

Méthode d'analyse

MA. 700 – Ent-mEI
2026-06-11 (révision 2)

Recherche et dénombrement des entérocoques :
méthode par filtration sur membrane sur milieu
mEI

Coordination et rédaction

Cette publication a été réalisée par le Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) du ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs (MELCCFP). Elle a été produite par la Direction des communications du MELCCFP.

Renseignements

Téléphone : 418 521-3830
1 800 561-1616 (sans frais)

Formulaire : www.environnement.gouv.qc.ca/formulaires/renseignements.asp

Internet : Quebec.ca

Dépôt légal – 2026

Bibliothèque et Archives nationales du Québec

ISBN : 978-2-555-04194-3 (PDF)

Tous droits réservés pour tous les pays.

© Gouvernement du Québec – 2026

Table des matières

| | |
|--|-----|
| Table des matières | i |
| Liste des tableaux | ii |
| Avant-propos | iii |
| 1.Domaine d'application | 1 |
| 2.Principe et théorie | 2 |
| 3.Interférence | 2 |
| 4.Conservation | 3 |
| 5.Matériel et appareillage | 3 |
| 6.Réactifs et milieux de culture | 4 |
| 7.Protocole d'analyse | 8 |
| 7.1Préparation des échantillons | 8 |
| 7.2Analyse des échantillons | 8 |
| 7.3Observation des résultats | 9 |
| 7.4Confirmation | 10 |
| 8.Calcul et expression des résultats | 13 |
| 8.1Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification | 14 |
| 8.2Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification | 15 |
| 9.Critères d'acceptabilité | 16 |
| 10.Références bibliographiques | 17 |
| Annexe 1 – Schéma du protocole de confirmation | 19 |
| Annexe 2 – Analyse des échantillons solides : précisions | 20 |
| A2-4 Prélèvement d'échantillons solides | 20 |
| A2-5 Matériel et appareillage spécifiques à l'analyse d'échantillons solides | 20 |
| A2-6 Réactifs et milieux de culture | 20 |
| A2-7 Protocole d'analyse d'échantillons solides | 21 |

Liste des tableaux

Tableau 1 : Volume à analyser selon la provenance de l'échantillon _____ 9

Tableau 2 : Interprétation des résultats de confirmation _____ 12

Tableau 3 : Calculs pour un échantillon présentant plusieurs morphotypes _____ 14

Avant-propos

La présente méthode est celle qui est actuellement en vigueur au Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ) pour l'analyse des entérocoques.

ATTENTION

Les sections mises en évidence dans un encadré comme celui-ci doivent être appliquées telles quelles puisqu'il s'agit de prescriptions.

1. Domaine d'application

Cette méthode sert à dénombrer les entérocoques par filtration sur membrane et s'applique aux eaux usées, aux eaux souterraines, aux eaux de surface (dont les eaux utilisées à des fins récréatives) et aux eaux de consommation¹.

La présence d'entérocoques d'origine fécale est généralement associée à celle des coliformes thermotolérants (fécaux), bien que ces derniers soient moins résistants au milieu naturel et à la désinfection (Byappanahalli et coll., 2012). Les entérocoques sont retrouvés dans les fèces d'animaux ou d'humains à des concentrations de l'ordre de 10^6 à 10^7 cellules/g (Santé Canada, 2023b).

Il existe également des entérocoques d'origine non fécale provenant de matières végétales, du sol et des insectes, et non associés à la présence des coliformes thermotolérants. Les entérocoques sont tout de même considérés comme des indicateurs d'une contamination d'origine fécale et leur présence indique un risque de présence de microorganismes pathogènes (Byappanahalli et coll., 2012; DEPES, 2024; Santé Canada, 2020). Ces microorganismes sont des bactéries sphériques, à Gram positif, catalase négative et anaérobies facultatives. Ils sont, entre autres, définis par leur capacité à hydrolyser l'esculine en présence de bile.

Aussi, le Règlement sur la qualité de l'eau potable ([RQEP](#)) contient un critère pour les entérocoques. On y mentionne que l'eau ne doit contenir aucun entérocoque. Leur présence dans un échantillon, peu importe la quantité, entraîne automatiquement un avis d'ébullition. L'analyse des entérocoques est également obligatoire dans certaines situations, comme pour le contrôle de l'eau brute souterraine (DEPES, 2024). Enfin, l'analyse des entérocoques est prévue pour la vérification des eaux récréatives (Santé Canada, 2023a, 2024). Les entérocoques apparaissant plus résistants aux sels que ne le sont les coliformes thermotolérants ou *E. coli* (Santé Canada, 2023b et références incluses), ils semblent mieux indiqués pour vérifier la qualité des eaux salées de baignade.

Cette méthode de filtration sur membrane est inspirée de la méthode suivante : « *Method 1600.1: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane-Enterococcus Indoxyl-β-D-Glucoside Agar (mEI)* » (U.S. EPA, 2023). Une méthode similaire est également retrouvée dans le manuel de référence « *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* » (méthode 9230C; APHA, AWWA et WEF, 2023).

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

Pour cette méthode, les limites de quantification par membrane, inférieure et supérieure, sont respectivement de 20 et 60 UFC d'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 sur l'ensemble des membranes analysées, et que cette croissance empêche le décompte ou la distinction claire des colonies retrouvées, le résultat final peut être non défini ou non quantifiable. Il est alors rapporté de la façon suivante :

TNI : colonies trop nombreuses pour être identifiées.

¹ Des échantillons de sols, de boues, de déchets solides et de sédiments peuvent aussi être analysés à l'aide de cette méthode. Consulter l'annexe 2 pour les détails supplémentaires se rapportant spécifiquement aux analyses de ces matrices.

2. Principe et théorie

La technique de la membrane filtrante consiste à recueillir à la surface d'une membrane filtrante stérile les bactéries recherchées dans un échantillon, à les identifier et à les énumérer. Les eaux usées doivent faire l'objet de dilutions et les échantillons solides doivent être mis en suspension et dilués dans un tampon phosphate avant l'analyse. Pour l'analyse des entérocoques, il s'agit de filtrer à travers une membrane d'une porosité de $0,45\ \mu\text{m}$ un volume déterminé de l'échantillon et d'incuber ensuite cette membrane pendant 24 ± 2 heures à $41,0 \pm 0,5\ ^\circ\text{C}$ sur une gélose mEI. Dans ces conditions, les entérocoques forment des colonies d'un diamètre $\geq 0,5\ \text{mm}$ avec un halo bleu.

