

Travail Pratique N° : 1

Durée : 6 heures

Isolement et caractérisation des microorganismes à partir des eaux :

Eau usée et eau de robinet et / ou eau de source

1 Introduction

L'objectif de l'examen microbiologique de l'eau est de fournir des informations quant à la potabilité, c'est à dire sans risque d'ingestion de micro-organismes qui causent des maladies, provenant généralement d'une contamination par des matières fécales humaines et animales. Soulignons que les micro-organismes présents dans les eaux naturelles sont pour la plupart inoffensifs pour la santé humaine. Par contre, la contamination par des eaux usées est très nocive pour la santé publique. Les micro-organismes pathogènes qui peuvent être responsable, incluent notamment les virus, les bactéries (*Vibrio*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *coliformes*, *Salmonella*, Streptocoques...) les protozoaires et les helminthes.

Puisque les retenues d'eau servent, entre autres, à la récréation ou à la consommation d'eau, leur qualité bactériologique et hygiénique est également importante.

2 Matériel et Produits à utiliser la quantité dépend de la disponibilité des produits

Matériel	Produits
<ul style="list-style-type: none">• Flacons stériles,• Micro-pipettes de 1ml stériles,• Embouts,• Boîte de Pétri stériles,• Tubes à essais stériles,• Cloche de Durham;• Portoirs,• Anse de platine;• Bec Bunsen;• Etuve• Compteur de colonie• Bain marie	<ul style="list-style-type: none">• Eau distillée stériles• Gélose nutritive ;• Gélose PCA (Plate count Agar);• Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol• Gélose lactosé au pourpre de bromocrésol• Eau peptonée exempt d'indole ;• Milieu de Rothe ;• Milieu Viande foie + Sulfite de sodium et Alun de fer.• Réactif de Kovacs

3 Méthode d'analyse

3.1. Echantillonnage

On choisie comme échantillon l'eau de robinet (département de biologie) et l'eau usée t eau de source (le cas possible).

Il est essentiel que l'échantillonnage soit effectué avec prudence afin d'éviter toutes les sources possibles de contamination. Les échantillons doivent être prélevés dans des flacons en verre stériles.

➤ **Technique de prélèvements** « pour l'eau de robinet »

- a) se laver les mains avec de l'eau et du savon;
- b) nettoyer le robinet avec un morceau de coton imbibé d'alcool à 70% et/ou avec de l'hypochlorite de sodium à 100mg/L;
- c) ouvrir le robinet et laisser couler l'eau pendant 1 ou 2 minutes;
- d) collecter l'échantillon d'eau;
- e) remplir environ au $\frac{3}{4}$ du volume;
- f) fermer le flacon et l'identifier en marquant l'adresse, l'heure, le nom du collecteur, etc.;
- g) marquer le flacon avec le numéro d'échantillon correspondant au point de collecte;
- h) mettre le flacon contenant l'échantillon +4°C;

NB : le temps entre la collecte et l'examen de l'échantillon ne doit pas excéder 24 heures.

- Pour le prélèvement de l'eau usée, utiliser une seringue stérile pour éviter toute contacte directe avec l'eau, en mettant des gants et une bavette pour se protéger.

NB : on peut remplir le flacon directement des eaux usée mais avec une tenue conditionnée.

3.2. Dilution

L'analyse pourra s'effectuer directement à partir de l'eau ou à partir de ses dilutions. Ses dilutions sont réalisées par la méthode classique (9 ml d'eau distillée stérile ou physiologique stérile dans chaque tube). Pour une eau polluée on peut aller jusqu'à la dilution 10^{-8} (eau usée), 10^{-4} eau de robinet.

- Prélever à l'aide d'une micro-pipette 1 ml de l'échantillon mère (l'eau à diluer) et mettez-la dans le tube à essais contenant 9 ml d'eau distillée stérile (c'est la dilution 10^{-1})
- Continuer successivement.

3.3. Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile

Il s'agit de la recherche des germes aérobies mésophiles qui se développent sur gélose nutritive (la grande majorité de la flore banale et pathogène pourra se développer). L'incubation à 37°C permet la culture d'une gamme plus étendue de microorganismes. L'ensemencement se fait par la méthode de 4 quadrants.

➤ **Le milieu PCA est le plus courant pour la numération.**

- a) transférer à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de l'échantillon dans une boîte de Pétri;
- b) entrouvrir la boîte et ajouter le milieu de culture, **préalablement fondu et stabilisé dans un bain-marie à 44-46°C pendant 10 min;**
- c) homogénéiser le contenu de la boîte en faisant des mouvements circulaires de façon modérée (∞), environ 10 fois de suite;
- d) lorsque le milieu de culture se solidifie, incuber la boîte en position inversée à 37°C pendant 48 ± 3 heures;
- e) à la fin de la période d'incubation, compter les colonies à l'aide d'un compteur de colonies.

NB : N'oublier pas de mentionner les informations nécessaires sur les boîtes avant de les incuber.

3.4. Coliforme et *E. coli*

➤ **Test présomptif** sur un bouillon lactosé BCP avec cloche.

