

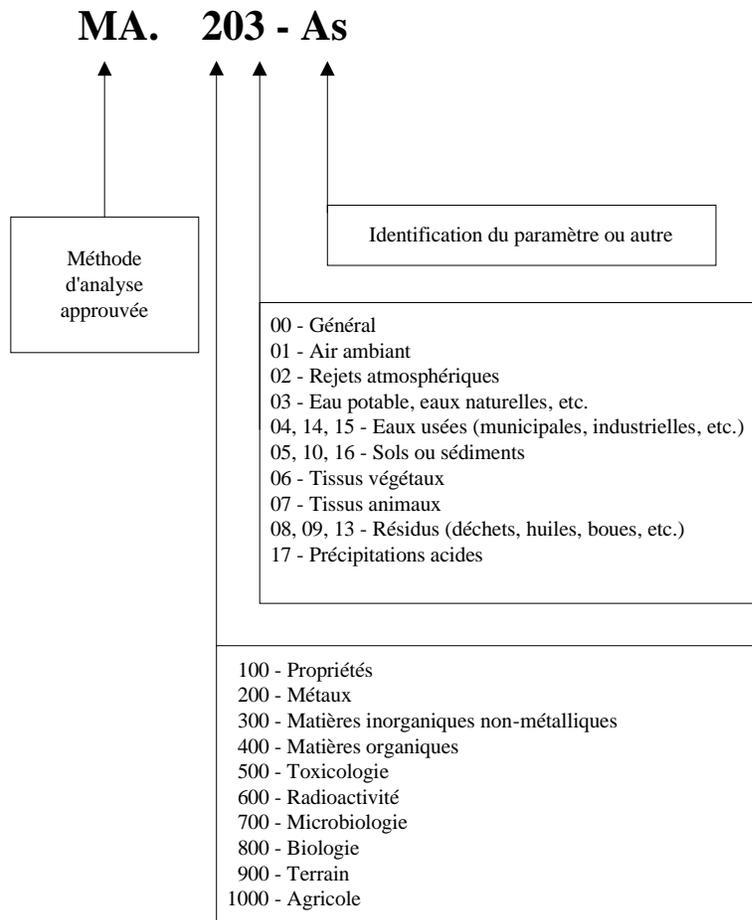
Méthode d'analyse



MA. 700 – Ec.BCIG 1.0

Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli*
thermotolérants dans l'eau : méthode par filtration
sur membrane utilisant le milieu de culture mFC-BCIG

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 l'édition (4).

Référence à citer :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.
Recherche et dénombrement d'Escherichia coli thermotolérants dans l'eau : méthode par filtration sur membrane utilisant le milieu de culture mFC-BCIG, rév. 1, MA. 700 – Ec.BCIG 1.0, Rév. 1, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2016, 17 p.

Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques
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	7
3.1. Interférence	7
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	9
7. PROTOCOLE D'ANALYSE	11
7.1. Préparation de l'échantillon	11
7.2. Analyse de l'échantillon	12
7.3. Observation des résultats	13
7.4. Confirmation	13
8. CALCULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	14
8.1. Échantillons d'eau de surface et d'eaux usées	14
8.2. Exemples de dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	14
8.3. Exemples de dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	15
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	16
10. BIBLIOGRAPHIE	ERREUR ! SIGNET NON DÉFINI.

INTRODUCTION

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est un bâtonnet à Gram négatif. Elle est anaérobie facultative. Sa température optimale de croissance avoisine les 35-37 °C, mais elle est aussi capable de croître à une température de 44,5 °C. Elle peut fermenter le lactose et elle possède les enzymes β -galactosidase et β -glucuronidase.

E. coli est un habitant normal de l'intestin des humains et des animaux à sang chaud. Par exemple, les matières fécales humaines contiennent environ 10^7 coliformes thermotolérants (constitués à 97 % d'*E. coli*) par gramme humide (Ashbolt et coll., 2001). *E. coli* joue un rôle utile dans l'intestin en participant, entre autres choses, à la synthèse de vitamines. Cependant, certaines souches particulières d'*E. coli* présentent un pouvoir pathogène important. Ainsi, la maladie du hamburger est causée par une souche pathogène d'*E. coli*O157:H7. Ce sérotype a aussi été à l'origine de l'épidémie de Walkerton (Ontario) en 2000. Malgré certains cas tragiques d'éclosions liées à des souches pathogènes d'*E. coli*, ces dernières sont rarement transmises par l'eau. Il est à noter que les méthodes utilisées pour les analyses de routine d'*E. coli* dans l'eau ne permettent pas de distinguer les souches pathogènes de celles qui ne le sont pas.

