

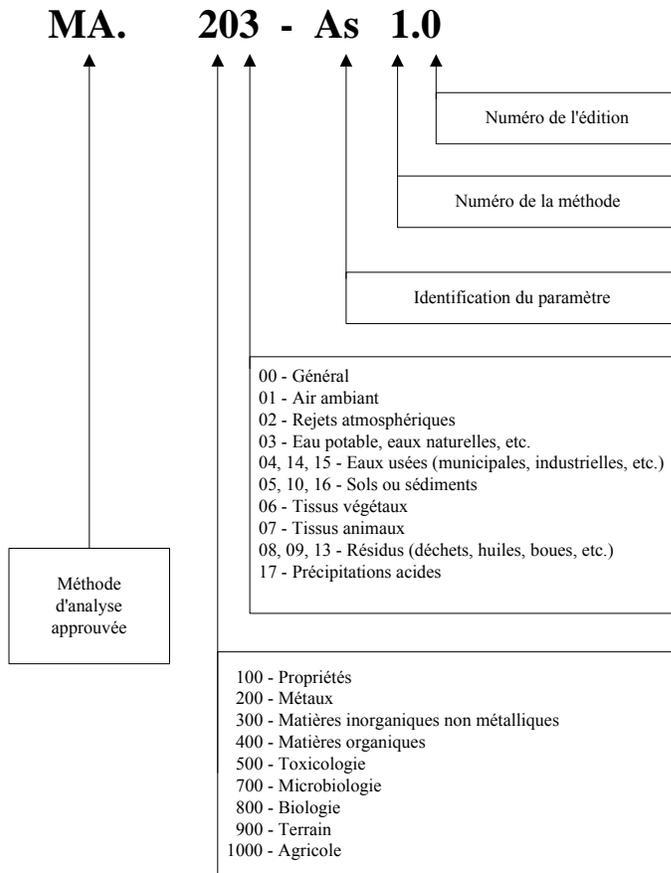
Méthode d'analyse



MA. 705 – Ec-BCIG 1.0

Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* thermotolérants dans les échantillons solides ou semi-solides : méthode par filtration sur membrane utilisant le milieu de culture mFC-BCIG

Exemple de numérotation :



La première édition d'une méthode est marquée de l'indice « 0 ». De façon usuelle, après quatre révisions successives, l'indice est augmenté de 1. Il peut également être élevé si une révision entraîne des modifications en profondeur de la méthode. La date de révision est suivie d'un chiffre qui indique le numéro de la révision en cours.

Ce document doit être cité de la façon suivante :

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC.
Recherche et dénombrement d'Escherichia coli thermotolérants dans les échantillons solides ou semi-solides : méthode par filtration sur membrane utilisant le milieu de culture mFC-BCIG, MA. 705 – Ec-BCIG 1.0, Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs du Québec, 2013, 17 p.

Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec
2700, rue Einstein, bureau E.2.220
Québec (Québec) G1P 3W8
Téléphone : 418 643-1301
Télécopieur : 418 528-1091
Courriel : ceaeq@mddefp.gouv.qc.ca

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	5
1. DOMAINE D'APPLICATION	6
2. PRINCIPE ET THÉORIE	6
3. FIABILITÉ	6
3.1. Interférence	6
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	11
7.3. Observation des résultats	12
7.4. Détermination de la siccité pour les échantillons solides	13
7.5. Confirmation	13
8. CACULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS	14
8.1. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification	14
8.2. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification	15
9. CRITÈRES D'ACCEPTABILITÉ	16
10. BIBLIOGRAPHIE	16

INTRODUCTION

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

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 10^8 *E. coli* par gramme. Cette bactérie 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*, le sérotype O157:H7, qui a aussi été le principal microorganisme pathogène responsable 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 du *E. coli* « générique » dans l'eau ne permettent pas de distinguer les souches pathogènes de celles qui ne le sont pas.