✓ **Exemple de 3 dilutions (10^{-3})**

a) prendre un portoir contenant 8 tubes à essai répartis de 2 en 2;

b) inoculer avec une pipette stérilisée dans les 2 premiers tubes (ceux qui contiennent le BCPL) 1 ml d'échantillon d'eau à examiner dans chaque tube. (Dilution 1:1); les 2 autres tubes 1 ml d'échantillon (dilution 1:10), dans les 2 autres, inoculer 1 ml d'échantillon dans chaque tube (Dilution 1:100) et dans les 2 derniers tubes 1 ml d'échantillon (dilution 1:1000)

d) mélanger et incuber à 37°C pendant 24/48 heures;

e) après 24/48 heures, si aucune formation de gaz ni virage de couleur vers le jaune n'ont eu lieu au cours de l'incubation, l'examen se termine à ce stade et le résultat du test est négatif.

S'il y a formation de gaz dans le tube de Durham et virage de couleur, cela signifie que le test présomptif a été positif. On peut évaluer le nombre de coliformes par moyenne arithmétique ou **on rapportant aux tables de Mac Grady pour calculer l'indice NPP.**

Les résultats doivent être confirmés car il existe de fausses réactions dues aux *Bacillus* et *Clostridium* et autres...

➤ **Test de Mackenzie : mise en évidence d'*E.coli***

Ensemencement d'une eau péptonée en plus des tubes de BCPL (incubation à 37°C) pour tester la production d'indole (présence d'anneau rouge après le rajout du réactif de Kovacs).

➤ **Test de confirmation**

La confirmation s'effectue par subculture et isolement sur milieu solide BCPL et cela à partir des tubes positifs.

➤ **Expression des résultats**

a) Les résultats sont exprimés en NPP (nombre plus Probable) et en nbr de bactérie / 1 ml d'échantillon.

b) pour déterminer la NPP, on vérifie la combinaison formée par le nombre de tubes positifs qui présentent les dilutions 10^0 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} .

Exemple:

a) Dans 2 tubes de dilution 1:1, on a obtenu 2 tubes positifs;

b) dans 2 tubes de dilution 1:10, on a obtenu 2 tubes positifs;

c) dans les 2 tubes de dilution 1:100, on a obtenu 1 tube positif;

d) dans les 2 tubes de dilution 1:1000, on a obtenu 0 tube positif

e) on détermine les NPP en consultant le tableau de Mac Grady en tenant compte au chiffre caractéristique qui doit être ≤ 220 (exp 210);

f) on suit la règle **NPP/V*Fd** pour obtenir le nombre de bactéries /ml.

3.5. Streptocoques fécaux

Les entérocoques sont dénombrés de manière présomptive sur le milieu de Roth à double et simple concentration : des tubes de milieu sont ensemencés avec de l'eau ou de ses dilutions. Après 24 à 48h à 37°C les tubes de culture positive sont présumés contenir un entérocoque.

- La confirmation est normalement réalisée par subculture 24 à 48h à 37°C sur milieu de Litsky. Une culture positive avec éventuellement l'apparition d'une pastille violette traduit la présence de l'entérocoque. Les différentes espèces peuvent être identifiées sur milieu de Barnes au TTC (Manque de milieu).

3.6. *Clostridium sulfio-réducteur* (souvent *C. perfringens*)

La méthode consiste à ensemercer un milieu gélosé VF sulfité additionné de :

- 0,5 mL de sulfite de sodium à 5%
- 2-3 gouttes de citrate de fer ammoniacal 5%

Placer un volume suffisant de l'eau dans un tube stérile et le porter 10 min à 80°C (20 mL d'eau) au bain marie.

Le milieu est conditionné en tubes hauts. Verser le volume d'eau dans le milieu sans faire de bulles (5 mL d'eau). Bien mélanger par rotation. Solidifier sous l'eau froide.

Après mélange et refroidissement les tubes sont incubés 48h à 37°C.

- On évalue après culture le nombre des grosses colonies noires.
- Les grosses colonies noires qui se sont développées en anaérobiose sont des colonies de bactéries produisant, à partir des sulfites, des sulfures qui ont précipité avec les ions fer III. On considère que ce sont des colonies de *Clostridium sulfito-réducteurs*. Dans le cas des spores : chaque colonie noire est issue d'une spore, d'où la détermination du nombre de spores dans le produit.

Nombre de résultats positifs			NPP	Catégorie lorsque le nombre d'essais de mesures est de 1 pour le lot considéré
0	0	0	<0,30	
0	0	0	0,30	3
0	1	0	0,30	2
0	1	1	0,61	0
0	2	0	0,62	3
0	3	0	0,94	0
1	0	0	0,36	1
1	0	1	0,72	2
1	0	2	1,1	0
1	1	0	0,74	1
1	1	1	1,1	3
1	2	0	1,1	2
1	2	1	1,5	3
1	3	0	1,6	3
2	0	0	0,92	1
2	0	1	1,4	2
2	0	2	2	0
2	1	0	1,5	1
2	1	1	2,0	2
2	1	2	2,7	0
2	2	0	2,1	1
2	2	1	2,8	3
2	2	2	3,5	0
2	3	0	2,9	3
2	3	1	3,6	0
3	0	0	2,3	1
3	0	1	3,8	1
3	0	2	6,4	3
3	1	0	4,3	1
3	1	1	7,5	1
3	1	2	12	3
3	1	3	16	0
3	2	0	9,3	1
3	2	1	15	1
3	2	2	21	2
3	2	3	29	3
3	3	0	24	1
3	3	1	46	1
3	3	2	110	1
3	3	3	>110	
autres valeurs			non cité dans la table	

Table de Mac Grady