En raison de sa capacité de croître à la température de 44,5 °C, *E. coli* fait partie du groupe des coliformes thermotolérants (aussi appelés « coliformes fécaux »), qui est lui-même inclus dans le groupe des coliformes totaux. Cette bactérie est utilisée comme indicateur de contamination fécale. La présence d'*E. coli* dans l'environnement indique de manière presque certaine une contamination fécale plus ou moins récente et la possibilité d'y trouver également d'autres microorganismes pathogènes tels des bactéries, des virus ou des parasites. *E. coli* présente une meilleure spécificité en tant qu'indicateur de contamination fécale que les coliformes thermotolérants. En effet, les bactéries *E. coli* trouvées dans l'environnement ont généralement toutes une origine fécale, contrairement à certaines bactéries du groupe des coliformes thermotolérants, qui peuvent être de provenance environnementale ou industrielle. Par exemple, la bactérie *Klebsiella pneumoniae* est souvent présente en concentration élevée dans les effluents des usines de pâtes et papiers et elle donne un résultat positif avec les tests de coliformes thermotolérants. Dans ce cas cependant, *K. pneumoniae* n'est pas d'origine fécale.

En soi, la bactérie *E. coli* a probablement peu d'incidence sur l'environnement. Toutefois, la contamination fécale qu'elle indique peut être responsable de la transmission de plusieurs maladies aux humains et aux animaux. La baignade, le canotage et les autres activités récréatives de même que l'utilisation de l'eau comme source d'eau potable sont autant d'usages qui sont compromis par la pollution fécale.

Les rejets d'eaux usées domestiques ainsi que certaines activités agricoles telles que l'épandage de fumier ou de lisier sont des sources des *E. coli* trouvés dans l'environnement. Les animaux sauvages ou domestiques sont également une source non négligeable d'*E. coli*.

Sur le plan des diverses recommandations et réglementations touchant les pollutions fécales au Québec comme ailleurs dans le monde, *E. coli* tend de plus en plus à remplacer les coliformes thermotolérants (fécaux) en tant qu'indicateur.

Par ailleurs, puisque *E. coli* permet de démontrer l'existence d'une pollution fécale en infraction avec l'article 20 de la Loi sur la qualité de l'environnement, ce paramètre peut être employé

pour effectuer des vérifications en relation avec cet article. En effet, il y est mentionné que nul ne peut émettre dans l'environnement un contaminant « susceptible de porter atteinte à la vie, à la santé, à la sécurité, au bien-être ou au confort de l'être humain ». *E. coli* est un paramètre qui permet de démontrer l'existence d'une pollution fécale en infraction avec l'article 20 de la Loi sur la qualité de l'environnement.

Au Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, la méthode MA.700 – Ec.BCIG 1.0 a remplacé la méthode MA.700 – Ec-mTEC 1.0 qui était basée sur la méthode 1603 (2002) de l'USEPA. Comparativement à cette dernière, la méthode MA. 700 - Ec.BCIG 1.0 n'utilise qu'une température d'incubation de 44,5 °C plutôt que deux phases d'incubation à deux températures différentes. Cette méthode est une amélioration de la méthode MA. 700 – Fec.Ec 1.0, elle-même basée sur la méthode 9222D du manuel de référence *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, AWWA et WEF, 2012), puisqu'un substrat enzymatique, le BCIG, est ajouté au milieu mFC pour permettre la mise en évidence directe d'*E. coli*. Une méthode similaire (MFMICRO-E3371) est employée par le ministère de l'Environnement de l'Ontario pour la recherche d'*E. coli* dans l'eau.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode permet le dénombrement d'*Escherichia coli* thermotolérant dans les échantillons liquides. Elle est particulièrement adaptée à l'analyse des eaux de surface et des eaux usées. Elle n'est pas validée pour la recherche d'*E. coli* dans les échantillons d'eau potable. Cette méthode ne permet pas la mise en évidence des sérotypes pathogènes d'*E. coli* et elle ne permet pas de détecter les *E. coli* qui n'expriment pas d'activité β -D-glucuronidase.

