillée	1000 ml

Diluant peptoné salé composé de :

Tryptone	1,0 g
Chlorure de sodium	8,0 g
Eau distillée	1000 ml

Le diluant réparti en tubes stériles de 220 x 22 mm à raison de 9 ml par tube est stérilisé à l'autoclave durant 20 min à 120 °C.

Milieu au lauryl sulfate de sodium

Composition

Tryptose	20,0g
Monohydrogène-phosphate de potassium, anhydre	2,75g
Dihydrogène-phosphate et potassium anhydre	2,75g
Chlorure de sodium	5,0 g
Lactose	5,0 g
Lauryl sulfate de sodium ...	0,1 g
Eau distillée	1000 ml

Préparation

- Peser, selon les indications du fabricant du milieu deshydraté, la quantité nécessaire pour un volume donné de milieu simple ou de milieu double ou les quantités des différents ingrédients composant le milieu.
- Chauffer doucement jusqu'à la dissolution complète du milieu.
- Répartir par portions de 10 ml dans des tubes de 160 x 16 mm (ou 180 x 18 mm) pour le milieu simple et dans des tubes de 220 x 22 mm pour le milieu double, avec cloches à gaz.

- Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à 120°C.

Le pH du milieu doit être de 6,8 ± 0,2.

Milieu de Rothe

Composition

Peptone	20,0 g
Glucose	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Monohydrogène-phosphate de potassium	2,7 g
Dihydrogène-phosphate de potassium	2,7 g
Azide de sodium	0,2 g
Eau distillée	1 000 ml

Préparation

- Peser, selon les indications du fabricant du milieu deshydraté, la quantité nécessaire pour un volume donné de milieu simple ou de milieu double ou les quantités des différents ingrédients composant le milieu.
 - Chauffer doucement jusqu'à la dissolution complète du milieu.
 - Dissoudre dans l'eau par chauffage doux.
 - Répartir par portions de 10 ml dans des tubes de 160 x 16 mm (ou 180 x 18 mm) pour le milieu simple et dans des tubes de 220 x 22 mm pour le milieu double.
 - Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à 120°C.
- Le pH du milieu doit être de 7,0 ± 0,2.

Milieu de Slanetz et Bartley

Composition

Peptone	20,0 g
Extrait de levure	5,0 g
Glucose	2,0 g
Monohydrogène phosphate de potassium	4,0 g
Azide de sodium	0,4 g
Agar	10,0 g
Eau distillée	1 000 ml

Préparation

- Peser la quantité du milieu deshydraté indiquée par le fabricant ou les quantités des différents ingrédients composant le milieu
 - Dissoudre dans l'eau par chauffage doux
 - Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à 120°C
 - Refroidir à 45 - 50°C
 - Ajouter 10 ml d'une solution stérile de chlorure de 2-3-5 triphenyl tetrazolium (T.T.C) à 1 %, stérilisée par filtration.
 - Bien homogénéiser et distribuer dans des boîtes de Pétri stériles de 55 - 60 mm de diamètre à raison d'au moins 5 ml de milieu par boîte.
- Le pH du milieu doit être de 7,2 ± 0,7.

Milieu de Litsky

Composition

Peptone	20,0 g
Glucose	5,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Monohydrogène phosphate de potassium	2,7 g
Dihydrogène phosphate de potassium	2,7 g
Azide de sodium	0,2 g
Ethyl violet	0,00083 g
Eau distillée	1 000 ml

Préparation

- Peser la quantité du milieu deshydraté indiquée par le fabricant ou les quantités des différents ingrédients composant le milieu.
 - Dissoudre dans l'eau par chauffage doux.
 - Répartir par portion de 10 ml environ dans les tubes de 160 x 16 mm (ou 180 x 18 mm).
 - Stériliser pendant 20 min. à l'autoclave à 120°C.
- Le pH du milieu doit être de 7,2 ± 0,2.

