

# **Analyse Microbiologique des Eaux**

## **Plan :**

- I. Objets**
- II. Pr é l è v e m e n t**
- III. Transport et conservation au laboratoire**
- IV. M é t h o d e s g é n é r a l e s d ' e x a m e n b a c t é r i o l o g i q u e d e s e a u x**
- V. Analyse proprement dite**
- VI. Interpr é t a t i o n d e s r é s u l t a t s d ' a n a l y s e m i c r o b i o l o g i q u e p o s i t i f s**

## I. Objets

- **Analyse de routine** : détermination du nombre total de bactéries dans une eau donnée.
- **En cas d'épidémie** : recherche de bactéries pathogènes : salmonelles, shigelles, vibrio...
- **Recherche de virus**.

## II. Prélèvement



- Il doit être effectué d'une manière correcte.
- Les échantillons sont recueillis dans des flacons surtout stérilisés.
- On peut utiliser soit des flacons en verre (borosilicate de référence) de 250 ml à 1 litre, soit des flacons en plastique à usage unique.
- Une fois le flacon bouché le col est protégé par du papier sparadrap et doit être correctement étiqueté (date, heure du prélèvement, endroit, adresse exacte, analyses à effectuer...)
- Certains paramètres sont à faire in situ : pH, T° de l'eau et T° de l'air ambiant.

## III. Transport et conservation au laboratoire

- Le transport doit être rapide.
- Les prélèvements sont placés dans une enceinte réfrigérée (+4 à +6°C) à l'abri de l'air et de la lumière.
- Le délai maximum entre le prélèvement et le début d'analyse ne doit pas dépasser 24h.

- Après la prise d'essai, il est recommandé de placer le reste du prélèvement non utilisé au réfrigérateur. Il peut arriver en effet que les premières lectures bactériologiques, 24 ou 48 heures après l'ensemencement, donnent des résultats inattendus, incitant à vérifier l'analyse.

#### **IV. Méthodes générales d'examen bactériologique des eaux**

##### **1. Numération après ensemencement sur une GN :**

###### **A/ Méthode par Flottation :**

Faire couler à la surface de la boîte de pétri contenant la gélose, un volume connu de liquide (eau à analyser ou dilution) dans des conditions parfaites de stérilité puis faire incubé.

###### **B/ Méthode par immersion :**

Introduire un certain volume dans la boîte de pétri puis couler la gélose fondue et refroidir au-dessus, faire incubé.

###### **Résultat :**

On dénombre les colonies et on admet qu'une colonie correspond à une bactérie.

##### **2. Numération après concentration sur membrane filtrante :**

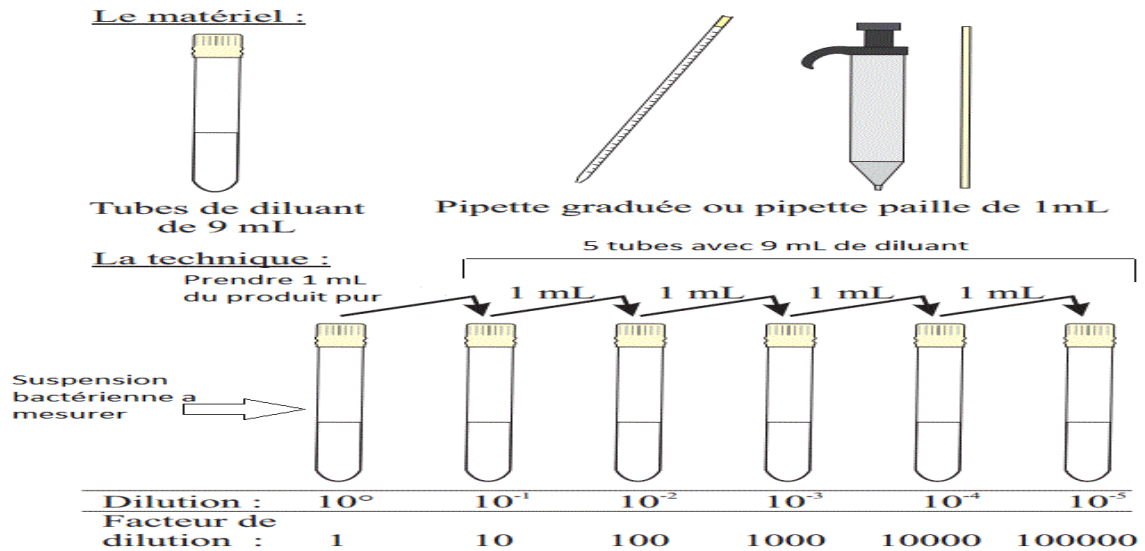
La filtration est effectuée sur membrane d'ester de cellulose de porosité 0,22  $\mu$  ou 0,45 $\mu$  susceptible de retenir les bactéries.