2. PRINCIPE ET THÉORIE

La technique de filtration sur membrane consiste à recueillir, à identifier et à dénombrer les bactéries recherchées à la surface d'une membrane filtrante stérile. Les eaux usées doivent faire l'objet de dilutions et les solides sont mis en suspension et dilués dans une solution tampon avant l'analyse. La méthode consiste à filtrer, à travers une membrane de porosité de 0,45 μm , un volume déterminé de l'échantillon et d'incuber ensuite cette membrane sur une gélose mFC-BCIG pendant 24 ± 2 heures à 44,5 °C. Dans ces conditions, *E. coli* forme des colonies bleues, alors que quelques autres espèces bactériennes forment des colonies beiges.

La sélectivité du milieu est assurée par la présence de sels biliaries, qui inhibent la croissance de la majorité des organismes à Gram positif. La température élevée d'incubation (44,5 °C) est aussi un élément sélectif de la méthode, car elle ne permet pas la croissance de la majorité des bactéries coliformes. Seuls *E. coli* et quelques souches des autres espèces de bactéries coliformes arrivent à se multiplier sur le milieu de culture mFC-BCIG à cette température.

Le milieu mFC-BCIG permet la différenciation d'*E. coli*, car environ 95 % des souches de cette espèce possèdent l'enzyme β -D-glucuronidase. Cette enzyme métabolise le BCIG (acide 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique) contenu dans le milieu pour produire un composé bleu.

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. D'ailleurs, 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 d'échantillons de ce genre 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 d'*E. coli*. L'utilisation de plusieurs membranes est alors indiquée pour filtrer le volume d'échantillon requis. L'utilisation d'une autre méthode doit être envisagée si l'emploi de plusieurs membranes ne constitue pas une solution valable pour remédier à ces interférences.

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 Pétri 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.

3.2. LIMITE DE DÉTECTION

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

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification pour cette méthode se situent entre 20 et 80 UFC. 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, spécifique ou non, le résultat peut être non quantifiable. Le résultat est alors rapporté de la façon suivante :

TNI : colonies trop nombreuses pour être identifiées.

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 liquides 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 entre la surface du liquide et le bouchon.

De plus, les contenants utilisés pour le prélèvement des échantillons d'eau potentiellement chlorée, notamment les eaux de piscines et de bassins artificiels, 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, 2012). 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 une estimation juste du nombre de microorganismes présents dans l'eau au moment du prélèvement.

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 doit être protégé contre les effets de la température à l'aide d'un isolant thermique ou 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. Balance analytique avec une précision de 0,01 g
- 5.2. pH-mètre
- 5.3. Plaque chauffante agitatrice avec barre magnétique
- 5.4. Autoclave
- 5.5. Stérilisateur à rayons ultraviolets
- 5.6. Rampe de filtration avec entonnoirs et supports de filtres
- 5.7. Pompe à vide
- 5.8. Boîtes de Pétri d'environ 49 mm x 9 mm
- 5.9. Membranes filtrantes stériles quadrillées de porosité de 0,45 μm et de 47 mm de diamètre
- 5.10. Pincés en acier inoxydable à bouts plats
- 5.11. Pipettes stériles de type TD de 10,0 et 1,0 ml
- 5.12. Thermomètre permettant une lecture à 0,1 °C

- 5.13. Bain-marie dont la température est ajustée à $44,5 \pm 0,2$ °C
- 5.14. Sacs de polyéthylène
- 5.15. Scelleuse à sacs de polyéthylène
- 5.16. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.17. Bouteilles de 150 ml avec bouchon
- 5.18. Fil à boucle
- 5.19. Microscope à faible grossissement (**stéréomicroscope**) (< 15×)

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 KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)
- 6.4. Bandelettes pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase (ex. : Remel® Pathotec® cytochrome-oxydase).
- 6.5. 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.