-33-
ANNEXE 3

Trypticase Soy. broth (TS B)

Composition

- Tryptone 17,0 g
- Soytone 3,0 g
- Dextrose 2,5 g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- $K_2 HPO_4$ 2,5 g
- Eau distillée 1 000 ml
- Chauffer et agiter jusqu'à la dissolution complète.
- Ajouter 10 % (W/V) de glycérine)
- Distribuer des quantités selon le besoin.
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 min.

Le pH doit être de 7,3
(ajuster si nécessaire par NaOH ou HCl 0,1 N).

Modified trypticase Soy agar (MTSA).

Composition

Aux ingrédients de TSB, ajouter :

- $Sr (NO_3)_2$ 0,21 g
- $NH_4 (NO_3)$ 1,60 g
- Agar 15 g

Préparation

- Chauffer doucement jusqu'à la dissolution complète des ingrédients
- Vérifier le pH (il doit être de 7,3)
- Distribuer dans des tubes à essai avec bouchon à vis
- Autoclaver à 120°C pendant 15 min.

2,3, 5 - Triphenyl - Tetrazolium chloride

1 % (W/V) dans l'éthanol, ajouter au milieu MTSA à la température de 45 - 46°C. La solution est préparée chaque semaine.

Trypticase Soy. agar (TS A) :

Composition

- Tryptone 15,0g
- Soytone 5,0g
- Chlorure de sodium 5,0g
- Agar 15,0g
- Eau distillée 1000 ml

Préparation

- Chauffer doucement jusqu'à la dissolution complète du milieu
- Ajuster le pH à 7,3
- Répartir par portion de 5 à 8 ml dans des tubes de 160 x 16 mm.
- Stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 15 min.

Modified Nutrient Agar (MNA) - 5.5 mL per 16 x 125 mm tube, sterile, formulated as follows:

Nutrient agar, dehydrated	23.0 g
Nutrient Broth	8.0 g
$Sr(NO_3)_2$	0.23 g
NH_4NO_3	1.76 g
NaCl	5.0 g
Water	to 1 L

Sterilized by autoclave at 15 psig for 15 minutes.

ANNEXE 4

Réactifs de la coloration de Gram :

Solution n° 1 : colorant

Solution A :

Crystal violet (contenant 90 % du colorant) 2,0 g
Ethanol 95 % 20 ml

Solution B :

Oxalate d'ammonium monohydraté ... 0,8 g
Eau distillée q.s.p 80 ml

Mélanger les deux solutions A et B. Attendre 24 heures et filtrer sur papier avant emploi pour la coloration de Gram.

Solution N° 2 : Solution de mordantage

Iode cristallisé 1,0 g
Iodure de potassium 2,0 g
Eau distillée q.s.p 300 ml

- Dissoudre l'iodure de potassium dans un peu d'eau distillée.
- Dissoudre ensuite, l'iode dans la solution d'iodure de potassium obtenue et compléter à 300 ml avec de l'eau distillée.
- Conserver le réactif dans un flacon brun. Jeter la solution dès que son aspect change.

Solution n° 3 : Décolorant

- Ethanol 95 %

Coloration de Gram

- A l'aide d'une anse stérilisée au bec à gaz, faire le prélèvement d'une colonie pure, après isolement.
- Étaler la population bactérienne prélevée dans une goutte d'eau distillée sur une lame propre puis sécher très doucement au bec à gaz.
- Verser sur le frottis séché et fixé une quantité de la solution n° 1 juste suffisante pour le recouvrir. Laisser en contact pendant une minute tout en imprimant les légers mouvements de basculement à la lame.
- Rejeter le colorant n° 1 et le remplacer par la solution n° 2. Laisser en contact 15 à 20 s.
- Rejeter et remplacer par la même solution pour la même durée.
- Décolorer au moyen de réactif n° 3. Arrêter l'opération lorsque la solution de rinçage devient incolore.
- Laver rapidement à l'eau courante.
- Recolorer au moyen de la solution n° 4 selon la méthode exposée ci-dessus pour la coloration par la solution n° 1.

Le temps de contact avec le colorant est de

2 à 3 s.