La sélectivité du milieu mEI est liée à la présence d'azoture de sodium, qui inhibe la croissance des bactéries à Gram négatif. Le milieu mEI contient aussi le chromogène indoxyl- β -D-glucoside qui est utilisé par les bactéries entérocoques β -D-glucosidase positives pour produire un complexe insoluble bleu indigo qui se diffuse dans le milieu environnant résultant en un halo bleu autour de la colonie (U.S. EPA, 2023; Zimbardo et coll., 2009). Cette réaction permet d'énumérer et d'identifier les entérocoques de façon présomptive.

La présence d'entérocoques est par la suite vérifiée par une réaction négative à l'épreuve de la catalase, par l'hydrolyse de la bile esculine en milieu gélosé, et par des réactions positives de croissance en bouillon infusion cœur-cerveau à $45,0 \pm 0,5\ ^\circ\text{C}$ et en bouillon infusion cœur-cerveau avec NaCl 6,5 % à $35,0 \pm 0,5\ ^\circ\text{C}$ et en milieu gélosé. Dans certains cas, l'étape de confirmation doit être complétée par l'utilisation d'un système biochimique d'identification. La confirmation peut également être établie par une analyse par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) validée.

3. Interférence

Les bouteilles d'échantillonnage de 250 ml remplies au maximum 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 donc faire l'objet d'une remarque à cet effet dans le rapport d'analyse.

La présence de matières en suspension (alumine, argile, substances ferrugineuses, etc.) peut nuire à la filtration en colmatant la membrane. Les matières en suspension accumulées sur la membrane peuvent également entraver l'observation des colonies en masquant ou en inhibant la croissance des entérocoques. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée afin de filtrer le volume d'échantillon requis.

La gélose mEI doit être conservée à environ $4\ ^\circ\text{C}$ à l'abri de la lumière pendant une période d'entreposage maximale de deux semaines. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une diminution appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu. Aussi, l'exposition à la lumière peut détruire le chromogène.

Les bactéries ne doivent pas être en suspension dans l'eau de dilution pendant plus de 30 minutes à la température ambiante, car il peut en résulter une variation de la population initiale.

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

Le suivi de la performance de la méthode réalisé au CEAEQ montre un taux de faux négatifs élevé toutes matrices confondues (taux moyen de faux négatifs d'environ 55 %). Par exemple, les colonies d'un diamètre inférieur à $0,5\ \text{mm}$ et présentant un halo bleu, qui sont catégorisées atypiques selon cette méthode, se révèlent très souvent être des entérocoques. De la même façon, des colonies rouges ou

rosées d'un diamètre $\geq 0,5$ mm et sans halo bleu peuvent correspondre à des faux négatifs dans des échantillons d'eaux usées, d'après la méthode 1600.1 (U.S. EPA, 2023). La confirmation des colonies atypiques est donc nécessaire dans un contexte d'eau de consommation.

Le suivi de la performance de la méthode réalisé au CEAEQ (toutes matrices confondues) montre un taux moyen de faux positifs d'environ 8 %. La confirmation des colonies typiques est recommandée dans un contexte d'eau de consommation.

4. Conservation

Le prélèvement et la conservation des échantillons relatifs à l'application du RQEP doivent respecter les indications de l'annexe 4 de ce règlement.

Le délai maximal admissible pour l'analyse est de 48 heures après le prélèvement et l'échantillon doit avoir été préservé au frais, mais non congelé (environnement d'environ 4 °C) à l'aide de blocs réfrigérants. Les blocs réfrigérants ne devraient pas être en contact direct avec l'échantillon.

Selon le contexte pour lequel l'analyse est requise, un volume minimal de 100 ml peut être requis.

Les échantillons d'eau sont prélevés en respectant toutes les conditions d'asepsie dans des contenants d'une capacité d'environ 250 ml, stériles et non toxiques pour les bactéries, de verre ou de plastique à large ouverture, en laissant un espace d'air d'au moins 2,5 cm entre la surface du liquide et le bouchon.

De plus, les contenants utilisés pour le prélèvement des échantillons d'eau potentiellement chlorée, notamment pour l'eau potable, doivent contenir une solution de thiosulfate de sodium ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) dont la concentration finale est d'au moins 100 mg/l dans l'échantillon. Une telle concentration est suffisante pour neutraliser jusqu'à environ 15 mg/l de chlore résiduel (APHA, AWWA et WEF, 2023). Le thiosulfate de sodium agit comme agent neutralisant du chlore résiduel qui pourrait être présent dans l'eau.

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. Matériel et appareillage

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant et une procédure de lavage adéquate est de rigueur.

Seuls les équipements spécifiques à cette méthode sont mentionnés ici. Les autres articles à utiliser, disponibles dans un laboratoire de microbiologie, sont indiqués dans chacune des sections correspondantes.

Liste 1 : Matériel et appareillage

1. Membranes filtrantes stériles quadrillées en mixture d'ester de cellulose, de porosité de 0,45 μm et de 47 mm de diamètre
2. Incubateur dont la température est ajustée à 41,0 $\pm 0,5$ °C
3. Incubateur dont la température est ajustée à 35,0 $\pm 0,5$ °C

4. Incubateur dont la température est ajustée à $45,0 \pm 0,5$ °C

6. Réactifs et milieux de culture

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité ACS, à moins d'indication contraire. Les marques de commerce indiquées ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement. Les réactifs équivalents d'un autre fabricant peuvent également être utilisés.

L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultrapure.

À moins d'indication contraire, les solutions sont conservées à température ambiante.

Liste 2 : Réactifs et milieux de culture

1. Hydroxyde de sodium, NaOH (n° CAS 1310-73-2)
Solution commerciale 10 N
2. Acide chlorhydrique, HCl (n° CAS 7647-01-0)
Solution commerciale 1 N
3. Phosphate de potassium anhydre, KH_2PO_4 (n° CAS 7778-77-0)
4. Solutions d'hydroxyde de sodium (NaOH) 1 N et 0,1 N
NaOH 1 N : ajouter 100 ml de la solution commerciale de NaOH 10 N dans environ 700 ml d'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.
NaOH 0,1 N : ajouter 10 ml de NaOH 10 N dans environ 700 ml d'eau et compléter à 1 000 ml avec de l'eau.
Il est également possible de se procurer les solutions commerciales prêtes à l'emploi.
5. Solution d'acide nalidixique
Ajouter 0,24 g de sel de sodium d'acide nalidixique (n° CAS 3374-05-8) à 5 ml d'eau ultrapure. Ajouter quelques gouttes de NaOH 0,1 N pour la dissolution complète. Bien mélanger à l'aide d'un vortex. Stériliser par filtration en utilisant une seringue équipée d'un filtre de 0,22 μm . Préparer une solution fraîche à chaque utilisation.
6. Solution de chlorure de triphényltétrazolium
Ajouter 0,02 g de chlorure de triphényltétrazolium (n° CAS 298-96-4) à 2 ml d'eau ultrapure et mélanger avec un vortex jusqu'à dissolution. Stériliser par filtration en utilisant une seringue équipée d'un filtre de 0,22 μm . Préparer une solution fraîche à chaque utilisation.
7. Gélose mEI
Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 72,0 g/l et sa formulation telle que présentée par le fabricant BD Difco™ est la suivante.

