

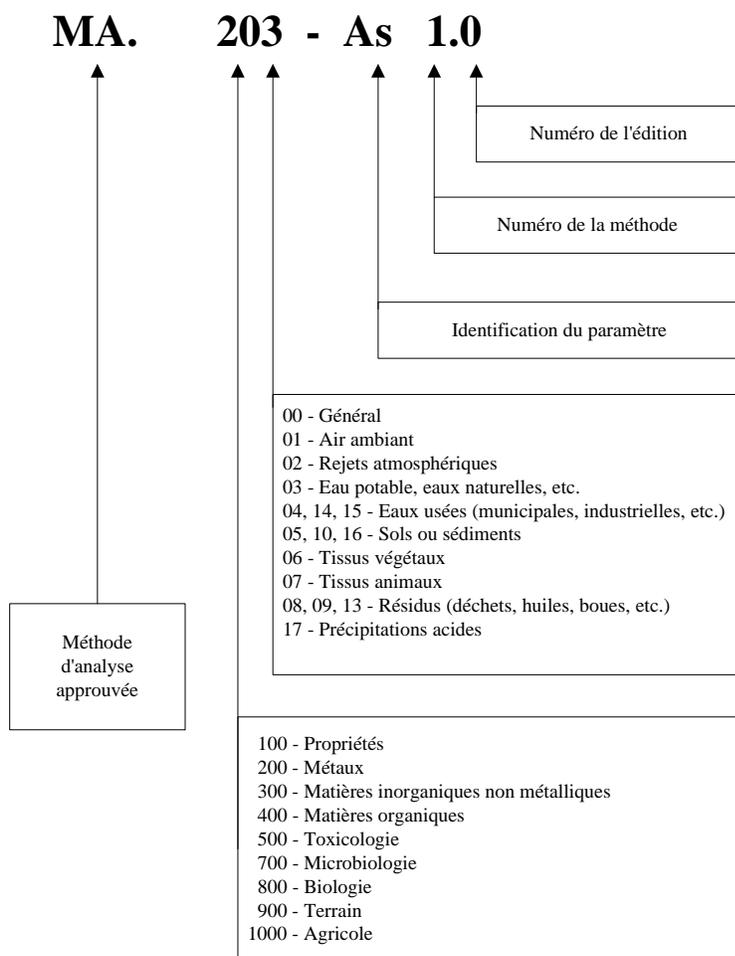
Méthode d'analyse



MA. 700 – BHA35 1.0

Recherche et dénombrement des bactéries
hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives :
méthode par incorporation à la gélose

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est identifiée par l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. L'indice peut également être augmenté si une révision entraîne des modifications en profondeur. La date de révision d'une méthode est suivie d'un chiffre indiquant la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.
Recherche et dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives : méthode par incorporation à la gélose, MA. 700 – BHA35 1.0, Rév. 3,
Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2011,
15 p.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	5
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. FIABILITÉ	6
3.1. Interférence	6
3.2. Limite de détection	7
3.3. Limite de quantification	7
3.4. Fidélité	7
4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION	7
5. APPAREILLAGE	8
6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS	8
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	10
7.1. Préparation de l'échantillon	10
7.2. Analyse de l'échantillon	11
7.3. Observation des résultats	11
8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	12
8.1. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	12
8.2. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	12
8.3. Dénombrement en présence de colonies envahissantes	13
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	14
10. BIBLIOGRAPHIE	14
Figure 1 - Schéma du protocole de confirmation des colonies hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA)	15

INTRODUCTION

Cette méthode d'analyse permet de dénombrer les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies (BHAA) facultatives présentes dans un échantillon d'eau. Elle est une mesure quantitative des bactéries viables sur un milieu de culture déterminé. Les bactéries dénombrées requièrent de la matière organique comme source de carbone (hétérotrophes) et sont cultivées à des températures optimales situées entre 20 °C et 45 °C (mésophiles) avec ou sans présence d'oxygène (aérobies et anaérobies facultatives). Cette méthode permet d'isoler et de dénombrer un groupe relativement varié d'espèces de bactéries sans égard à leur étiologie (pathogénicité).