- Laver à l'eau courante
- Sécher entre 2 papier buvard
- Lecture :
 - Les bactéries colorées en violet foncé sont des Gram +
 - Les bactéries colorées en rose ou rouge pâle sont des Gram -

Note technique du testIMVIC

Les milieux d'isolement sont toujours utilisés en boîte de Pétri. Après avoir été coulés et solidifiés leur surface est séchée en laissant les boîtes entr'ouvertes à l'étuve pendant 15 minutes. L'ensemencement est effectué soigneusement de manière à obtenir le plus grand nombre possible de colonies bien isolées.

1) Recherche de l'indole.

Eau peptonée ou milieu "urée-indole"

Réactif de Kovacs :

Paradiéthylamino-benzaldéhyde 5 a

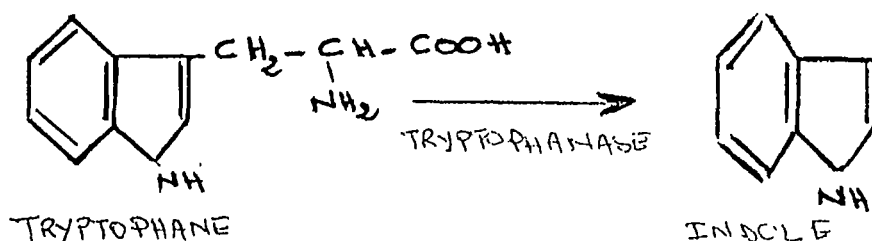
Alcool amylique 75 ml

HCl pur 25 ml

Dissoudre l'aldéhyde dans l'alcool au bain-
marie à 60°. Refroidir et ajouter l'acide goutte à goutte.

Ce réactif prend une teinte rouge quand on en ajoute quelques gouttes à un milieu contenant de l'indole.

L'indole est formé à partir du tryptophane.



2) Milieu de Clark et Lubs (R.M. - V.P.).

Formule :

Peptone tryptique de viande 5 g

Phosphate bipotassique	5	g
------------------------------	---	---

Glucose 5 g

Eau distillée 1000 ml

a) **Méthode classique :**

Ensemencer 5 ml de milieu et incuber à 37°C et si nécessaire, parallèlement à 22°C.

1) Réaction du rouge de méthyle (R.M.) :

après 2 jours d'incubation, prélever environ 2 ml du milieu et le transvaser dans un autre tube. On y verse une à deux gouttes d'une solution à 0,5 g pour 100 de rouge de méthyle dans l'alcool à 60°. Si le milieu prend une teinte rouge franc, la réaction est positive. Elle est négative si la teinte est jaune.

2) Réaction de Voges-Proskauer (V.P.) techni-

que de Barritt : après 2 jours d'incubation, 1 ml de milieu de Clark et Luhs est additionné de 0,5 ml d'une solution à 6 % d'alpha-nophtol dans l'alcool à 90° (réactif à conserver à l'obscurité) et de 0,5 ml de soude caustique à 16 % dans l'eau distillée. On agite et on abandonne pendant 15 minutes. Si la souche étudiée produit de l'acétyl-méthyl-carbinol, il se produit une teinte rouge qui apparaît à la surface du milieu.

b) Méthode rapide.

Répartir 0,5 ml de milieu de Clark et Lubs dans un tube 22 x 220 mm et 0,5 ml dans un tube 11 x 110 mm. Ensemencer avec une goutte de suspension une eau physiologique titrant environ 500 millions par ml. Après 18 h d'incubation rajouter dans le tube de 11 mm une goutte de solution de rouge de méthyle. Faire la lecture du R.M. Ajouter dans le tube de 22 mm 0,5 ml de solution d'alpha-baptul et 0,5 ml de la solution de soude. Porter à l'ébullition. Retirer de la flamme et agiter 1 minute. VP + : coloration rouge franc.

3) Milieu synthétique au citrate de Simmons.Formule :

Chlorure de sodium	5 g
Sulfate de magnésium	0,2 g
Phosphate monommonique	1 g
Phosphate bipotassique	1 g
Citrate de sodium	5 g
Pleu de bromothymol	0,08 g
Gélose	20 g
Eau distillée	1 000 ml
pH 7.	