Formule en grammes par litre d'eau :

| | |
|------------------------------------|--------|
| Peptone | 10,0 g |
| Chlorure de sodium | 15,0 g |
| Esculine..... | 1,0 g |
| Cycloheximide | 0,05 g |
| Azoture de sodium..... | 0,15 g |
| Extrait de levure | 30,0 g |
| Indoxyl- β -D-glucoside..... | 0,75 g |
| Agar..... | 15,0 g |

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 72,0 g de milieu déshydraté et ajouter 1 000 ml d'eau. Sur une plaque chauffante et avec un agitateur magnétique, porter le milieu à ébullition sous agitation constante pour en permettre la dissolution complète. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes et laisser refroidir entre 45 °C et 50 °C dans un bain-marie. Dans les conditions d'asepsie nécessaires, ajouter 5 ml de la solution d'acide nalidixique et 2 ml de la solution de chlorure de triphényltétrazolium au milieu mEI, et mélanger uniformément. Le pH final doit être de 7,1 \pm 0,2 à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N ou de NaOH 1 N. Répartir en volumes de 4,0 ml dans des boîtes de Petri de 49,0 mm x 9,0 mm.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de deux semaines.

8. 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 telle que présentée par le fabricant BD BBL™ est la suivante.

Formule en grammes par litre d'eau :

| | |
|--|--------|
| Infusion cœur-cervelle (matières solides)..... | 8,0 g |
| Digestion peptique de tissu animal | 5,0 g |
| Digestion pancréatique de caséine..... | 16,0 g |
| Dextrose | 2,0 g |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 g |
| Phosphate disodique..... | 2,5 g |
| Agar..... | 13,5 g |

Note : La gélose nutritive ou la gélose trypticase de soya peuvent aussi être utilisées comme milieux non sélectifs de propagation.

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 52,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Sur une plaque chauffante et avec un agitateur magnétique, porter le milieu à ébullition sous agitation constante pour en permettre la dissolution complète. 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 ou de NaOH 1 N. Répartir en volumes d'environ 8 ml dans des tubes de 16 mm x 125 mm. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes et laisser solidifier en position oblique pour former des géloses inclinées.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de quatre semaines.

9. Gélose bile esculine

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 43,5 g/l et sa formulation telle que présentée par le fabricant BD BBL™ est la suivante.

Formule en grammes par litre d'eau :

| | |
|--|--------|
| Extrait de bœuf..... | 3,0 g |
| Digestion pancréatique de gélatine | 5,0 g |
| Esculine..... | 1,0 g |
| Bile de bœuf..... | 20,0 g |
| Citrate ferrique | 0,5 g |
| Agar..... | 14,0 g |

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 43,5 g du milieu gélose bile esculine déshydraté et le dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Sur une plaque chauffante et avec un agitateur magnétique, porter le milieu à ébullition sous agitation constante pour en permettre la dissolution complète. Le pH doit être de $6,8 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N ou de NaOH 1 N. Répartir en volumes de 100 ml dans des bouteilles à bouchon vissant. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Pour un usage immédiat, répartir aseptiquement dans des boîtes de Petri de 100 mm x 15 mm. Pour un usage ultérieur, faire fondre au préalable le milieu figé et conservé en bouteille dans un bain d'eau bouillante ou au micro-ondes.

Le milieu en bouteille se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de huit semaines.

10. 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 telle que présentée par le fabricant BD BBL™ est la suivante.

Formule en grammes par litre d'eau :

| | |
|--|--------|
| Infusion cœur-cervele (matières solides) | 6,0 g |
| Digestion peptique de tissu animal | 6,0 g |
| Digestion pancréatique de gélatine..... | 14,5 g |
| Dextrose | 3,0 g |
| Chlorure de sodium..... | 5,0 g |
| Phosphate disodique | 2,5 g |

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 37,0 g du milieu bouillon infusion cœur-cervele déshydraté et le dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Sur une plaque chauffante et avec un agitateur magnétique, porter le milieu à ébullition sous agitation constante pour en permettre la dissolution complète. 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 ou de NaOH 1 N. Répartir en volumes de 5 ml dans des tubes de 16 mm x 125 mm avec bouchons. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de six semaines.

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

Le milieu de base bouillon infusion cœur-cervele est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 37,0 g/l et sa formulation telle que présentée par le fabricant BD BBL™ est présentée au point 10.

Dans un erlenmeyer de volume approprié, peser 37,0 g du milieu bouillon infusion cœur-cervelle déshydraté et 60 g de NaCl et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Sur une plaque chauffante et avec un agitateur magnétique, porter le milieu à ébullition sous agitation constante pour en permettre la dissolution complète. 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 ou de NaOH 1 N. Répartir en volumes de 5 ml dans des tubes de 16 mm x 125 mm avec bouchons. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Le milieu se conserve à environ 4 °C à l'obscurité pendant un maximum de six semaines.

12. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH_2PO_4 anhydre dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 à 25 °C avec une solution de NaOH 1 N et combler à 1 000 ml avec de l'eau. Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes ou par filtration (membrane de 0,2 μm).

Cette solution se conserve pendant un maximum de trois mois à environ 4 °C.

13. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate par litre d'eau. Le pH final doit être de $7,2 \pm 0,5$ à 25 °C. Répartir dans des bouteilles de polypropylène ou des flacons laveurs et stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

L'eau tamponnée de rinçage se conserve pendant un maximum de trois mois à environ 4 °C.

14. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate par litre d'eau. Le pH final doit être de $7,2 \pm 0,5$ à 25 °C. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de 90 ± 2 ml après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes.

Des tubes de 9 ml d'eau de dilution peuvent aussi être utilisés pour les échantillons liquides. Répartir de façon stérile de l'eau tamponnée stérile dans des tubes préalablement autoclavés de 18 mm x 125 mm avec bouchons. Le volume final doit être de $9,0 \pm 0,2$ ml.

L'eau tamponnée de dilution se conserve pendant un maximum de trois mois à environ 4 °C.

15. Peroxyde d'hydrogène 30 %, H_2O_2 (n° CAS 7722-84-1)

Conserver à environ 4 °C dans le contenant d'origine ou dans un contenant foncé ou opaque.

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

Cette solution est disponible dans le commerce. Il est possible de préparer la solution de la façon suivante :

Ajouter 3 ml de peroxyde d'hydrogène 30 % à 27 ml d'eau. Cette solution se conserve à environ 4 °C pendant un maximum d'une semaine.