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 des 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, puisque généralement toutes les bactéries *E. coli* trouvées dans l'environnement ont 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 composts de résidus végétaux et dans les effluents des usines de pâtes et papiers et elle donne un résultat positif avec les tests de coliformes thermotolérants. Dans ces cas cependant, *K. pneumoniae* n'est pas d'origine fécale.

Cette méthode s'applique principalement à deux applications. Dans un premier temps, elle peut servir à déterminer la concentration en *E. coli* dans les matières résiduelles fertilisantes (MRF) et dans les composts par rapport à des critères définis dans le *Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes* (MDDEP, 2012). Elle peut également servir à déterminer la concentration en *E. coli* dans d'autres sortes d'échantillons solides ou semi-solides dans le but d'évaluer leur contamination en matières fécales.

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, 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 (MICROBIO-E3433) est également employée par le ministère de l'Environnement de l'Ontario pour la recherche d'*E. coli* dans les biosolides.

1. DOMAINE D'APPLICATION

Cette méthode est particulièrement utile pour le dénombrement d'*Escherichia coli* thermotolérant dans les échantillons solides et semi-solides tels que les MRF, les composts, les biosolides, les sols et les sédiments. Elle permet de vérifier des concentrations relativement élevées en *E. coli*, puisque les échantillons sont obligatoirement dilués avant l'analyse. Toutefois, cette méthode ne permet pas la mise en évidence des sérotypes pathogènes d'*E. coli* et elle ne détecte pas 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. Les échantillons solides et semi-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 bleu-vert ou bleu aqua, alors que quelques autres espèces bactériennes forment des colonies beiges.

La sélectivité du milieu est assurée par la présence de sels biliaires 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. Seul *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 présentent une activité enzymatique β -D-glucuronidase. Cette enzyme métabolise le BCIG contenu dans le milieu de culture pour en produire un composé bleu aqua.

En fonction des normes et des critères, le résultat est parfois exprimé en UFC¹/g (base sèche). Dans de tels cas, la siccité de l'échantillon, déterminée en parallèle, est incluse comme facteur dans le calcul du résultat final. Autrement, le résultat est généralement exprimé en UFC/g (base humide).

3. FIABILITÉ

3.1. INTERFÉRENCE

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.

Les résidus à pH élevé peuvent interférer avec l'analyse. Il est préférable de neutraliser le pH de la dilution 10^{-1} lors de l'analyse de boues chaulées.

¹ Unité formatrice de colonies.

Selon les échantillons, il peut y avoir plus ou moins d'interférence causée par des colonies d'autres espèces bactériennes. Il est requis de considérer avec attention les cas où il y a plus de 200 colonies de toutes sortes sur la membrane.

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. La limite de détection est donc variable. Selon les échantillons, et selon la présence plus ou moins importante de bactéries d'autres espèces sur les membranes et la siccité de l'échantillon, la limite de détection de la méthode peut varier de 100 à 10 000 UFC/g (base sèche ou humide), voire plus.

3.3. LIMITE DE QUANTIFICATION

Les limites de quantification se situent entre 20 et 80 UFC par membrane filtrante. Les limites de quantification de la méthode dépendent des dilutions analysées. Le nombre total de colonies de toutes sortes par membrane doit idéalement être inférieur à 200. De plus, lorsqu'il y a une croissance abondante d'organismes, spécifique ou non, le résultat peut être non quantifiable.

En théorie, la limite de quantification supérieure de la méthode est infinie, puisqu'il n'y a pas de limite au nombre de dilution qui peuvent être réalisées.

3.4. FIDÉLITÉ

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

4. PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION

Pour les échantillons solides prélevés conformément au *Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes*, suivre les instructions du *Protocole d'échantillonnage de matières résiduelles fertilisantes* (CEAEQ, DR-12-MRF-01-01).