La technique est la suivante :

- Stériliser l'entonnoir gradué et la plaque poreuse à l'aide d'un bec bunsen.
- Refroidir avec l'eau à analyser.
- Mettre de façon aseptique une membrane filtrante (pince stérile).
- Verser aseptiquement un volume V d'eau à analyser.
- Actionner la pompe à vide pour absorber l'eau à travers la membrane.
- Retirer la membrane et la placer immédiatement et aseptiquement sur la surface d'une plaque de gélose : incubé.

### 3. D énombrement en milieu liquide/ D étermination du NPP :

C'est une estimation par calcul statistique du NPP (le nombre le plus probable) de micro-organismes. On ensemence des dilutions successives de l'eau à analyser à raison de 3 à 5 tubes en milieu de culture liquide.



#### - Exemple:

Volume de l'inoculum: 1mL	Produit pur	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Résultat	+	+	+	+	-	-

- Il y a au moins 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution  $10^{-3}$  et moins d'un micro-organisme dans 1mL de la dilution  $10^{-4}$  et donc on peut en déduire qu'**il y a au moins  $10^3$  micro-organismes mais moins de  $10^4$  micro-organismes dans 1mL de produit pur.**

#### - Exemple avec des essais multiples (3 tubes par dilution):

Volume de l'inoculum: 1mL	Produit pur	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Résultat	+++	+++	+++	++-	+--	---
Chiffre égale à la somme des tubes positifs	3	3	3	2	1	0

- Le NPP est donné en se référant à la table de Mc Grady

Tables NPP (d'après la norme ISO 7218 :1996(F))

**Tableau 1 - Table NPP pour 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) et 3 x 0,01 g (ml).**

Nombre de résultats positifs			NPP	Catégorie lorsque le nombre d'essais de mesures est de 1 pour le lot considéré	Limites de confiance			
					>95%	>95%	>99%	>99%
0	0	0	<0,30		0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	0	0,30	3	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	0,4	3,6	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2	0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	3	36	2	44
3	1	3	16	0	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	3	40	2	56
3	2	3	29	3	9	99	5	152
3	3	0	24	1	44	99	3	152
3	3	1	46	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	20	400	10	570
3	3	3	>110					
autres valeurs			non cité dans la table ISO 7218 : 1996 (F)					

Interprétation statistique: méthode du NPP (table de Mac Grady)

- correspondant au nombre 321: **le NPP est 15.**
- Cela signifie qu'il y a statistiquement quinze bactéries dans l'inoculum de la dilution  $10^{-2}$  mL. D'après les limites de confiance données par certaines tables, cette valeur numérique de 15 est en fait considérée comme comprise entre 3 et 38 avec une probabilité de 95 %, entre 2 et 52 avec une probabilité de 99 %.
- En déduire la concentration en micro-organismes par mL de produit pur N.
- NPP= nombre le plus probable obtenu par lecture de la table de Mac Grady
- V inoculum= 1 mL
- Fd= facteur de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique  $10^{-2}$
- $N = NPP / V \text{ inoculum} * Fd$
- $15/0,01 = 15 * 10^2 = 1500$  micro-organismes par mL

## V. Analyse proprement dite

### V-1. Recherche et numération des germes totaux :

«Micro-organismes aérobie revivifiables à 22 et 37 °C dans les eaux »

C'est un test d'orientation, utilisé comme indicateur de pollution soit dans les milieux naturels soit dans les réseaux, également utilisé comme indicateur d'efficacité de traitement.

#### Technique :

- Préparer des dilutions à partir de l'eau à analyser : 1/10, 1/100, 1/1000...en fonction du degré de pollution de l'eau et sa nature.
- Porter aseptiquement à partir de l'eau à analyser et/ou des dilutions décimales 1ml en double dans deux boîtes de pétri vides numérotées ;
- Couler ensuite le milieu gélosé TGEA ; mélanger par des mouvements circulaires en 8.
- Laisser solidifier et incuber :
  - La 1<sup>ère</sup> série à 22 °C pendant 72h ;
  - La 2<sup>ème</sup> série à 37 °C pendant 48h

#### Lecture :

Les colonies apparaissent en masse sous forme lenticulaire

Lire les boîtes de pétri ou le nombre de colonies est compris entre 30 et 300 colonies

Nombre de colonies/ 100 ml d'eau à analyser = nombre de colonies .100 .inverse de dilution.