17. Système biochimique d'identification approprié pour l'identification des entérocoques

Exemples : Microscan® Positive ID Panel Type 3 (PID3), référence : B1017-221; API® 20 Strep, référence : 20600; système Vitek®.

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 avec ces lignes directrices.

La stérilisation des entonnoirs et supports de filtre (aux rayons ultraviolets ou par autoclavage) est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau. De plus, il est recommandé que ces équipements soient stérilisés aux rayons ultraviolets après toute interruption de travail supérieure à 15 minutes.

Le lavage et la stérilisation à l'autoclave de l'équipement de filtration sont indispensables après l'analyse d'échantillons fortement contaminés (ex. : eaux usées) et avant de poursuivre l'analyse sur des échantillons peu contaminés (ex. : eau souterraine). Ainsi, il ne faut pas, par exemple, analyser une eau souterraine après avoir analysé une eau de surface sans avoir lavé et stérilisé à l'autoclave l'équipement de filtration.

L'absence d'entérocoques dans chaque entonnoir et support de filtre doit être vérifiée avant chaque série d'analyses d'eau et tous les 10 échantillons. Pour ce faire, rincer la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage, filtrer sur une membrane stérile et incubé pendant 24 ± 2 heures à $41,0 \pm 0,5$ °C sur le milieu mEI. La fréquence de ce contrôle peut être augmentée lors de l'analyse d'eau fortement contaminée.

7.1 Préparation des échantillons

Tous les échantillons liquides doivent être homogénéisés en agitant vigoureusement les bouteilles d'un mouvement vertical, environ 25 fois.

Les échantillons soupçonnés d'être fortement contaminés (ex. : eaux usées) doivent être traités de façon à obtenir, pour un volume donné d'échantillon, entre 20 et 60 colonies sur la membrane.

Pour cela, des dilutions sériées sont effectuées de la façon suivante :

- En conditions aseptiques, pipetter 1 ml d'échantillon d'eau dans 9 ml d'eau tamponnée de dilution (1/10).
- Mélanger les tubes d'eau tamponnée de dilution contenant les échantillons à l'aide d'un vortex.
- Répéter jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (1/100, 1/1 000, 1/10 000, etc.).
- Changer de pipette ou d'embout entre chaque dilution.

7.2 Analyse des échantillons

- 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.

Pour chacun des volumes ou chacune des dilutions à analyser de l'échantillon :

- Prendre une membrane filtrante stérile près du bord à l'aide d'une pince stérilisée par flambage à l'alcool et la déposer ensuite sur le support de filtre.
- Placer l'entonnoir sur le support de façon à en assurer l'étanchéité.
- Verser dans l'entonnoir les volumes requis préalablement homogénéisés, selon la nature de l'échantillon analysé (tableau 1).

- Pour les volumes de 10 ml ou moins, introduire de 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage dans l'entonnoir de filtration. Ensuite, homogénéiser la portion d'échantillon à analyser, puis prélever, à l'aide d'une pipette ou d'une micropipette munie d'un embout stérile, le volume désiré. Laisser couler l'échantillon en appuyant le bout de la pipette ou de l'embout sur l'épaulement interne de l'entonnoir. Éjecter la dernière goutte de la pipette ou de l'embout.

Tableau 1 : Volume à analyser selon la provenance de l'échantillon

| Provenance | Volume 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, 1 et 1 ml de chacune des dilutions |
| Boues d'eaux usées industrielles, municipales, domestiques, etc. Sols, déchets solides et sédiments | 1 ml de chacune des dilutions |

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

- Faire le vide pour filtrer l'échantillon.
- À l'aide d'un flacon laveur, rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec une quantité de 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile.
- Retirer l'entonnoir et déposer la membrane filtrante à l'aide d'une pince stérile sur une gélose mEI.

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 Petri le numéro de l'échantillon et le volume filtré.
- Placer rapidement les boîtes de Petri en position inversée (l'inversion des boîtes de Petri empêche la condensation de se déposer sur les membranes) dans un incubateur² à 41,0 ±0,5 °C pendant 24 ±2 heures.

7.3 Observation des résultats

Une fois la période d'incubation terminée, l'observation des membranes doit être effectuée le plus tôt possible après leur sortie de l'incubateur.

Sur le milieu mEI, les colonies typiques des entérocoques ont un diamètre ≥0,5 mm et forment un halo bleu autour de la colonie. Lors de la mesure de la colonie, la dimension du halo n'est pas incluse.

² Si un bain-marie est prévu, il faut alors placer les boîtes de Petri dans des sacs en polyéthylène, les fermer avec le scelleur, puis les immerger complètement en position inversée dans le bain-marie à 41,0 ±0,5 °C pendant 24 ±2 heures.

Les observations peuvent être effectuées à l'aide d'un stéréomicroscope à pouvoir de grossissement de 10 à 15 X.

Compter, puis inscrire sur la feuille de travail, le nombre de colonies typiques et atypiques trouvées sur chacune des membranes correspondant au volume d'eau filtrée.

Reporter ensuite le résultat de colonies typiques par 100 ml, selon les indications de la section 8.

Si des confirmations sont réalisées, consigner le nombre de colonies typiques et atypiques dénombrées **par morphotype** ainsi que la quantité vérifiée par morphotype (section suivante).

7.4 Confirmation

La méthode décrite précédemment est une méthode de dénombrement et d'identification présumée des entérocoques. Cette désignation signifie qu'on présume que les bactéries isolées correspondent à la bactérie recherchée à l'aide d'une seule réaction biochimique caractéristique. Dans certains cas, cette réaction unique peut produire des faux positifs ou des faux négatifs qu'on doit éliminer à l'aide d'un dépistage biochimique plus complet. Cette étape de la méthode est celle de la confirmation.

Dans cette méthode, les entérocoques sont vérifiés par les épreuves combinées de la catalase, de l'hydrolyse de la bile esculine, de la croissance en bouillon infusion cœur-cerveille à 45 °C et de la croissance en bouillon infusion cœur-cerveille avec NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C. Dans certains cas, l'utilisation supplémentaire d'un système biochimique d'identification est nécessaire.

Lorsque l'étape de confirmation est réalisée, cette confirmation doit être effectuée sur au moins 10 % des colonies suspectes dénombrées, jusqu'à concurrence de cinq colonies, pour chacun des morphotypes, sur la ou les membranes servant au calcul final. Si le dénombrement de l'ensemble des morphotypes est inférieur à 20 colonies, deux colonies doivent être confirmées au minimum pour l'échantillon. Toutes les morphologies coloniales doivent être incluses dans cette étape de confirmation.