Cette méthode ne permet pas de revivifier et de dénombrer toutes les bactéries présentes dans un échantillon d'eau. En effet, les populations microbiennes présentes dans des milieux aquatiques pauvres en substances nutritives subissent des carences importantes et ces conditions les rendent extrêmement sensibles au choc de la température inhérent à la technique proposée. De plus, aucune méthode, milieu de culture ou ensemble de conditions physiques ne peut satisfaire les exigences physiologiques de toutes les espèces bactériennes présentes dans un échantillon d'eau.

Le nombre et la variété de bactéries qui se multiplient sont influencés par des facteurs tels que la durée de la période d'incubation, la concentration partielle en oxygène, le pH du milieu, la présence de matières nutritives spécifiques dans le milieu de culture, la compétition entre les bactéries pour les nutriments, etc.

Néanmoins, cette méthode permet d'obtenir une appréciation globale de la contamination et une évaluation de la salubrité générale d'un milieu donné sans toutefois préciser les sources de contamination. Généralement, un faible dénombrement de BHAA dans l'eau permet d'en apprécier sa bonne qualité, alors qu'un dénombrement atteignant quelques milliers par millilitre peut témoigner d'une pollution d'origine organique.

La présence d'un nombre élevé de bactéries hétérotrophes dans l'eau d'un réseau de distribution peut en affecter la qualité en occasionnant un mauvais goût et de mauvaises odeurs ou en favorisant des conditions de dégradation biologique et de persistance de pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa* et *Aeromonas hydrophila*. De plus, la présence abondante de BHAA peut poser des problèmes dans le traitement d'une eau de consommation en rendant difficile le maintien d'une concentration résiduelle de chlore aux extrémités du réseau de distribution.

Cette méthode correspond à la méthode 9215B, intitulée « Pour Plate Method (Heterotrophic Plate Count) », du manuel *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA et WEF, 2005).

1. DOMAINE D'APPLICATION

La présente méthode consiste à dénombrer les bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHAA) par incorporation à la gélose.

Le dénombrement des BHAA s'effectue après incubation à 35 °C pendant 48 heures lorsqu'un aperçu général de la qualité de l'eau est désiré. Cette température reflète les conditions de vie des mésophiles et favorise la récupération de celles-ci. Le dénombrement après incubation à 35 °C

pendant 48 heures est surtout utilisé pour l'évaluation d'une eau de consommation d'un réseau de distribution, car il permet de vérifier l'efficacité du traitement.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La méthode de dénombrement des BHAA par incorporation à la gélose consiste à dénombrer les microorganismes viables présents dans une portion d'échantillon d'eau. Elle s'effectue en déposant une portion d'un échantillon d'eau dans une boîte de Pétri à laquelle est ajoutée de la gélose R2A, maintenue liquéfiée à environ 45 °C. La ou les boîtes de Pétri sont ensuite agitées doucement afin de répartir uniformément les bactéries dans tout le volume de milieu disponible. La ou les boîtes de Pétri sont ensuite laissées à refroidir sur une surface au niveau et incubées à 35,0 °C ± 0,5 °C pendant 48 heures ± 3 heures. L'incubation dans ces conditions permet à chaque bactérie viable de se multiplier et de former un amas de cellules (colonies) permettant leur dénombrement à l'aide d'un compteur de colonies. Le milieu de culture étant non sélectif, toutes les espèces de bactéries supportant les conditions du test pourront croître et ainsi être dénombrées.

3. FIABILITÉ

3.1. INTERFÉRENCE

Les bouteilles d'échantillonnage de 250 ml remplies à pleine capacité ne permettent pas d'agiter l'échantillon et de disperser uniformément les bactéries présentes dans tout le volume initial. Le rejet d'une portion de l'échantillon au laboratoire risquerait de modifier la concentration initiale des bactéries par unité de volume de l'échantillon et de fausser le résultat. L'analyse de tels échantillons doit faire l'objet d'une remarque à cet effet dans le rapport d'analyse.