### V.2. Recherche et dénombrement des coliformes:

#### a. Définition :

-Les coliformes sont des bacilles à GN, aéro-anaérobies facultatifs non sporulés, oxydase négatif, se multiplient en présence de sels biliaires, fermentent le lactose avec production acide et de gaz en 24 à 48h à 37 °C.

- **Les coliformes thermo tolérants** ont les mêmes propriétés que les coliformes mais à 44 °C.

-**Les Escherichia coli** sont des coliformes thermo tolérants ayant la particularité de produire de l'indole à partir du tryptophane présent dans le milieu à 44 °C.

#### b. Dénombrement :

##### 1. Colimétrie en milieu liquide :

Se fait en deux étapes consécutives :

##### \*Test de présomption :

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 50 ml dans un flacon de 50ml de milieu BCPL (Bouillon Lactose au pourpre de Bromocrésol) D/C muni d'une cloche de Durham ;
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10ml de BCPL D/C
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de BCPL S/C

Incuber à 37 °C pendant 24 à 48h

## Lecture

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- ✓ Un dégagement de gaz (supérieur au 1/10<sup>ème</sup> de la hauteur de la cloche),
- ✓ Un trouble microbien accompagné d'un virage du milieu au jaune. La lecture finale se fait selon les prescriptions de la table du NPP.

### \*Test de confirmation

-Le test de confirmation est basé sur la recherche de Coliformes thermo tolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence Escherichia coli.

-Les tubes de BCPL trouvés positifs lors du dénombrement des Coliformes feront l'objet d'un repiquage à l'aide d'une ose bouclée dans des tubes contenant le milieu Schubert muni d'une cloche de Durham.

-L'incubation se fait au bain marie à 44 °C pendant 24 heures.

## Lecture

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- ✓ Un dégagement gazeux,
- ✓ Un anneau rouge en surface, témoin de la production d'indole par Escherichia coli après adjonction de 2 à 3 gouttes du réactif de Kowacs.

La lecture finale se fera par consultation de la table du NPP.

## 2. Méthode par filtration sur membrane:

-La technique est décrite précédemment ;

-Le volume d'eau à filtrer varie de 100 à 250 ml, on filtre dans deux membranes différentes ;

-Milieu de culture : Gélose TTC au Tergitol

-Incubation : 1<sup>ère</sup> boîte à 37 °C, 2<sup>ème</sup> boîte à 44 °C pendant 24 à 48h

### Lecture :

\*Dénombrer les colonies lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en jaune orangé ou en jaune (lac +) ;

\*Repiquer de façon aléatoire 5 à 10 colonies sur TSI pour confirmation ;

\*Et l'identification se fait par le test IMVIC :

**I** : recherche de l'indole,

**M** : recherche de rouge de méthyle,

**V** : VP,

**I** : identification de l'inositol,

**C** : citrate de Simmons.

	Lac	Glu	H <sub>2</sub> S	Indole	RM	VP	Citrate
<b>E.coli</b>	+	+	-	+	+	-	-
<b>Klebsiella</b>	+	+	-	-	-	+	+
<b>Entérobacter</b>	+	+	-	-	±	±	+
<b>Citrobacter</b>	+	+	+	-	+	-	+

### V.3. Recherche et dénombrement des streptocoques fécaux :

#### a. Définition :

On entend par entérococoques intestinaux des bactéries:

- ✓ Cocci à Gram (+) formant des chaînettes
- ✓ Catalase (-)
- ✓ (X) en 24 à 48 heures à 37 °C sur un milieu sélectif à l'azoture de sodium
- ✓ Hydrolysent l'esculine en 2 heures à 44 °C après repiquage sur BEA.

#### b. Dénombrement :

##### 1. Méthode par ensemencement en milieu liquide :

##### Test de présomption

A partir de l'eau à analyser, porter aseptiquement :

- 50 ml dans un flacon contenant 50 ml de milieu ROTHE D/C.
- 5 fois 10 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE D/C
- 5 fois 1 ml dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu ROTHE S/C.

L'incubation se fait à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

##### Lecture

Seront considérés comme positifs les tubes présentant un trouble microbien.

##### Test de confirmation

\*Les tubes de ROTHE trouvés positifs feront l'objet d'un repiquage dans un tube contenant le milieu LITSKY EVA.

\*L'incubation se fait à 37 °C, pendant 24 heures.

##### Lecture

Seront considérés comme positifs, les tubes présentant à la fois :

- un trouble microbien,
- une pastille violette (blanchâtre) au fond des tubes.