Note : Le taux de faux négatifs pour cette méthode peut être élevé. Ainsi, en l'absence de colonies typiques, les colonies atypiques selon la méthode doivent suivre les étapes de confirmation, si elles proviennent d'un échantillon d'eau de consommation.

La confirmation des colonies typiques est recommandée pour un échantillon d'eau de consommation.

7.4.1 Propagation des colonies à vérifier

Prélever une colonie bien isolée³ sur la gélose mEI et effectuer une propagation de la colonie par étalement sur gélose inclinée infusion cœur-cerveille. Pour ce faire, l'utilisation d'une aiguille à inoculation est à privilégier.

Incuber à 35,0 ± 0,5 °C pendant un minimum de 18 à 24 heures. Si aucune croissance n'est observée après ce temps, prolonger l'incubation jusqu'à 48 ± 3 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'une anse d'inoculation qui n'interfère pas avec une réaction au peroxyde

³ Si aucune colonie n'apparaît suffisamment isolée pour la confirmation, il faut procéder à un isolement par striation sur le milieu mEI au préalable.

d'hydrogène 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).

Un résultat positif consiste en l'apparition immédiate d'effervescence causée par la décomposition du peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène par l'enzyme catalase.

Les entérocoques montrent un résultat négatif à l'épreuve de la catalase.

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

Inoculer un tube de bouillon infusion cœur-cervelle à partir de la croissance présente sur la gélose de propagation. Incuber à $35,0 \pm 0,5$ °C pendant 24 ± 2 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-cervelleensemencé (point 7.4.3), prélever un inoculum à l'aide d'une anse d'inoculation. Ensemencer sur une gélose bile esculine et incuber à $35,0 \pm 0,5$ °C pendant 24 à 48 heures. Une coloration brune ou noire de la croissance ou de la zone périphérique 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 heures, prélever un inoculum à l'aide d'une anse d'inoculation. Inoculer 5 ml d'un bouillon infusion cœur-cervelle. Incuber à $45,0 \pm 0,5$ °C pour une durée de 48 ± 3 heures. Une augmentation de la turbidité indique qu'il y a croissance et démontre la présence possible d'entérocoques. Puisque l'incubation se fait en absence d'agitation, les bactéries peuvent être déposées au fond du tube après l'incubation. Le milieu apparaît alors limpide. Si tel est le cas, agiter le tube brièvement à l'aide d'un vortex pour remettre en suspension les bactéries et ainsi éviter les erreurs d'interprétation.

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

À partir du bouillon infusion cœur-cervelle de 24 heures, prélever un inoculum à l'aide d'une anse d'inoculation. Inoculer 5 ml d'un bouillon infusion cœur-cervelle avec NaCl 6,5 % (P/V). Incuber à $35,0 \pm 0,5$ °C pour une durée de 48 ± 3 heures. Une augmentation de la turbidité indique qu'il y a croissance et démontre la présence possible d'entérocoques. Puisque l'incubation se fait en absence d'agitation, les bactéries peuvent être déposées au fond du tube après l'incubation. Le milieu apparaît alors limpide. Si tel est le cas, agiter le tube brièvement à l'aide d'un vortex pour remettre en suspension les bactéries et ainsi éviter les erreurs d'interprétation.

7.4.7 Système biochimique d'identification

L'utilisation d'un système biochimique d'identification est requise dans certaines situations pour compléter la confirmation (voir la section 7.4.8).

Utiliser le système biochimique d'identification selon les indications du fabricant.

Note : La coloration de Gram (ou un test de KOH et montage humide) devrait être effectuée avant l'utilisation du système biochimique d'identification.

7.4.8 Interprétation des tests de confirmation

Toutes les conclusions pouvant être tirées des résultats obtenus à la suite des tests de confirmation sont répertoriées dans le **tableau 2**.

Tableau 2 : Interprétation des résultats de confirmation

| Cas | Catalase | Bile esculine | BHIB* 45 °C | BHIB* NaCl 6,5 % (P/V) 35 °C | Interprétation |
|-----|----------|---------------|----------------|------------------------------------|--|
| 1 | - | + | + | + | Entérocoque confirmé |
| 2 | + | | | | Non-entérocoque |
| 3 | - | - | | | |
| 4 | - | + | + | - | Entérocoque possible; vérification supplémentaire nécessaire par système biochimique d'identification |
| 5 | - | + | - | + | |
| 6 | - | + | - | - | |

* : Bouillon infusion cœur-cervelle

- Cas 1 : Une colonie est confirmée entérocoque si elle répond aux critères suivants : une réaction négative à l'épreuve de la catalase, une réaction positive à l'hydrolyse de la bile esculine, à la croissance en bouillon infusion cœur-cervelle à 45 °C et à la croissance en bouillon infusion cœur-cervelle NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C.
- Cas 2 et 3 : Une colonie est confirmée non-entérocoque si la réaction à la catalase est positive ou que la réaction à la bile esculine est négative.
- Cas 4, 5 et 6 : Certaines espèces d'entérocoques (ex. : *E. avium*) peuvent ne pas se développer dans le bouillon infusion cœur-cervelle NaCl 6,5 % (P/V) à 35 °C, ou dans le bouillon infusion cœur-cervelle à 45 °C, ou dans aucun des deux (APHA et coll., 2017; Domig, K.J. et coll., 2003; données de suivi de performance de méthode interne au CEAEQ).

Si une colonie produit une réaction négative à l'épreuve de la catalase, une réaction positive à l'hydrolyse de la bile esculine et ne montre pas de croissance dans l'un ou l'autre ou dans les deux bouillons nutritifs précédemment nommés, il est nécessaire de poursuivre l'étape de confirmation à l'aide d'un système biochimique d'identification.

7.4.9 Autre test de confirmation

En remplacement des étapes 7.4.3 à 7.4.8, la confirmation des colonies à vérifier, qui ont été repiquées à l'étape 7.4.1, peut également se faire par une procédure utilisant la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) validée par le laboratoire.

7.4.10 Proportion de confirmation

Inscrire sur la feuille de travail le nombre et la proportion de colonies qui, selon la confirmation précédente, sont confirmées comme étant des entérocoques. Procéder au calcul du résultat final comme il est indiqué à la section 8.

8. Calcul et expression des résultats

Dans tous les cas, le résultat final d'entérocoques (présumés ou confirmés) est arrondi à deux valeurs significatives.

Entérocoques présumés

De façon générale, choisir la ou les membranes entre 20 et 60 colonies typiques et au maximum 200 colonies de toutes sortes. Exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 ml d'échantillon, selon l'équation générale suivante :

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

Si des dilutions sont utilisées, le volume de l'échantillon analysé est déterminé de la façon suivante :

La filtration de 1 ml de la dilution 1/10 correspond à 0,1 ml d'échantillon analysé. La filtration de 1 ml des dilutions sériées effectuées par la suite correspond à 0,01 ml, 0,001 ml, 0,0001 ml, etc., d'échantillon analysé.