- 6.6. Gélose mFC-BCIG (ex. : Oxoid, CM1111)

Ce milieu est disponible dans le commerce sous forme déshydratée. Il est utilisé à raison de 39,6 g/l et sa formulation telle que présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Tryptose	10,0 g
Protéose peptone	5,0 g
Extrait de levure	3,0 g
Sels biliaires N° 3	1,5 g

Chlorure de sodium	5,0 g
Acide 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique (BCIG)	0,1 g
Agar	15,0 g

Dissoudre 39,6 g de milieu déshydraté dans 1 000 ml d'eau. Bien homogénéiser. Chauffer sur une plaque chauffante avec agitateur mécanique jusqu'à l'ébullition. **Ne pas autoclaver.** Refroidir le milieu à 50 °C. Répartir en volumes de 4 ml dans des boîtes de Pétri de 49 mm x 9 mm et laisser solidifier. Le pH final doit être de $7,1 \pm 0,2$ à 25 °C. Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant deux semaines au maximum.

6.7. 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 (ex. : **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
Bacto 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 peut aussi être utilisée comme milieu non sélectif de propagation.

Peser 52,0 g de milieu déshydraté et dissoudre dans 1 000 ml d'eau. Porter le milieu à ébullition sur une plaque chauffante à feu moyen jusqu'à dissolution complète en remuant avec un agitateur magnétique. 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 (cf. 6.2) ou de NaOH 1 N (cf. 6.5). Répartir environ 8 ml dans des tubes de 16 mm x 125 mm pour former des géloses inclinées. Stériliser à 121 °C pendant 15 minutes.

Le milieu doit être conservé à environ 4 °C à l'obscurité pendant 4 semaines au maximum.

6.8. 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 $7,2 \pm 0,5$ avec une solution de NaOH 1 N (cf. 6.5) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.9. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.8) pour chaque litre d'eau. Répartir dans des bouteilles de polypropylène ou encore des flacons laveurs et autoclaver à 121 °C pendant 20 minutes. L'eau tamponnée de rinçage se conserve deux mois à 4 °C.

6.10. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (cf. 6.8) pour chaque litre d'eau. 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. L'eau tamponnée de dilution se conserve deux mois à 4 °C.

6.11. Galerie d'identification biochimique pour identification à *E. coli* (ex. : système API 20E®, système BBL Crystal®, système MicroScan®, etc.)

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.

Il est recommandé que les entonnoirs et supports de filtre soient lavés et stérilisés aux rayons ultraviolets après toute série d'analyses ou interruption de travail supérieure à 15 minutes. La stérilisation aux rayons ultraviolets est obligatoire avant l'analyse de chaque échantillon d'eau.

Le lavage et la stérilisation à l'autoclave de l'équipement de filtration sont indispensables après l'analyse d'échantillons fortement contaminés (eaux de plages, lacs, eaux usées, etc.) et avant de poursuivre l'analyse sur des échantillons peu contaminés (eau de consommation).

L'absence d'*E. coli* dans chaque entonnoir et support de filtre doit être vérifiée avant chaque série d'analyses. Procéder en rinçant la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 ml à 30 ml d'eau de rinçage (cf. 6.9). Filtrer sur une membrane stérile et incuber pendant 24 heures \pm 2 heures à $44,5 \text{ °C} \pm 0,2 \text{ °C}$ sur le milieu mFC-BCIG (cf. 6.6). La fréquence de ce contrôle peut être augmentée lors de l'analyse d'eau fortement contaminée. En tout temps, les exigences prescrites par le document DR-12-SCA-02 doivent être respectées.

7.1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

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

Les échantillons soupçonnés d'être fortement contaminés (eaux usées, etc.) doivent être traités de façon à obtenir, pour un volume donné d'échantillon, entre 20 et 80 colonies sur la membrane et ainsi permettre une lecture juste et rapide du nombre de colonies.

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

- en conditions aseptiques, pipetter 10 ml d'échantillon liquide dans 90 ml d'eau tamponnée de dilution (10^{-1});
- bien agiter la bouteille d'eau tamponnée de dilution **contenant l'échantillon** pour homogénéiser son contenu;
- répéter cette même opération jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc.);
- changer de pipette entre chaque dilution.