Les autres échantillons solides peuvent être prélevés dans un sac de type Ziploc® neuf, dans un sac Whirl-Pak® ou dans une bouteille en verre ou en plastique stérile à large ouverture fournie par le laboratoire. Un poids d'environ 100 g est requis pour l'analyse des *E. coli* et pour la détermination de la siccité, quand cela est nécessaire.

Par ailleurs, une étude réalisée dans nos laboratoires nous 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.

5. APPAREILLAGE

- 5.1. Balance analytique
- 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 en esters de cellulose de porosité de 0,45 µm et de 47 mm de diamètre
- 5.10. Pincettes en acier inoxydable à bouts plats
- 5.11. Pipettes stériles de type TD de 50, 10 et 1 ml
- 5.12. Pipettes stériles à bout cassant de 10,0 ml
- 5.13. Thermomètre permettant une lecture à 0,1 °C
- 5.14. Réfrigérateur maintenant une température entre 2 et 6 °C
- 5.15. Bain-marie dont la température est ajustée à $44,5 \pm 0,2$ °C
- 5.16. Étuve réglée à 105 °C
- 5.17. Sacs de polyéthylène
- 5.18. Dessiccateur
- 5.19. Scelleur à sacs de polyéthylène
- 5.20. Mélangeur (*blender*) avec un récipient en acier inoxydable ou un appareil de type Stomacher[®] avec les sacs adaptés à l'appareil
- 5.21. Flacons laveurs pour l'eau de rinçage
- 5.22. Plateau autoclavable en acier inoxydable
- 5.23. Bouteilles de 150 ml avec bouchon
- 5.24. Spatule autoclavable

- 5.25. Fil à boucle
- 5.26. Nacelle à peser
- 5.27. Microscope à faible grossissement (< 15×)
- 5.28. Cylindre gradué stérile de 50 ml

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. Solution commerciale d'hydroxyde de sodium 10 N, NaOH (CAS n° 1310-73-2)
- 6.2. Solution commerciale d'acide chlorhydrique 1 N, HCl (CAS n° 7647-01-0)
- 6.3. Phosphate de potassium anhydre KH_2PO_4 (CAS n° 7778-77-0)
- 6.4. Sulfate de calcium anhydre (Drierite), comme dessiccatif
- 6.5. Bandelettes pour la détection de l'activité cytochrome-oxydase (Remel Pathotec[®] cytochrome oxidase.)
- 6.6. 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.

- 6.7. Gélose mFC-BCIG (Oxoid CM1111B)

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

Formule en grammes par litre d'eau

Tryptose	10,0 g
Protéose-peptone n° 3	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	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 magnétique 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.

6.8. 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 qu'elle est présentée par le fabricant est la suivante :

Formule en grammes par litre d'eau

Infusion de cervelle de veau	200,0 g
Infusion de cœur de bœuf	250,0 g
Protéose-peptone	10,0 g
Bacto-dextrose	2,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Phosphate disodique	2,5 g
Agar	15,0 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.* 6.6). 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.

6.9. 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.* 6.6) et compléter à 1 000 ml avec de l'eau. Cette solution se conserve à 4 °C.

6.10. Eau tamponnée de rinçage

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (*cf.* 6.9) 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.

6.11. Eau tamponnée de dilution

Ajouter 1,25 ml de la solution tampon phosphate (*cf.* 6.9) 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.

6.12. Galerie d'identification biochimique Microscan Gram négatif

7. PROTOCOLE D'ANALYSE

7.1. PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON

Lors de l'analyse de boues chaulées, ajuster aseptiquement le pH de la dilution 10^{-1} à un niveau compris entre 6 et 7,5.

Un poids de 50 g d'échantillon solide ou semi-solide est prélevé et mis en suspension dans 450 ml d'eau tamponnée de dilution (*cf.* 6.11) (dilution 1:10) avant de procéder à l'analyse.