La lecture finale s'effectue selon les prescriptions de la table du NPP

##### 2. Méthode par filtration sur membrane:

-Milieu de culture : Gélose Slanetz et Bartley

-Incubation à 37 °C pendant 48h



### **Lecture :**

- ✓ Les colonies caractéristiques sont lisses légèrement bombées à contours réguliers et pigmentées en rouge, marron ou rose.
- ✓ Transférer la membrane du milieu de Slanetz et Barbey sur (BEA) préalablement préchauffé à 44 °C puis incubé à 44 ± 0,5 °C pendant 2 heures.
- ✓ Les colonies prennent alors une coloration noire traduisant ainsi l'hydrolyse de l'esculine.
- ✓ Compter le nombre de colonies et le rapporter au volume d'eau filtré (100ml-250ml).

### **V.4. Recherche et dénombrement des Anaérobies Sulfito-Réducteurs:**

#### **a. Définition :**

Les ASR sont :

- ✓ Des BGP
- ✓ (x) à 36 ± 2 °C en 24 à 48 heures en glose profonde de type TSC ou TSN ou encore VF et donnent des colonies caractéristiques blanche entourées d'une auréole noire.

#### **b. Dénombrement (méthode par incorporation en glose en tubes profonds) :**

A partir de l'eau à analyser :

- \*Transférer environ 25 ml dans un tube stérile, puis chauffer à 75 °C pdt 15 min.
- \*Refroidir immédiatement.
- \*Répartir ensuite le contenu du tube, dans 4 tubes stériles.
- \*Ajouter environ 20 ml de glose VF, fondue puis refroidie à 47 ± 1 °C (+additifs).
- \*Mélanger doucement le milieu et l'inoculum.
- \*Laisser solidifier sur pailleuse puis incubé à 37 °C

### **Lecture et interprétation**

- \*Faire une première lecture 16 h après incubation, une deuxième 24h après et une dernière 44 ± 4 h après.
- \*Dénombrer toute colonie blanche entourée par une auréole noire de 0,5 mm de diamètre, ayant poussé en masse et rapporter le nombre total des colonies dans les quatre tubes à 20 ml d'eau.

### **V.5. Recherche des germes pathogènes :**

#### **5.1. Recherche de Salmonelles :**

##### **1. Recherche de Salmonelles :**

###### **a. Définition :**

Les Salmonelles sont:

- ✓ Des BGN
- ✓ (x) à la température de 36 ± 2 °C en 24 à 48 h, sur milieu Hektoen, formant de petites colonies, lisses à contours réguliers, pigmentées en vert ou en bleu vert à centre noir.

\*Les Salmonelles se divisent en deux grands groupes les typhoïdiques (Hautement pathogènes) et les non typhoïdiques.

\*Elles contaminent les grosses connexions et les eaux de baignades.

\*Leur présence dans l'eau est en nombre relativement faible et sont habituellement accompagnées de germes d'origine fécale (coliformes, E.coli, streptocoques, Klebsiella...)

### **b. Dénombrement :**

- Filtrer 0,5 jusqu'à 5 litres d'eau à analyser ;
- Transférer la membrane aseptiquement et la placer dans un flacon d'eau peptonné tamponné ;
- (Mélanger le filtre dans le milieu, c'est l'étape de pré-enrichissement ;
- Incuber 24h à 37 °C ;

### **Etape d'isolement I et enrichissement :**

- A partir du flacon ensemencer une boîte de glose Hektoen : incuber 37 °C pendant 24h ;
- Faire un enrichissement dans un tube d'SFB S/C : incuber à 37 °C pendant 24h

### **Isolement II + lecture:**

Le tube fera l'objet d'un 2ème isolement II sur Hektoen : incuber à 37 °C pendant 24h ;

Lecture des boîtes issues de l'isolement I : repérer les colonies caractéristiques et faire un repiquage sur TSI et une identification biochimique

### **Lecture :**

Lecture des boîtes issues de l'isolement II + repiquage des colonies suspectes.

## **Interprétation des résultats :**

### **1. Aspect du TSI :**

	<b>Culot</b>	<b>Pente</b>	<b>H<sub>2</sub>S</b>	<b>Gaz</b>
<b>S.typhi</b>	<b>Jaune</b>	<b>Rouge</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>S.paratyphi</b>	<b>Jaune</b>	<b>Rouge</b>	<b>-</b>	<b>+</b>
<b>Sérotypes</b>	<b>Jaune</b>	<b>Rouge</b>	<b>+++</b>	<b>+</b>

### **2. Galerie biochimique:**

Urée -, TDA-, Ox-, ONPG-, LDC +, indol -, nitrate +

### **5.2. Autres:**

#### **a. Vibrion cholérique:**

C'est un BGN droit ou incurvé, très mobile, ox +, AAF, fermente le glucose sans production de gaz ni d'H<sub>2</sub>S, hautement pathogène.