La récupération des bactéries peut être affectée par le choc de température occasionné par la gélose liquéfiée maintenue entre 44 °C et 46 °C. Il faut éviter que la température de la gélose excède 46 °C, car des bactéries viables pourraient être détruites. Le niveau d'eau du bain-marie qui maintient la température entre 44 °C et 46 °C doit être plus élevé que le niveau de la gélose dans les bouteilles.

La gélose utilisée pour l'analyse doit être maintenue liquéfiée entre 44 °C et 46 °C pendant un maximum de 3 heures. Elle ne doit jamais être liquéfiée une seconde fois après la stérilisation. De plus, elle ne doit pas être utilisée si un précipité est visible dans le milieu.

Les bactéries ne doivent pas demeurer 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.

La gélose doit être versée dans des boîtes de Pétri posées sur une surface au niveau afin d'obtenir une épaisseur uniforme.

Les manipulations doivent être effectuées sur une surface non poreuse, désinfectée, dans un endroit du laboratoire à l'abri de courants d'air. Ces précautions sont nécessaires car le milieu de culture non sélectif utilisé permet la croissance de plusieurs microorganismes trouvés dans l'air et sur les surfaces de travail d'un laboratoire. La désinfection des surfaces de travail avant l'analyse est donc essentielle pour obtenir des résultats fiables.

Lorsque des microorganismes envahissent en partie ou en entier la surface de la gélose, le dénombrement des bactéries recherchées peut être affecté.

Le milieu de culture doit être stérilisé dans les 2 heures qui suivent sa préparation, car il peut en résulter une dégradation de sa qualité nutritive à la suite de la croissance de microorganismes.

Après la fin du cycle de stérilisation, éviter de laisser séjourner le milieu dans l'autoclave, car la chaleur de l'appareil suffit à modifier le milieu, principalement les sucres.

3.2. LIMITE DE DÉTECTION

La limite de détection pour cette méthode est de 1 UFC (unités formant des colonies) par ml.

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification, inférieure et supérieure, pour cette méthode sont respectivement de 30 et 300 UFC de BHAA par volume d'échantillon analysé.

3.4. FIDÉLITÉ

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

4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

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

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

Une étude réalisée dans nos laboratoires sur les eaux de consommation a permis d'établir que le délai maximal admissible pour l'analyse était de 48 heures après le prélèvement et que l'échantillon devrait être protégé contre les effets de la température à l'aide d'un isolant thermique ou être réfrigéré pendant le transport.

À leur réception au laboratoire, les échantillons qui ne peuvent être analysés dans les 4 heures qui suivent leur arrivée doivent être placés au réfrigérateur jusqu'au moment de leur analyse.

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

5. APPAREILLAGE

- 5.1. Barre magnétique
- 5.2. Boîtes de Pétri d'environ 100 mm x 15 mm
- 5.3. Bouteilles à dilution
- 5.4. Désinfectant pour surfaces de travail
- 5.5. Hygromètre
- 5.6. Pipettes stériles 10,0 ml et 1,0 ml de type TD
- 5.7. Thermomètres (graduation de 0,5 °C)
- 5.8. Bouteille de verre avec bouchon autoclavable
- 5.9. Autoclave
- 5.10. Bain d'eau bouillante
- 5.11. Bain-marie à 45 °C ± 1 °C
- 5.12. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.13. Brûleur à gaz
- 5.14. Compteur de colonies
- 5.15. Incubateur à 35,0 °C ± 0,5 °C
- 5.16. pH-mètre
- 5.17. Plaque chauffante avec agitateur magnétique
- 5.18. Réfrigérateur maintenant une température entre 2 °C et 6 °C

6. MILIEUX DE CULTURE ET RÉACTIFS

Tous les réactifs commerciaux utilisés sont de qualité ACS, à moins d'indication contraire. L'eau utilisée pour la préparation des milieux de culture et des réactifs est de l'eau distillée, déminéralisée ou ultrapure. Les marques de commerce apparaissant ci-dessous ne sont mentionnées qu'à titre de renseignement.