- Étaler la totalité de l'échantillon dans un plateau en acier inoxydable stérile au besoin. 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 des 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.
- Analyser au moins 50 g de l'échantillon humide pour les matières résiduelles fertilisantes.
- De manière aseptique, peser la quantité requise d'échantillon et l'incorporer dans le récipient stérile d'un mélangeur ou dans le sac d'un Stomacher[®].
- **Option mélangeur (*blender*).** Additionner 450 ml d'eau tamponnée et mélanger au mélangeur à basse vitesse durant 1 minute. Cette préparation constitue la dilution 10^{-1} .
- **Option Stomacher[®].** Additionner 450 ml d'eau tamponnée et mélanger au Stomacher[®] pendant 2 minutes. Cette préparation constitue la dilution 10^{-1} .
- Laisser décanter 30 secondes. En condition aseptique, prélever 10 ml avec une pipette et transférer dans un volume de 90 ml d'eau tamponnée. Si l'échantillon est trop dense, employer une pipette à bout cassant. Cette préparation constitue la dilution 10^{-2} . Agiter vigoureusement la bouteille de dilution pour homogénéiser son contenu.
- Répéter cette même opération jusqu'à l'obtention de la dilution désirée (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 et les exposer aux rayons UV 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.
- Introduire de 20 à 30 ml d'eau tamponnée de rinçage (cf. 6.10) dans l'entonnoir de filtration. Ensuite, prélever à l'aide d'une pipette stérile un volume de 1,0 ml de la suspension diluée. Débuter par la plus grande dilution. Laisser couler l'échantillon en appuyant le bout de la pipette sur l'épaulement interne de l'entonnoir. Éjecter la dernière goutte de la pipette à l'aide d'une poire.
- 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).
- Retirer l'entonnoir et déposer la membrane filtrante à l'aide d'une pince stérile sur une gélose mFC-BCIG (cf. 6.7).

NOTE - Déposer la membrane en la déroulant pour obtenir un contact étroit avec la gélose. Éviter la présence de bulles d'air, qui est signalée par des zones plus blanches sur la membrane.

- Inscrire sur la boîte de Pétri le numéro de l'échantillon et la dilution analysée.
- Répéter avec les autres dilutions.
- Le plus rapidement possible après la filtration, placer les boîtes de Pétri dans des sacs en polyéthylène, les fermer avec le scelleur, 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.

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.
- Les colonies typiques d'*E. coli* sur la gélose mFC-BCIG présentent une couleur bleu aqua. Les colonies des autres espèces ou des *E. coli* β -D-glucuronidase négatives sont généralement blanches ou beiges. Choisir idéalement les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 80 colonies bleu aqua 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* bleu aqua correspondant au volume d'eau filtrée et reporter le résultat par g humide, tel qu'il est précisé à la section 8. Noter également le nombre des autres colonies non bleu aqua sur la feuille de travail.

7.4. DÉTERMINATION DE LA SICCITÉ POUR LES ÉCHANTILLONS SOLIDES

- En duplicata, peser 10 g ou plus d'échantillon humide dans un récipient en aluminium ou dans tout autre contenant approprié. Noter le poids.
- Sécher l'échantillon à l'étuve à 105 °C pendant la nuit et laisser refroidir au dessiccateur.

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 duplicata.

7.5. 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.), ou à l'aide d'un essai PCR validé. 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.

7.5.1. 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-cerveau inclinée (cf. 6.8). Placer dans un incubateur à 35,0 ± 0,5 °C pendant 18 à 24 heures.

7.5.2. Épreuve de l'activité cytochrome-oxydase

À partir de la croissance présente sur la gélose de propagation, effectuer un frottis sur une bandelette pour détecter l'activité cytochrome-oxydase (cf. 6.5). *E. coli* ne possède pas l'enzyme cytochrome-oxydase et produit une réaction négative. Pour l'utilisation des bandelettes, suivre les instructions du fabricant.

7.5.3. 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 d'un essai PCR.