7.2. ANALYSE DE L'ÉCHANTILLON

- 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.
- 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 et le fixer fermement.
- Verser dans l'entonnoir les volumes requis, selon la nature de l'échantillon analysé (voir le tableau ci-dessous). Pour les volumes de 10 ml ou moins, introduire de 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (*cf.* 6.9) dans l'entonnoir de filtration. Ensuite, prélever à l'aide d'une pipette stérile le volume désiré. Laisser couler l'échantillon en appuyant le bout de la pipette sur l'épaulement interne de l'entonnoir. Enlever la dernière goutte de la pipette à l'aide de la poire.

Provenance de l'eau	Volumes (ml)
<ul style="list-style-type: none">– Eaux réputées propres, traitées ou non traitées– Eaux souterraines (puits)	100 ml
<ul style="list-style-type: none">– Eaux de surface (rivières, lacs, plages, etc.)	50, 10 et 1 ml
<ul style="list-style-type: none">– Eaux usées domestiques, municipales, industrielles, etc.– Lixiviats de sites d'enfouissement sanitaire, etc.	10 et 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.
- Rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20 ml à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage stérile (utiliser un flacon laveur). Rincer davantage s'il y a possibilité de forte contamination.
- Retirer l'entonnoir et déposer la membrane filtrante à l'aide d'une pince stérile sur une gélose mFC-BCIG (cf. 6.6).

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 Pétri le numéro de l'échantillon et le volume filtré.
- Le plus rapidement possible après la filtration, placer les boîtes de Pétri dans des sacs en polyéthylène, les fermer avec la scelleuse, puis les immerger complètement en position inversée dans un bain-marie à $44,5\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$ pendant 24 heures \pm 2 heures. L'inversion des boîtes de Pétri empêche la condensation d'eau sur les membranes.

7.3. OBSERVATION DES RÉSULTATS

Après la période d'incubation, sortir et ranger les boîtes de Pétri par ordre de numéro d'échantillon. L'observation des membranes s'effectue le plus tôt possible après leur sortie de l'incubateur.

La couleur caractéristique des colonies d'*Escherichia coli* sur la gélose mFC-BCIG est bleue. Choisir de préférence les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 80 colonies d'*E. coli* et au maximum 200 colonies de toutes sortes.

Effectuer les observations à l'aide d'un microscope à faible pouvoir de grossissement lorsque la lecture des colonies est difficile.

Inscrire sur la feuille de travail le nombre de colonies d'*E. coli* correspondant au volume d'eau filtrée et reporter le résultat par 100 ml, tel que précisé à la section 8.

7.4. CONFIRMATION

La technique décrite précédemment est une méthode de dénombrement et d'identification d'*E. coli*. Les taux de faux positifs et de faux négatifs de cette méthode sont excellents, mais dans certains cas il peut être souhaitable de confirmer que les colonies obtenues appartiennent bien à l'espèce *E. coli*.

Lorsque la confirmation est requise, il est recommandé de procéder d'abord à un test de l'oxydase, puis à l'identification des colonies oxydase négatives à l'aide d'un système d'identification biochimique (système API 20E®, système BBL Crystal®, système MicroScan®, etc.). Cette confirmation doit être effectuée sur au moins 5 colonies suspectes ou selon un nombre de colonies évalué à 10 % des colonies présentes sur la membrane filtrante. Il est également permis de procéder à la confirmation à l'aide d'un essai PCR validé.

7.4.1. Propagation des souches suspectes

Prélever une colonie bien isolée sur la gélose mFC-BCIG et effectuer une propagation de la souche par étalement sur gélose infusion cœur-cervelle inclinée (cf. 6.7). Placer dans un incubateur à $35,0 \pm 0,5$ °C pendant 18 à 24 heures.

7.4.2. Épreuve de l'activité cytochrome-oxydase

À partir de la croissance **fraîche** présente sur la gélose de propagation, effectuer un frottis sur une bandelette pour détecter l'activité cytochrome-oxydase (cf. 6.4). *E. coli* ne possède pas l'enzyme cytochrome-oxydase et produit une réaction négative. Pour l'utilisation des bandelettes, voir les instructions du fabricant.