6.1. Hydroxyde de sodium, NaOH (CAS n° 1310-73-2)

Solution commerciale 10 N.

6.2. Acide chlorhydrique, HCl (CAS n° 7647-01-0)

Solution commerciale 1 N.

6.3. Phosphate de potassium anhydre, KH₂PO₄ (CAS no 7778-77-0)

6.4. Solution d'hydroxyde de sodium 1 N

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

6.5. Gélose R2A

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 18,2 g/l et sa formulation tel que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau :

Extrait de levure	0,5 g
Protéose peptone n° 3	0,5 g
Acides casaminés	0,5 g
Dextrose	0,5 g
Amidon soluble	0,5 g
Pyruvate de sodium	0,3 g
Phosphate de potassium dibasique	0,3 g
Sulfate de magnésium	0,05 g
Agar	15,0 g

Dans un erlenmeyer de 2 000 ml, peser 18,2 grammes de milieu déshydraté et ajouter 1 000 ml d'eau purifiée. Porter le milieu à ébullition (ne pas laisser bouillir) sur une plaque chauffante jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. Le pH final doit être de $7,2 \pm 0,2$ à 25 °C. Si nécessaire, ajuster le pH avec une solution de HCl 1 N (cf. 6.2) ou de NaOH 1 N (cf. 6.4). Répartir dans des bouteilles de verre avec bouchon. Stériliser les bouteilles à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Après la stérilisation, laisser refroidir la gélose à la température ambiante et visser hermétiquement les bouchons sur les bouteilles. Entreposer celles-ci au réfrigérateur à 4 °C à l'obscurité pendant quatre semaines au maximum. Lors de l'utilisation, faire fondre la gélose dans un bain d'eau bouillante et transférer ensuite les bouteilles dans le bain-marie à $45 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ pendant 3 heures au maximum.

Placer un thermomètre dans une bouteille supplémentaire de milieu de culture qui subira le même traitement thermique que les autres bouteilles. Cette bouteille sert de témoin de température.

6.6. Solution tampon phosphate

Dissoudre 34,0 g de KH_2PO_4 anhydre (cf. 6.3) dans environ 500 ml d'eau, ajuster le pH à 7,2 avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.4) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.7. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.6) par litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de 150 ml en volumes suffisants pour obtenir un volume final de 90 ml \pm 2,0 ml après autoclavage à 121 °C pendant 15 minutes. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

Pour toute série d'échantillon, 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.

7.1. Préparation de l'échantillon

Désinfecter la surface de travail avec un produit approprié. Identifier les boîtes de Pétri avec le numéro d'échantillon, la dilution et tout autre renseignement jugé utile.

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

La dilution de l'échantillon est parfois requise pour obtenir un dénombrement de 30 à 300 colonies au moment de l'observation des résultats. Pour la plupart des échantillons d'eau de consommation traitée, il est possible d'obtenir cet intervalle en ensemençant 1,0 ml et 0,1 ml de l'échantillon non dilué. Il n'est donc pas nécessaire d'effectuer de dilution.

Les eaux de consommation non traitées et les eaux brutes peuvent nécessiter plusieurs dilutions. Effectuer ces dilutions de la façon suivante :

- prélever aseptiquement 10,0 ml de l'échantillon à l'aide d'une pipette stérile et l'introduire dans une bouteille contenant 90,0 ml d'eau tamponnée de dilution (cf. 6.7). Agiter vigoureusement.

Effectuer la dilution suivante (si nécessaire) en prélevant aseptiquement 10,0 ml de la dilution précédente pour l'introduire dans une bouteille de 90,0 ml d'eau de dilution stérile. Agiter vigoureusement.

NOTE - La pipette doit être changée entre chaque dilution et le prélèvement d'une portion de l'échantillon avec une pipette doit s'effectuer en plongeant celle-ci à environ 2,5 cm sous la surface du liquide.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

Vous trouverez à la figure 1 le schéma analytique de la méthode.