Dans ce milieu synthétique, la source d'azote est constituée par le phosphate d'ammonium et la source de carbone par le citrate de sodium. Seuls les germes capables d'utiliser le citrate de sodium comme unique source carbonée cultiveront sur ce milieu, avec alcalinisation pour les Entérobactéries.

Ce milieu doit être ensemencé à partir d'une culture prélevée sur milieu gélosé. En aucun cas on ne se servira d'une culture en bouillon ou en eau peptonée qui apporterait avec les germes des éléments nutritifs susceptibles de fausser les résultats. L'ensemencement sera fait en surface par une strie longitudinale et le milieu porté à l'étuve à 37° C.

Les germes "citrate positifs" y donnent une culture abondante avec, en général, bleuissement du milieu. Les germes "citrate négatifs" ne donnent aucune culture même après plusieurs jours d'étuve.

Cette recherche de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone sur milieu de Simmons ne doit pas être confondue avec celle de la fermentation du citrate en milieu complexe de Christensen.

Milieu d'identificationMilieu de Kliger

extrait de viande de bœuf	3	g
extrait de levure	3	g
peptone pancréatique de caséine	20	g
chlorure de sodium	5	g
lactose	10	g
glucose	1	g
sulfate ferreux ammoniacal	0,5	g
thio-sulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	0,5	g
rouge de phénol	0,025	g
géluse	12 à 18	g
eau distillée	q.s.p. 1 000	ml

Dissoudre les composants dans l'eau à l'ébullition. Ajuster le pH à 7,4. Répartir le milieu dans des tubes de 16 mm x 160 mm, à raison de 5 à 8 ml par tube. Stériliser à l'autoclave à 115 °C pendant 20 mn. Laisser refroidir les tubes en position inclinée de façon à obtenir un culot de 2,5 cm de profondeur.

(Extrait du document F 286/5)

Gélose nutritiveComposition

Peptone	5,0 g
Extrait de viande	1,0 g
Extrait de levure	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Agar - Agar	15,0 g
Eau distillée	1000 ml

Préparation

- Peser la quantité du milieu deshydraté indiquée par le fabricant ou les ingrédients composant le milieu.
- Dissoudre dans l'eau à l'ébullition.
- Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à 120°C.
- Répartir par portion de 15 ml environ dans des tubes 180 x 18 mm et couler en boîtes de Pétrie stériles de 90 - 100 mm de diamètre au moment de l'emploi.

Le pH du milieu doit être de 7,0 $\pm$ 0,2.

Gélose lactosée à l'éosine et au bleu de méthylène (E.M.B.)Composition

Peptone de viande	10,0g
Monohydrogène-phosphate de potassium	2,0g
Lactose	10,0g
Eosine	0,4g
Bleu de méthylène	0,065 g
Agar - Agar	15,0g
Eau distillée	1000ml

Préparation

- Peser la quantité du milieu deshydraté indiquée par le fabricant ou les quantités des différents ingrédients composant le milieu.
 - Dissoudre dans l'eau à l'ébullition
 - Stériliser pendant 20 min à l'autoclave à 120°C.
 - Répartir par portion de 15 ml environ dans des tubes 180 x 18 mm et couler en boîtes de Pétri stériles de 90-100 mm de diamètre au moment de l'emploi.
- Le pH du milieu doit être de 7,0 $\pm$ 0,2.

Références Bibliographiques :

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION standard methodes for the examination of water and waste water 15^{ed}, washington, DC , APAH. 1980, 1985.
- Directive de la qualité pour l'eau de boisson volume 3 controle de la qualité de l'eau de boisson destinée à l'approvisionnement des petites collectivités Geneve - organisation mondiale de la santé - 1986 -
- Association française pour l'étude des eaux (AFEE) analyse biologiques de l'eau 1987.
- Colection DUMOD technique J. RODIER L'analyse de l'eau. 1975

AUG 20 1990
AOUT

