

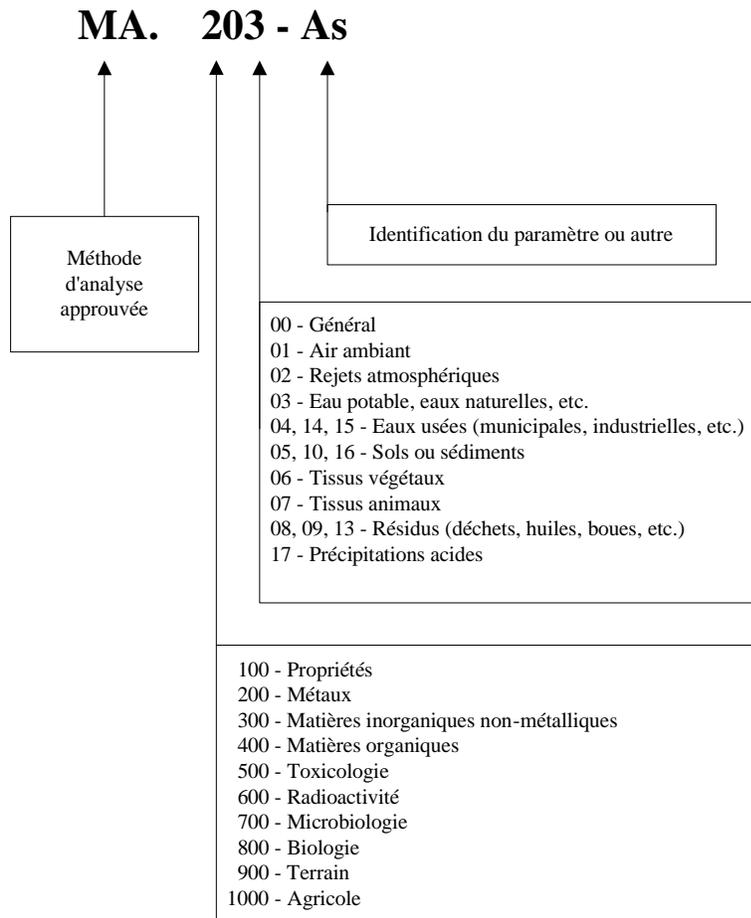
Méthode d'analyse



MA. 700 – Ecct 1.0

Recherche des coliformes totaux et de Escherichia coli
avec le milieu de culture Colilert® : méthode
présence/absence

Comment fonctionne la codification?



Note – Les méthodes publiées avant le 14 janvier 2014 ont deux chiffres à la fin de la codification de la méthode (ex. : MA. 203 – As 3.4). Le premier chiffre désigne le numéro de la méthode (3) et le deuxième chiffre désigne le numéro de

Référence à citer :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.
Recherche des coliformes totaux et de Escherichia coli avec le milieu de culture Colilert® : méthode présence/absence, MA. 700 – Ecct. 1.0, Rév. 2, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, 2015, 9 p.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
2700, rue Einstein, bureau E.2.220
Québec (Québec) G1P 3W8

Téléphone : 418 643-1301
Télécopieur : 418 528-1091
Courriel : ceaeq@mddelcc.gouv.qc.ca

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	6
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. FIABILITÉ	6
3.1. Interférence	6
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	7
5. APPAREILLAGE	7
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	7
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	7
7.1. Préparation des échantillons	8
7.2. Analyse de l'échantillon	8
7.3. Observation des résultats	8
7.4. Confirmation	9
8. EXPRESSION DES RÉSULTATS	9
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	9
10. BIBLIOGRAPHIE	9

INTRODUCTION

Les coliformes totaux sont des indicateurs de pollution d'origine organique dans les eaux de surface, les eaux souterraines, les sources d'approvisionnement ou les canalisations d'eau potable. Une eau traitée ou une eau souterraine bien protégée ne devraient pas contenir de coliformes totaux, mais leur présence ne constitue pas un risque immédiat pour la santé. Pour sa part, *Escherichia coli* (*E. coli*) est un indicateur de pollution d'origine fécale humaine ou animale. La présence de ce micro-organisme dans les eaux de consommation constitue un risque non négligeable pour la santé de ceux qui la consomment.