- Prélever aseptiquement à l'aide d'une pipette stérile les volumes requis (par exemple 1,0 et 0,1 ml) de l'échantillon et les déposer dans les boîtes de Pétri (100 mm x 15 mm) préalablement identifiées. Le couvercle de la boîte de Pétri doit être entrouvert au minimum pour déposer l'inoculum afin de minimiser les risques de contamination.
- Verser ensuite de 15 ml à 17 ml de gélose R2A (*cf.* 6.5) tempérée à $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ dans chaque boîte de Pétri.
- Mélanger doucement l'inoculum et la gélose par rotation de la boîte de Pétri dans le sens horaire, dans le sens antihoraire et dans un mouvement avant-arrière et latéral. Ne pas éclabousser la gélose dans le couvercle de la boîte de Pétri.
- Laisser solidifier les géloses sur une surface plane au niveau.
- Placer les géloses dans l'incubateur à $35\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ en position inversée pendant 48 heures \pm 3 heures.

Un contrôle de stérilité doit être effectué de la façon suivante :

- verser de 15 ml à 17 ml de gélose R2A tempérée à $45\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ dans une boîte de Pétri. Laisser solidifier sur une surface au niveau. Il est recommandé d'effectuer un contrôle de stérilité par série de 10 échantillons.

7.3. OBSERVATION DES RÉSULTATS

Après la période d'incubation, sortir et ranger les boîtes de Pétri par ordre de numéro d'échantillon.

7.3.1. Dénombrement

Effectuer les dénombrements à l'aide d'un compteur de colonies. Choisir les boîtes de Pétri dans lesquelles il y a entre 30 et 300 colonies.

7.3.2. Enregistrement des résultats

Inscrire sur la feuille de travail le nombre de colonies correspondant au volume d'eau analysé et reporter le résultat par ml.

8. **CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS**

Les résultats doivent être calculés à l'aide de l'équation générale suivante :

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

8.1. DÉNOMBREMENT À L'INTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification étant situées à 30 et 300 colonies, calculer le résultat en ne retenant que les boîtes de Pétri contenant entre 30 et 300 colonies.

Exemple :

Si des volumes de 0,1 ml et de 0,01 ml d'un échantillon produisent des dénombrements de 250 et 14 colonies, conserver la valeur de 250 colonies pour exprimer le résultat :

$$\frac{250}{0,1 \text{ ml}} = 2\,500 \text{ UFC/ml}$$

8.2. DÉNOMBREMENT À L'EXTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

8.2.1. Dénombrement lorsque le nombre de colonies isolées est inférieur à la limite de quantification

Lorsque toutes les géloses analysées contiennent moins de 30 colonies, additionner toutes les colonies sur **l'ensemble** des géloses, tout en tenant compte des volumes de l'échantillon ensemencés.

Exemple :

Si des volumes de 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml d'un échantillon produisent respectivement 28, 4 et 0 colonies, le résultat est le suivant :

$$\frac{28 + 4 + 0}{1 + 0,1 + 0,01} = 29 \text{ UFC/ml}$$

8.2.2. Dénombrement lorsque aucune colonie n'a été isolée sur les boîtes de Pétri correspondant à plusieurs volumes analysés d'un échantillon

Calculer le résultat à l'aide du volume d'échantillon le plus grand.

Exemple :

Si des volumes de 0,1 ml, 0,01 ml et 0,001 ml d'un échantillon produisent tous des comptes de 0 colonie, calculer le nombre de colonies par ml qui aurait été rapporté s'il y avait 1 colonie sur la gélose du plus grand volume d'échantillon utilisé :

$$\frac{1}{0,1 \text{ ml}} = 10 \text{ UFC/ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

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

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

Calculer le résultat à l'aide de la limite de quantification et du plus faible volume d'échantillon utilisé.