8. CACULS ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

De façon générale, choisir la ou les membranes avec un nombre de colonies de préférence à l'intérieur des limites de quantification (cf. 3.3) et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par g d'échantillon en base humide selon les équations générales suivantes :

Poids de l'échantillon humide en grammes :

$$UFC / g \text{ (base humide)} = \frac{\text{Nombre de colonies d' } E. coli}{\text{poids de l'échantillon humide en g}}$$

Le poids de l'échantillon analysé est déterminé de la façon suivante :

La filtration de 1 ml de la dilution de 50 g d'échantillon dans 450 ml d'eau tamponnée (dilution 10^{-1}) 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.

Selon les contextes réglementaires, 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 :

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

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 80 colonies.

Exemples :

- 1) Si des volumes de 1,0 ml filtrés à partir des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} d'un échantillon produisent respectivement des dénombrements de 200, 110, 25 et 4 colonies bleu aqua, choisir la membrane sur laquelle il y a 25 colonies (dilution 10^{-4}) et calculer le résultat à l'aide de l'équation suivante :

$$\frac{25 \text{ UFC}}{0,0001 \text{ g}} = 250\,000 \text{ UFC/g (base humide)}$$

- 2) Si des volumes de 1,0 ml filtrés à partir des dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} 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 (dilutions 10^{-3} et 10^{-4}) :

$$\frac{(55 + 30)UFC}{(0,001 + 0,0001) g} = 77\,000\text{ UFC/g (base humide)*}$$

* Le résultat est arrondi à deux chiffres significatifs.

- 3) Convertir le résultat précédent de 77 000 UFC/g (base humide) en base sèche, en supposant que la siccité de l'échantillon est de 22 % :

$$\frac{77\,000\text{ UFC/g (base humide)}}{22\%} \times 100 = 350\,000\text{ UFC/g (base sèche)}$$

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 g (base humide ou sèche).

Exemple :

- 1) Si des volumes de 1,0 ml filtrés à partir des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} d'un échantillon produisent respectivement des dénombrements 15, 4 et 0 colonies :

$$\frac{(15 + 4 + 0)UFC}{(0,001 + 0,0001 + 0,00001) g \text{ (base humide)}} = 17\,000\text{ UFC/g (base humide)}$$

8.2.2. 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 volume d'échantillon filtré le plus grand.

Exemple :

Si des volumes de 1,0 ml filtrés à partir des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} d'un échantillon produisent tous des dénombrements de 0 colonie, calculer le nombre de colonies par g qui aurait été rapporté s'il y avait eu 1 colonie sur la membrane du volume de 1,0 ml le moins dilué analysé :

$$\frac{1UFC}{0,001\text{ g (base humide)}} = 1\,000\text{ UFC/g (base humide)}$$

Transmettre ce résultat comme étant : < 1 000 UFC/g (base humide).

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 1,0 ml filtrés à partir des dilutions 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} d'un échantillon 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 UFC/membrane) et du volume de 1,0 ml le plus dilué analysé :

$$\frac{80 \text{ UFC}}{0,00001 \text{ g (base humide)}} = 8\,000\,000 \text{ UFC/g (base humide)}$$

Transmettre ce résultat comme étant : > 8 000 000 UFC/g (base humide).

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

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.

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]

CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC. *Protocole d'échantillonnage de matières résiduelles fertilisantes – Résidus de fabriques de pâtes et papiers et autres résidus solides*, DR-12-MRF-01-01, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, 2011, 23 p.

[<http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/accreditation/paee/protocole-mrf.pdf>]

MINISTÈRE DU DÉVELOPPEMENT DURABLE, DE L'ENVIRONNEMENT ET DES PARCS. *Guide sur le recyclage des matières résiduelles fertilisantes : Critères de référence et normes réglementaires*, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, ISBN 978-2-550-64355-5, 2012, 170 p.

ONTARIO MINISTRY OF THE ENVIRONMENT. *Isolation, detection and enumeration of Escherichia coli in biosolids*. MICROBIO-E3433 (document interne). Laboratory Services Branch, Quality Management Unit, Etobicoke, Ontario, Canada, 2011.