Entérocoques confirmés

- Dans le cas où une confirmation est effectuée, procéder au calcul des entérocoques confirmés en intégrant chacune des proportions de confirmation selon les morphotypes observés pour la membrane filtrante choisie comme il est indiqué ci-après :

$$\text{Entérocoques confirmés UFC/100 ml} =$$

$$\frac{\left(\frac{\text{Nb A confirmées}}{\text{Nb A testées}} \times \text{Nb total A} \right) + \left(\frac{\text{Nb B confirmées}}{\text{Nb B testées}} \times \text{Nb total B} \right)}{\text{Volume d'échantillon analysé en ml}} \times 100$$

Où :

Nb : nombre de colonies

A, B, etc. : morphotypes dénombrés

- Dans le cas où la confirmation est effectuée en plus sur des colonies atypiques pour vérification, les colonies atypiques confirmées sont ajoutées au calcul final de la même façon, en considérant les différents morphotypes :

$$\text{Entérocoques confirmés UFC/100 ml} =$$

$$\frac{\left(\frac{\text{Nb A confirmées}}{\text{Nb A testées}} \times \text{Nb total A} \right) + \left(\frac{\text{Nb B confirmées}}{\text{Nb B testées}} \times \text{Nb total B} \right) + \frac{\text{Nb Aty confirmées}}{\text{Nb Aty testées}} \times \text{Nb Aty} + (\text{etc.})}{\text{Volume d'échantillon analysé en ml}} \times 100$$

Où :

Nb : nombre de colonies

A, B, etc. : morphotypes dénombrés

Aty : colonies atypiques (ex. : morphotype C) dénombrées

Exemple 1

Sur une membrane correspondant à un volume filtré de 10 ml, on dénombre 30 colonies typiques de morphologie « A », 9 colonies typiques de morphologie « B » et 20 colonies atypiques de morphologie « C ».

Pour l'échantillon, 3 colonies typiques de morphologie « A », 1 colonie typique de morphologie « B » et 2 colonies de morphologie « C » sont vérifiées pour confirmation.

Après les tests de confirmation, les 3 colonies de morphologie « A » sont des entérocoques, la colonie de morphologie « B » n'est pas un entérocoque et l'une des colonies atypiques de morphologie « C » est un entérocoque.

Le résultat des confirmations des colonies atypiques doit s'ajouter au résultat des colonies typiques.

Le tableau 3 en présente le détail complet.

Tableau 3 : Calculs pour un échantillon présentant plusieurs morphotypes

| | |
|---|--|
| Dénombrement des colonies typiques et atypiques sur la membrane de 10 ml | Colonies typiques : 30 de type A 9 de type B Colonies atypiques : 20 de type C |
| Résultat d'entérocoques présumés | $\frac{30 A + 9 B}{10 \text{ ml}} \times 100 = 390 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$ |
| Nombre de colonies à confirmer (10 % par morphotype jusqu'à concurrence de 5) | 3 de type A 1 de type B 2 de type C (atypiques) |
| Ajustement du résultat final : résultat d'entérocoques confirmés | $\frac{\frac{3}{3} \times 30 A + \frac{0}{1} \times 9 B + \frac{1}{2} \times 20 C}{10 \text{ ml}} \times 100 = 400 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$ |

Exemple 2

Un échantillon d'eau de consommation ne présente aucune colonie typique et présente 7 colonies atypiques de morphotype « A ». Pour cet échantillon, deux colonies au minimum doivent être confirmées.

8.1 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 60 colonies typiques.

Exemples :

- 1) Si des volumes filtrés de 50 ml, 10 ml et 1 ml d'un échantillon produisent respectivement des dénombrements de 110, 25 et 4 colonies typiques, choisir la membrane sur laquelle il y a 25 colonies typiques (volume de 10 ml) et calculer le résultat à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{25}{10} \times 100 = 250 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

- 2) Si des volumes filtrés de 50 ml, 10 ml et 1 ml d'un échantillon produisent respectivement les résultats 55, 20 et 1 colonies, choisir les membranes sur lesquelles il y a 55 et 20 colonies (50 ml et 10 ml) :

$$\frac{55 + 20}{50 + 10} \times 100 = 125 = 130 \text{ UFC/100 ml}$$

8.2 Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification

8.2.1 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 ensemencés 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 :

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

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

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

8.2.2 Dénombrement lorsqu'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.

Exemple :

Si des volumes filtrés de 50 ml, 10 ml et 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 :

$$\frac{1}{50} \times 100 = 2 \text{ UFC/100 ml}$$

Transmettre le résultat suivant : <2 UFC/100 ml

8.2.3 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 50 ml et 10 ml produisent respectivement les résultats TNI 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 et du plus faible volume d'échantillon filtré (10 ml) :

$$\frac{60}{10} \times 100 = 600 \text{ UFC/100 ml}$$

Transmettre le résultat suivant : >600 UFC/100 ml

9. Critères d'acceptabilité

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

Les contrôles de stérilité de l'équipement de filtration 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 41,0 ±0,5 °C pendant toute la durée de l'incubation.

10. Références bibliographiques

Note : Pour les références datées, seule l'édition citée s'applique. Pour les références non datées, la dernière édition du document de référence s'applique.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Dans* : Lipps, W.C., Braun-Howland, E.B., Baxter, T.E., eds. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 24th Edition, Washington, DC: APHA Press; 2023.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER ENVIRONMENT FEDERATION. *Dans* : Lipps, W.C., Braun-Howland, E.B., Baxter, T.E., eds. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 23rd Edition, Washington, DC: APHA Press; 2017.

BYAPPANAHALLI, M.N., NEVERS, M.B., KORAJKIC, A., STALEY, Z.R. et V.J. HARWOOD. « Enterococci in the environment ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76 (4): 685-706. 2012. DOI : 10.1128/MMBR.00023-12; PMID : 23204362; PMCID : PMC3510518.

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 de la Lutte contre les changements climatiques, édition courante.