Exemple :

Si des volumes de 1,0 ml, 0,1 ml et 0,01 ml d'un échantillon produisent respectivement 540, 390 et 320, tous les comptes sont au-delà de la limite de quantification. Estimer le résultat à l'aide du plus petit volume utilisé et de la limite supérieure de quantification (300 pour les BHAA).

$$\frac{300}{0,01 \text{ ml}} = 30\,000 \text{ UFC/ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

$$> 30\,000 \text{ UFC/ml}$$

8.3. DÉNOMBREMENT EN PRÉSENCE DE COLONIES ENVAHISSANTES

Dans le cas où des colonies envahissantes sont présentes, compter les colonies distinctes et les colonies envahissantes suivant les conditions énumérées ci-dessous :

8.3.1. Dénombrement des colonies distinctes

Dénombrer toutes les colonies distinctes si les colonies envahissantes ne couvrent pas plus de la moitié de la surface de la gélose.

Si les colonies envahissantes couvrent plus de la moitié de la surface de la gélose, rapporter qualitativement le résultat comme étant : « présence de colonies envahissantes ».

8.3.2. Dénombrement des colonies envahissantes

Dénombrer comme uniques les colonies envahissantes qui sont bien définies et séparées ainsi que celles différentes par leur aspect.

S'il est impossible de différencier les colonies envahissantes, rapporter qualitativement le résultat comme étant : « présence de colonies envahissantes ».

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les contrôles de stérilité effectués au moment de l'analyse doivent démontrer l'absence de colonies de BHAA ou de tout autre microorganisme.

La température de l'incubateur doit être maintenue à $35,0\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ pendant toute la durée de l'incubation.

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 POLLUTION CONTROL FEDERATION, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, 2005.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Lignes directrices concernant 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]

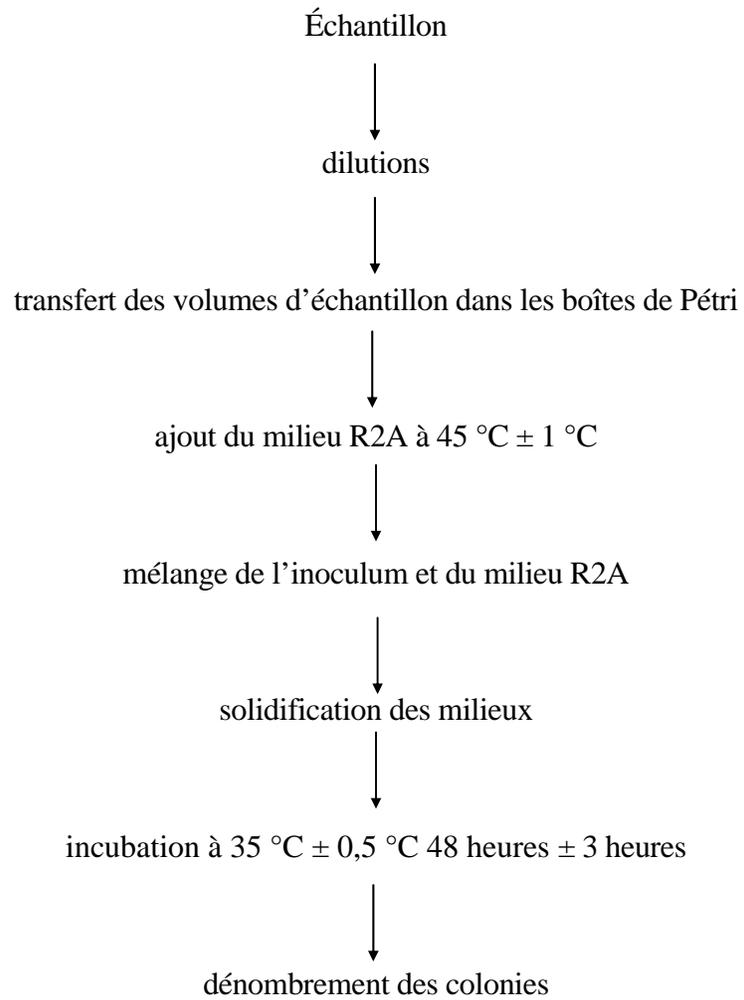


Figure 1 - Schéma du protocole d'analyse des colonies hétérotrophes aérobies et anaérobies facultatives (BHA)