7.4.3. Identification d'*E. coli*

Suivre les indications du fabricant pour l'identification des souches suspectes à l'aide d'un système biochimique d'identification ou suivre les indications de la méthode qui décrit l'essai PCR, selon le cas.

8. CALCULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

8.1. ÉCHANTILLONS D'EAU DE SURFACE ET D'EAUX USÉES

De façon générale, choisir la ou les membranes avec un nombre de colonies de préférence à l'intérieur des limites de quantification et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 ml d'échantillon selon l'équation générale suivante :

$$UFC/100 \text{ ml} = \frac{\text{Nombre de colonies d}'E. coli \times 100}{\text{Volume d'échantillon analysé en ml}}$$

8.2. EXEMPLES DE 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 80 colonies.

Exemples :

- 1) Si des volumes filtrés de 100 ml, 50 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml d'un échantillon produisent respectivement des dénombrements de 200, 110, 25, 4 et 1 colonies, choisir la membrane sur laquelle il y a 25 colonies (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 10,0 ml, 1,0 ml, 0,1 ml et 0,01 ml d'un échantillon produisent respectivement les résultats TNI, 55, 30 et 8 colonies, choisir les membranes sur lesquelles il y a 55 et 30 colonies (1,0 ml et 0,1 ml) :

$$\frac{55+30}{1,0+0,1} \times 100 = 7727 = 7700 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

NOTE – Le résultat final est arrondi.

8.3. EXEMPLES DE DÉNOMBREMENT À L'EXTÉRIEUR DES LIMITES DE QUANTIFICATION

8.3.1. 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'échantillonensemencé, 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 :

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

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

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

8.3.2. Dénombrement lorsque aucune colonie n'a été isolée sur les membranes correspondant à plusieurs volumes filtrés d'un échantillon

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

Exemple :

Si des volumes filtrés de 10 ml, 1 ml et 0,1 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 :

$$\frac{1}{10} \times 100 = 10 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

$$< 10 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

8.3.3. 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 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml produisent respectivement les résultats TNI, 150 et 110 colonies, tous ces dénombrements sont au-delà de la limite supérieure de quantification. Estimer le résultat à l'aide de la limite de quantification (80 pour *E. coli*) et du plus faible volume d'échantillon filtré (0,01 ml) :

$$\frac{80}{0,01} \times 100 = 800\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant :

$$> 800\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ

Les blancs d'entonnoir effectués au moment de l'analyse doivent démontrer l'absence de colonies d'*E. coli* ou de tout autre microorganisme.

La température du bain-marie doit être maintenue à $44,5 \pm 0,2$ °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

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 POLLUTION CONTROL FEDERATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22nd Edition, 2012.

ASHBOLT, N.J., GRABOW, O.K., SNOZZI, M. *Indicators of microbial water quality*. Dans *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*; Fewtrell, L., Bartram, J., Eds.; World Health Organization (WHO), IWA Publishing: London, UK, 2001, pp. 289–316.

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, DR-12-SCA-02. [http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/PALA/DR12SCA02_lignes_dir_micro.pdf]

CIEBIN, B. W., M. H. BRODSKY, R. EDDINGTON, G. HORSNELL, A. CHONEY, G. PALMATEER, A. LEY, R. JOSHI and G. SHEARS. *Comparative evaluation of modified m-FC and m-TEC media for membrane filter enumeration of Escherichia coli in water*, Appl. Environ. Microbiol. 61(11): 3940-3942, 1995.

ONTARIO MINISTRY OF THE ENVIRONMENT. *A membrane filtration method for the detection and enumeration of total coliform, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa and fecal streptococci in environmental samples*. MFMICRO-E3371 (document interne). Laboratory Services Branch, Quality Management Unit, Etobicoke, Ontario, Canada, 2004.

SANTÉ CANADA. *Recommandations au sujet de la qualité des eaux utilisées à des fins récréatives au Canada*, troisième édition. Bureau de l'eau, de l'air et des changements climatiques, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario), 2012. (Numéro de catalogue H129-15/2012F)

USEPA. Method 1603: *Escherichia coli (E. coli) in Water by Membrane Filtration Using Modified Membrane-Thermotolerant Escherichia coli Agar (Modified mTEC)*, EPA-821-R-09-007, 2009.