## **b. Dénombrement :**

### **Jour 1- Enrichissement primaire**

L'enrichissement primaire s'effectue dans un flacon contenant 50ml d'EPA 10 fois concentré, auquel on ajoute aseptiquement 450 ml d'eau à analyser au moment du prélèvement.

Ce dernier sera par la suite incubé à 37 °C pendant 24 heures.

### **Jour 2 - Enrichissement secondaire et Isolement**

Après incubation, le flacon constituant l'enrichissement primaire fera l'objet:

- d'une part, d'un enrichissement secondaire sur milieu EPA en tube (1ml)
- d'autre part, d'un isolement sur gélose GNAB 1.

Dans les deux cas, l'incubation se fera à 37 °C pendant 24 heures.

### **Jour 3 - Lecture des boîtes et Identification**

-D'une part, le tube d'EPA fera l'objet d'un isolement sur GNAB 2 qui sera incubé à son tour à 37 °C pdt 24 h.

-D'autre part, la boîte de GNAB1 subira une lecture en tenant compte du fait que les Vibrions se présentent le plus souvent sous forme de grosses colonies lisses plates, transparentes et très caractéristiques sous forme de goutte de rosée.

### **Identification morphologique et biochimique**

\*État frais (bacilles, mobilité),

\*Coloration de Gram (BGN),

\*On réalise une oxydase : si (+) : coloration violette.

A partir des colonies suspectes --> suspension dans l'eau physiologique => agglutination sur serum polyvalent -> si (+) agglutination sur serums Ogawa et Inaba.

\*Puis on fait un KIA, incubation 24 h à 37 °C : ODC (+).

## **b. Staphylocoques pathogènes :**

Ce sont des cocci à Gram + isolés ou en grappe de raisin, cat + et coagulase +, se multiplient en 24 à 48h à 37 °C sur un milieu sélectif : Chapman au mannitol.

L'espèce type du genre est Staphylococcus aureus. Elle est pathogène et très redoutée, surtout recherchée dans les eaux de baignade.

-Prendre 3 à 5 colonies au hasard, une demi colonie servira au test à la catalase, l'autre demi sera triturer dans un tube contenant du bouillon BHIB, et incubé 37 °C pendant 24h.

### **c. Legionelles :**

Ce sont des BGN, droits ou légèrement incurvés, mobiles, T ° de culture 35 °C, en atmosphère riche en CO<sub>2</sub>

Ce sont des germes de l'eau et de l'environnement. Très répandues dans les eaux douces, eaux potables, eaux chaudes, vapeur d'eau, rivières et lacs. Leur recherche est réglementaire dans le cadre du contrôle des eaux thermales.

Il existe trois genres :

L.pneumophila : 75% des pneumonies graves

L.jordanis: 10% des cas

L.bozmannii : 20% des cas

### **d. Pseudomonas aeruginosa :**

C'est un BGN, ox +, capable de produire de l'ammoniac à partir de l'acétamide.

Il est hautement pathogène et résistant à plusieurs antibiotiques.

## **VI. Interprétation des résultats d'analyse microbiologique positifs**

### **1. Eau à l'entrée du réseau de distribution :**

#### **a. Si eau traitée :**

Dans 95% des échantillons examinés pendant 1 année, les bactéries coliformes doivent être absentes (on tolère 5% de coliformes pendant 1 année)

-On pourrait tolérer au maximum 1 coliforme par 100ml par mois ; ceci ne doit pas arriver dans deux échantillons consécutifs ; si cela arrive, effectuer plusieurs analyses à différents points du réseau.

#### **b. Si eau non traitée :**

Absence de E.coli dans 100 ml ; dans le cas contraire, on peut tolérer la présence d'E.Coli au maximum 3 par 100ml

### **2. Eau à l'intérieur du réseau :**

L'eau à l'entrée du réseau qui peut avoir une qualité bactériologique parfaite pourrait se détériorer à l'intérieur (perforation...)

-Le pourcentage d'échantillons exempt de coliformes doit être ≥ ou = 95%

-Aucun échantillon de 100ml ne devra contenir d'E.coli

-Aucun échantillon de 100ml ne devra contenir plus de 10 coliformes

-Les coliformes ne doivent pas être présents dans deux examens consécutifs

-Si l'examen révèle la présence de coliformes dans deux échantillons consécutifs, il faut procéder à un nouveau prélèvement, si on trouve régulièrement 1 à 0 coliformes, des mesures doivent être prises pour déceler l'origine de la souillure et on doit surchlorer.