DIRECTION DE L'EAU POTABLE ET DES EAUX SOUTERRAINES ET DE SURFACE. *Guide d'interprétation du Règlement sur la qualité de l'eau potable*, ministère de l'Environnement, de la Lutte contre les changements climatiques, de la Faune et des Parcs du Québec. 2024.
[\[https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/potable/reglement/guide_interpretation_RQEP.pdf\]](https://www.environnement.gouv.qc.ca/eau/potable/reglement/guide_interpretation_RQEP.pdf)

DOMIG, K.J., MAYER, H.K. et W. KNEIFEL. « Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 2. Pheno- and genotypic criteria ». *International Journal of Food Microbiology*, 88(2-3), 165-188. 2003.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. *Règlement sur la qualité de l'eau potable*, c. Q -2, r. 40, Éditeur officiel du Québec.
[\[https://www.legisquebec.gouv.qc.ca/fr/document/rc/q-2,%20r.%2040\]](https://www.legisquebec.gouv.qc.ca/fr/document/rc/q-2,%20r.%2040)

SANTÉ CANADA. *Conseils sur l'utilisation des entérocoques comme indicateur dans les sources d'approvisionnement en eau potable canadiennes*, Bureau de la qualité de l'eau et de l'air, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario). 2020.
[\[https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/publications/healthy-living/guidance-use-enterococci-indicator-canadian-drinking-water-supplies/enterococci-june-2020-fr.pdf\]](https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/publications/healthy-living/guidance-use-enterococci-indicator-canadian-drinking-water-supplies/enterococci-june-2020-fr.pdf)

SANTÉ CANADA. *Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada – Comprendre et gérer les risques dans les eaux récréatives*. Document technique. Santé Canada, Ottawa (Ontario). 2023a.
[\[https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/publications/healthy-living/guidelines-understanding-managing-risks-recreational-waters/recommandations-comprendre-gerer-risques-eaux-recreatives.pdf\]](https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/publications/healthy-living/guidelines-understanding-managing-risks-recreational-waters/recommandations-comprendre-gerer-risques-eaux-recreatives.pdf)

SANTÉ CANADA. *Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada – Indicateurs de contamination fécale*. Document technique. Santé Canada, Ottawa (Ontario). 2023b.

[<https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/services/publications/healthy-living/recreational-water-quality-guidelines-indicators-fecal-contamination/recommandations-sujet-qualite-eaux-utilisees-fins-recreatives-indicateurs-contamination-fecale.pdf>]

SANTÉ CANADA. *Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada*. Document de synthèse. Santé Canada, Ottawa (Ontario). 2024.

[<https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/publications/vie-saine/recommandations-sujet-qualite-eaux-utilisees-fins-recreatives-canada-document-synthese.html>]

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (U.S. EPA) OFFICE OF WATER (4303T), *Method 1600.1: Enterococci in Water by Membrane Filtration Using membrane-Enterococcus Indoxyl- β -D-Glucoside Agar (mEI)*, EPA 821-R-14-011, 2023.

ZIMBRO, M.J., POWER, D.A., MILLER, S.M., WILSON, G.E., et J.A. JOHNSON. *Difco & BBL Manual – Manual of microbiological culture media*, Second Edition. BD Diagnostics – Diagnostic Systems, 7 Loveton Circle Sparks, Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland 21152 USA. 2009.

Annexe 1 – Schéma du protocole de confirmation

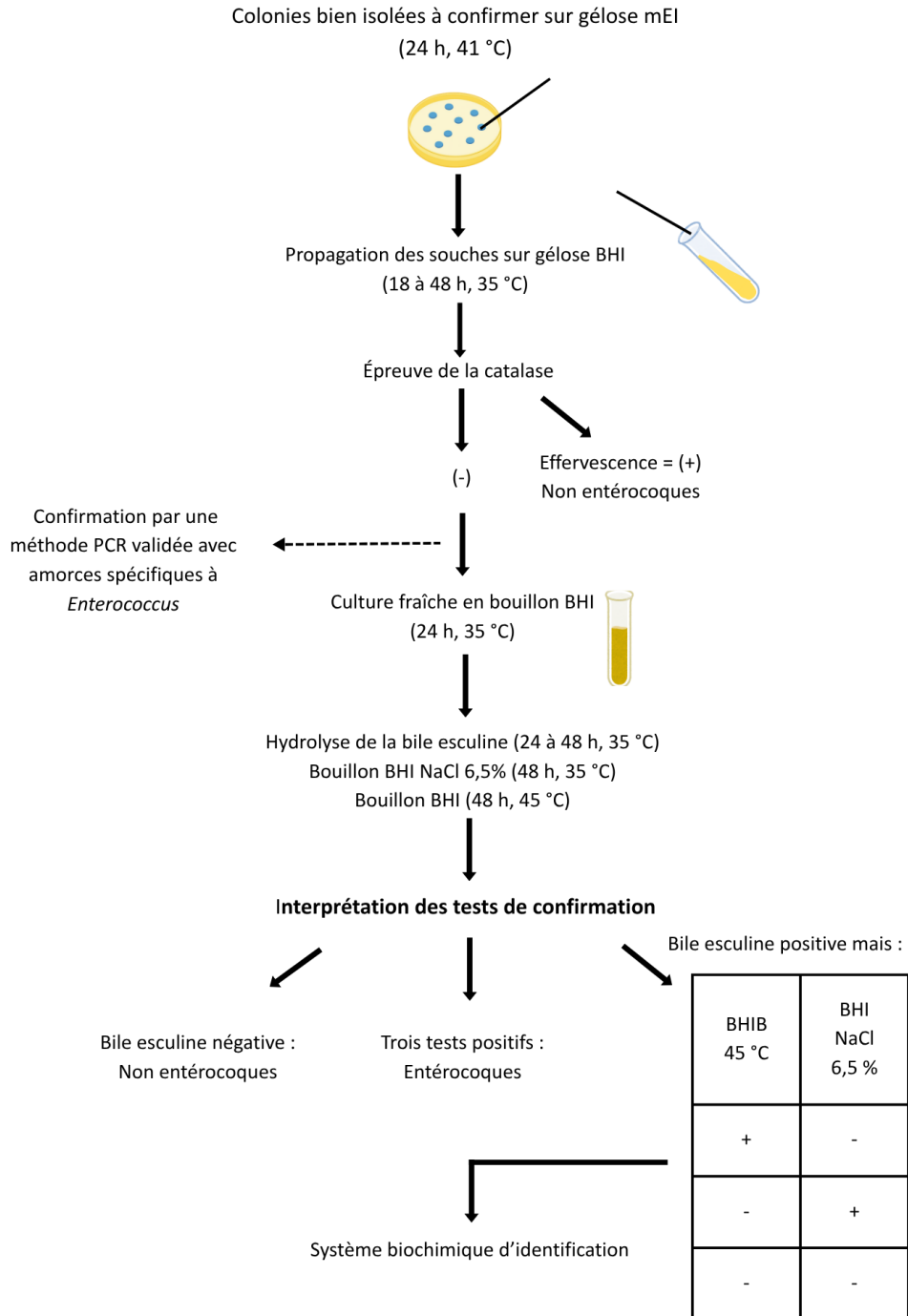


Figure 1 : Étapes de confirmation des colonies d'entérocoques présumés sur milieu mEI

Annexe 2 – Analyse des échantillons solides : précisions

La méthode décrite précédemment est prévue pour des échantillons d'eau. Cependant, pour des besoins particuliers, cette méthode peut aussi être adaptée pour l'analyse d'échantillons de sols, de boues, de déchets solides et de sédiments. Pour l'analyse de ces matrices, les consignes ci-après doivent être appliquées.