Le *Règlement sur la qualité de l'eau potable de 2001* (RQEP, gouvernement du Québec) a innové en autorisant l'utilisation de la bactérie *E. coli* comme indicateur sanitaire de la qualité de l'eau potable de même qu'en permettant l'utilisation de méthodes d'analyse de type présence/absence. Selon l'annexe 1 du RQEP, l'eau ne doit pas contenir de *E. coli*. Sa présence dans un seul échantillon, peu importe la quantité, entraîne automatiquement un avis d'ébullition. Pour les coliformes totaux, deux normes peuvent être appliquées selon la méthode d'analyse employée, mais la présence de coliformes totaux n'entraîne pas d'avis d'ébullition automatique. Lorsque la méthode d'analyse employée pour les coliformes totaux permet le dénombrement, la présence de plus de 10 UFC/100 ml ou la présence de coliformes totaux dans plus de 10 % des échantillons entraîne une non-conformité au RQEP. Lorsqu'une méthode présence/absence est utilisée, seule la norme concernant la présence des coliformes totaux est appliquée et peut entraîner une non-conformité. Un processus de retour à la conformité, incluant des analyses supplémentaires aux contrôles bactériologiques habituels, est alors mis en branle dans les jours suivant l'apparition de la contamination.

La méthode présence/absence avec le milieu de culture Colilert[®] peut être utilisée en remplacement des méthodes traditionnelles de filtration sur membrane en vue de l'application du RQEP. **Tout comme la méthode de filtration sur membrane employant le milieu Mi-agar, elle** permet l'analyse simultanée des coliformes totaux et de *E. coli* avec un seul volume d'échantillon de 100 ml. Elle est simple à réaliser et donne des résultats en 24 heures, puisqu'il n'est pas requis de procéder à des confirmations. De plus, le manufacturier indique que cette méthode n'est pas sensible à la présence d'un nombre élevé de bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives. Son principal inconvénient est l'impossibilité de faire des dénombrements, à moins d'utiliser une technique basée sur le principe du « nombre le plus probable ».

Cette méthode a été implantée dans les laboratoires du Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec pour vérifier simultanément la présence de *Escherichia coli* (générique) et de coliformes totaux dans des échantillons d'eau. Elle correspond à la méthode « 9223 B. ENZYME SUBSTRATE TEST » du manuel de référence *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA et WEF, 2012).

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode permet de détecter la présence de coliformes totaux ainsi que de *E. coli* dans les échantillons d'eau. Tandis que *E. coli* est utilisé comme indicateur de la présence possible de micro-organismes pathogènes, les coliformes totaux indiquent quant à eux la présence de contamination organique.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

Un volume de 100 ml d'échantillon d'eau est mélangé dans une bouteille stérile avec le milieu de culture Colilert[®]. Ce mélange est ensuite incubé pendant 24 h à 35 °C. Le milieu de culture Colilert[®] contient de l'ONPG (ortho-nitrophényl-β-D-galactopyranoside) et du MUG (4-méthyl-ombelliféryl-β-D-glucuronide). Lorsque des coliformes totaux sont présents dans l'échantillon, l'ONPG est utilisé par l'enzyme β-D-galactosidase, une enzyme spécifique au groupe des coliformes totaux. L'utilisation de l'ONPG provoque l'apparition d'une coloration jaune dans le milieu de culture. Lorsque *E. coli* est présent dans l'échantillon, le MUG est utilisé par l'enzyme β-D-glucuronidase, une enzyme spécifique à *E. coli*. L'utilisation du MUG amène une fluorescence bleue dans le milieu de culture lorsque ce dernier est éclairé avec une lumière fluorescente d'une longueur d'onde de 366 nm. Certaines bactéries qui ne sont pas des coliformes totaux ou *E. coli* peuvent aussi utiliser l'ONPG ou le MUG, mais le milieu Colilert[®] contient des inhibiteurs qui empêchent leur croissance.

Il est à noter que cette méthode sert à détecter le *E. coli* « générique » et qu'elle ne permet pas de détecter et d'identifier les souches pathogènes de *E. coli*, notamment la bactérie *E. coli* O157:H7 qui est β-D-glucuronidase négative.

3. FIABILITÉ

Les résultats de la validation de cette méthode sont disponibles pour les clients qui en font la demande.

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.

Certaines bouteilles peuvent apparaître fluorescentes en raison du type de plastique employé dans leur fabrication. Il est important de s'assurer que les bouteilles utilisées lors des analyses ne sont pas fluorescentes avant d'analyser des échantillons.