Pour le suivi, les sections indiquées correspondent aux mêmes sections de la présente méthode pour l'analyse d'échantillons d'eau.

A2-4 Prélèvement d'échantillons solides

En plus de suivre les indications précisées à la section 4 pour la conservation des échantillons, il faut prélever les échantillons solides et semi-solides dans un sac de type Ziploc® neuf, dans un sac Whirl-Pak® ou dans une bouteille de verre ou de plastique stérile à large ouverture fournie par le laboratoire. Un poids d'environ 50 g est requis pour l'analyse des entérocoques et pour la détermination de la siccité, quand cela est nécessaire.

A2-5 Matériel et appareillage spécifiques à l'analyse d'échantillons solides

Les marques de commerce indiquées ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement. Un modèle équivalent d'un autre fabricant peut également être utilisé.

Le matériel utilisé doit être exempt de toute trace de contaminant et une procédure de lavage adéquate est de rigueur.

Liste 3 : Matériel et appareillage supplémentaires

1. Mélangeur avec récipient approprié et stérile ou appareil de type Stomacher® avec sacs adaptés à l'appareil
2. Étuve réglée à environ 105 °C
3. Dessiccateur

A2-6 Réactifs et milieux de culture

Réactif supplémentaire :

1. Sulfate de calcium anhydre (ex. : Drierite) ou équivalent, comme dessiccatif

A2-7 Protocole d'analyse d'échantillons solides

A2-7.1 Préparation des échantillons solides

- Pour les échantillons de sols, de déchets solides, de sédiments ou de boues, 10 g d'échantillon sont prélevés et mis en suspension dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (dilution 1/10) avant de procéder à l'analyse. Si une plus grande quantité est nécessaire pour l'analyse d'un autre paramètre à réaliser sur le même échantillon, la quantité la plus élevée exigée doit être prélevée. Il faut alors ajuster les volumes d'eau tamponnée de dilution en conséquence pour effectuer les dilutions (ex. : 50 g à diluer dans 450 ml d'eau tamponnée de dilution).
- Au besoin, étaler la totalité de l'échantillon dans un plateau stérile. L'usage d'une hotte est recommandé pour les matières fortement odorantes.
- À l'aide de spatules stériles ou, si nécessaire, de gants chirurgicaux désinfectés avec de l'alcool, défaire les amas le plus possible et mélanger de manière à homogénéiser l'échantillon.
- Utiliser une spatule ou une pince stérilisée par flambage à l'alcool pour prélever de petites quantités de l'échantillon en divers endroits de celui-ci et ainsi obtenir une prise d'essai représentative de la totalité de l'échantillon. Les particules solides qui sont relativement petites doivent faire partie de l'échantillon analysé, mais pas les plus gros morceaux tels que les copeaux de bois.
- La suspension de l'échantillon doit être bien homogénéisée, par exemple, en agitant vigoureusement le contenant d'un mouvement vertical environ 25 fois, ou en utilisant un mélangeur.
- Par la suite, des dilutions 1/10 dans des bouteilles de 90 ml d'eau tamponnée de dilution sont réalisées jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (1/100, 1/1 000, 1/10 000, etc.). Changer de pipette ou d'embout entre les dilutions.

A2-7.2 Analyse des échantillons

Procéder à l'analyse des échantillons selon les indications de la section 7.2 de la méthode.

A2-7.2.1 Détermination de la siccité des échantillons solides

- En duplicata, peser un minimum de 10 g d'échantillon humide dans un récipient en aluminium ou dans tout autre contenant approprié. Noter le poids de l'échantillon humide.
- Faire sécher l'échantillon à l'étuve à environ 105 °C pendant la nuit et laisser refroidir au dessiccateur.
- Peser l'échantillon sec et noter son poids.
- Les résultats sont exprimés d'après l'équation suivante :

$$S = \frac{A}{B} \times 100$$

Où :

S : siccité (% de matière sèche)

A : poids de l'échantillon sec (g)

B : poids de l'échantillon humide (g)

La siccité d'un échantillon est la moyenne des duplicatas.

A2-7.3 Observation des résultats et confirmation

Procéder selon les indications des sections 7.3 et 7.4 de la méthode.

A2-8 Calcul et expression des résultats des échantillons solides

A2-8.1 Résultats selon la siccité

Pour les échantillons solides, exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par gramme d'échantillon en base humide selon les équations générales suivantes :

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

Pour ce calcul, la filtration de 1 ml de la dilution de 10 g d'échantillon dans 90 ml d'eau tamponnée (dilution 1/10) 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.

Il peut être nécessaire d'exprimer le résultat en fonction du poids de l'échantillon exprimé sur une base sèche. Dans ce cas, le résultat se calcule comme suit :

$$\text{Résultat en UFC/g (base sèche)} = \frac{\text{Résultat en UFC/g (base humide)}}{\text{Siccité (\%)}}$$

Exemple :

En supposant que la siccité d'un échantillon est de 22 %, et que le résultat est 77 000 UFC/g (base humide) :

$$\frac{77\,000 \text{ UFC/g (base humide)}}{0,22} = 350\,000 \text{ UFC/g (base sèche)}$$

A2-8.2 Résultats après la confirmation des colonies

Dans le cas où une confirmation est effectuée, il faut calculer la proportion de confirmation comme il est indiqué aux sections 7.4.10 et 8, puis calculer le résultat final selon la proportion calculée pour chacun des morphotypes (UFC/g [poids sec] ou UFC/g [base humide]) :

Entérocoques confirmés UFC/g =

$$\frac{\left(\frac{\text{Nb A confirmées}}{\text{Nb A testées}} \times \text{Nb total A}\right) + \left(\frac{\text{Nb B confirmées}}{\text{Nb B testées}} \times \text{Nb total B}\right) + \frac{\text{Nb Aty confirmées}}{\text{Nb Aty testées}} \times \text{Nb Aty} + (\text{etc.})}{\text{Quantité analysée en g}}$$

Où :

Nb : nombre de colonies

A, B, etc. : morphotypes dénombrés

Aty : colonies atypiques (ex. : morphotype C) dénombrées

Comme pour les échantillons liquides, toutes les morphologies coloniales doivent être incluses dans cette étape de confirmation.



**Environnement,
Lutte contre
les changements
climatiques,
Faune et Parcs**

Québec 