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Le prélèvement et la conservation des échantillons **prélevés dans le cadre du RQEP doivent être effectués selon les instructions de l'annexe 4 de ce règlement.**

Par ailleurs, une étude réalisée dans nos laboratoires sur les eaux de consommation a permis d'établir que le délai maximal admissible pour l'analyse est de 48 heures après le prélèvement et que l'échantillon devait 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 sont pas analysés dans les 4 heures qui suivent leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur analyse.

Les échantillons reçus congelés, dans des contenants non conformes ou selon des délais de prélèvement inacceptables (> 48 heures) ne doivent pas être analysés.

5. APPAREILLAGE

- 5.1. Bouteilles de 100 ml avec bouchon, transparentes et non fluorescentes sous rayons ultraviolets (contenants de plastique Idexx Laboratories[®])
- 5.2. Incubateur dont la température est ajustée à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$
- 5.3. Lampe à ultraviolets d'une longueur d'onde de 365 nm et d'une puissance de 6 W

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. Ampoules de milieu de culture Colilert[®], format P/A 100 ml, Idexx Laboratories[®]
- 6.2. Comparateur Colilert[®], format P/A 100 ml, Idexx Laboratories[®]

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillons, les recommandations des *Lignes directrices concernant les travaux analytiques 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.

Deux témoins (positif et négatif) peuvent être testés en même temps que les séries d'échantillons. Le témoin négatif contient de l'eau ultrapure de type 1 (ou de l'eau déminéralisée stérile) et le réactif Colilert[®], tandis que le témoin positif contient le réactif Colilert[®], de l'eau ultrapure de type 1 (ou de l'eau déminéralisée stérile), ainsi qu'une souche positive de coliformes totaux, de *E. coli* ou des deux. Le témoin positif peut aussi être fait à partir de 100 ml d'un échantillon positif.

7.1. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS

Tous les échantillons d'eau doivent être homogénéisés en agitant vigoureusement les bouteilles d'un mouvement vertical.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- Dans une bouteille stérile, transparente et non fluorescente, verser 100 ml de l'échantillon ainsi que le contenu de l'ampoule de milieu de culture (cf. 6.1).
- Fermer et agiter jusqu'à dissolution complète du milieu de culture.
- Incuber pendant 24 heures (maximum de 28 heures) à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$.

7.3. OBSERVATION DES RÉSULTATS

- Observer les bouteilles avec un éclairage normal pour vérifier la présence d'une coloration jaune.
 - L'absence de coloration jaune ou une coloration moins jaune que le comparateur (cf. 6.2) indique l'absence de coliformes totaux et de *E. coli* dans l'échantillon.
 - Une coloration égale ou plus jaune que le comparateur (cf. 6.2) indique la présence de coliformes totaux dans l'échantillon.
- Observer ensuite les bouteilles avec un éclairage fluorescent (cf. 5.3) placé à environ 13 cm de la bouteille et orienté vers cette dernière dans la direction opposée aux yeux de l'observateur. Effectuer cette observation dans l'obscurité lorsque la fluorescence n'est pas évidente.
 - Une coloration jaune et une fluorescence égale ou supérieure à celle du comparateur (cf. 6.2) indique la présence de *E. coli* dans l'échantillon.
- Les résultats Colilert[®] sont définitifs après une période d'incubation de 24 – 28 heures.
- Un résultat positif apparaissant avant une durée d'incubation de 24 heures est valide.
- Un résultat négatif après 28 heures est valide.

7.4. CONFIRMATION

La confirmation des échantillons n'est pas requise.

8. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Présence ou **absence** de coliformes totaux, de *E. coli* ou des deux dans un volume de 100 ml de l'échantillon analysé.

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les témoins négatif et positif doivent donner les résultats attendus.

Toutes les exigences précisées dans le document DR-12-SCA-02, intitulé *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, doivent être respectées.

10. BIBLIOGRAPHIE

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd Edition, 2012.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, DR-12-SCA-02, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Édition courante.

[http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/PALA/DR12SCA02_lignes_dir_micro.pdf]

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. *Règlement sur la qualité de l'eau potable*, c. Q-2, r. 40, Éditeur officiel du Québec.

[http://www2.publicationsduquebec.gouv.qc.ca/dynamicSearch/telecharge.php?type=3&file=/Q_2/Q2R40.HTM]

IDEXX LABORATORIES INC. *Colilert*[®], 06-01701-04, Feuillelet d'instructions fourni avec le produit, 2013.

MANAFI, M. *New developments in chromogenic and fluorogenic culture media*, Int. J. Food Microbiol., 60, p. 205-218, 2000.