

E-IV-4V1 – RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DES ENTEROCOQUES INTESTINAUX. FILTRATION SUR MEMBRANE

1. Objet

Cette procédure décrit la méthode de recherche et de dénombrement des entérocoques intestinaux dans les eaux après filtration sur membrane.

2. Domaine d'application

Cette procédure s'applique à tous les types d'eaux (y compris les eaux de piscines), excepté lorsque de grandes quantités de matières susceptibles d'être retenues par la membrane sont présentes.

3. Définitions et abréviations

Entérocoques intestinaux présumés: bactéries (appelée aussi Streptocoques fécaux) se développant en 44 ± 4 heures à $36 \text{ }^\circ\text{C}$, sur milieu sélectif à l'azoture de sodium en donnant des colonies typiques réduisant le chlorure de triphényl-2,3,5 tétrazolium

Entérocoques intestinaux: bactéries se développant en 44 ± 4 heures à $36 \text{ }^\circ\text{C}$, sur milieu sélectif à l'azoture de sodium en donnant des colonies typiques réduisant le chlorure de triphényl-2,3,5 tétrazolium qui, de plus donnent une réaction positive sur une gélose biliée à l'esculine et une réponse négative au test catalase.

4. Principe

Le dénombrement des entérocoques intestinaux est basé sur la filtration de volumes donnés d'échantillon d'eau sur une membrane filtrante de porosité $0,45 \text{ }\mu\text{m}$.

Les membranes sont placées sur un milieu sélectif contenant de l'azoture de Na et du chlorure de triphényl-2,3,5 tétrazolium et mises à incuber.

Après incubation toutes les colonies présentant une coloration rouge, marron ou rose sont dénombrées comme entérocoques intestinaux présumés.

Les colonies ayant une réaction positive à l'esculine sont considérées comme entérocoques intestinaux.

N.B.: En cas de doute, une réaction négative au test à la catalase confirmera la présence d'Entérocoques intestinaux.



5. Conditionnement et conservation de l'échantillon

Les échantillons d'eau doivent être prélevés dans des bouteilles ou des flacons stériles à usage unique (avec inhibiteur de désinfectant si nécessaire)

Les flacons contenant les échantillons destinés aux analyses microbiologiques ne sont pas remplis entièrement.

Les échantillons sont conservés jusqu'au moment de l'analyse entre 2 et 5 °C.

L'échantillon doit être analysé de préférence dans les 8 heures qui suivent le prélèvement, sinon impérativement dans les 24 h.

6. Appareillages et matériels utilisés

6.1 Appareillage

- Rampe de filtration
- Autoclave
- Incubateur à 36 ± 2 °C
- incubateur à 44 ± 0.5 °C
- Compteur de colonies.

6.2 Petit matériel

- Bouteille en verre : préparation du milieu de culture.
- Petit matériel stérile à usage unique : pipettes individuelles stériles en plastique de 2 et 10 ml, boîtes de pétri de 50 mm de diamètre, pots de 50 ml ou tubes de 20 ml en plastique pour les éventuelles dilutions.
- Des membranes filtrantes stériles de 0.45 µm de porosité, d'environ 47 mm de diamètre

7. Réactifs utilisés

- **Milieu de culture sélectif "SLANETZ et BARTLEY"**
La présence d'azide limite la croissance de la flore secondaire. Les entérocoques intestinaux réduisent le TTC en formazan qui les colore en rouge.
- **Gélose biliée à l'esculine et à l'azoture**
Alors que la prolifération des entérocoques tolérant la bile n'est pas ralentie, la croissance des bactéries secondaires gram-positives est largement inhibée par les sels biliaires. Les entérocoques intestinaux hydrolysent le glucoside d'esculine en glucose et en esculine. Cette dernière forme avec les ions Fer(III), un complexe vert olive à noir.
- **Solution Ringer** ¼ stérile utilisée pour des dilutions éventuelles
- **Eau oxygénée** si le test catalase s'avère nécessaire

8. Mode opératoire

8.1 Préparation de l'échantillon

Le nombre de dilutions réalisées et le choix des volumes à filtrer varient en fonction du type d'échantillons analysés.

A titre indicatif :

- Pour les échantillons ponctuels d'eaux de surface normales, les volumes de l'échantillon filtrés sont de 100 ml, 10 ml, 1 ml.
- Dans le cas de cours d'eau réputés pour leur forte pollution, la dilution 0.1 ml complétera la série.
- Pour les eaux de distribution, eaux de piscine, les eaux souterraines et les eaux alimentaires, le volume filtré est de 100 ml.

8.2 Filtration

Les prises d'essai sont filtrées sur membranes de 0.45 µm de porosité.

8.3 Incubation.

Les boîtesensemencées sont retournées et disposées en piles (max 6 boîtes) et mises à incuber pendant 44 ± 4 h dans un incubateur réglé à 36 ± 2 °C.

8.4 Lecture.

Sur le milieu SLANEZT ET BARTLEY, les colonies caractéristiques considérées comme entérocoques intestinaux sont de couleur rose, rouge ou marron pouvant être limitées à leur centre ou à leur périphérie par une zone plus claire.

8.5 Confirmation

Après dénombrement, la totalité des entérocoques intestinaux présumés sont confirmés par transfert de la membrane sur une gélose biliée à l'esculine et à l'azoture préalablement chauffée à 44 °C et incubation d'environ 2 h à 44 ± 0.5 °C.

La gélose prend une coloration noirâtre autour et/ou sous les colonies des entérocoques intestinaux

N.B. : En cas de réaction douteuse, le test à la catalase sera utilisé pour confirmer ou infirmer la présence d'entérocoques intestinaux.

9. Paramètres qualité

Le contrôle de qualité des essais sera réalisé par :

- Le contrôle des conditions d'essais : délais entre le prélèvement et l'analyse, condition de conservation des échantillons, qualité des milieux de culture, surveillance des températures d'incubation,...
- La vérification de l'asepsie de l'environnement : témoin (filtration de 100ml de solution de Ringer et incubation parallèlement aux échantillons)



- Utilisation de Matériaux de référence quantifiés et établissement d'une carte de contrôle
- Le contrôle externe par la participation à des exercices interlaboratoires

10. Calcul et expression de résultats

Les résultats sont généralement exprimés en nombre d'entérocoques intestinaux par 100 ml.

11. Sécurité

Sans objet dans cette procédure.

12. Rapport d'essai

Le rapport doit contenir au minimum :

- une référence à la présente méthode de la Région wallonne et éventuellement à la méthode normalisée
- l'identification complète de l'échantillon
- la date de prélèvement ; ceci qu'il ait été réalisé par le laboratoire ou par le client
- la date d'analyse
- les résultats du dénombrement conformément au point 10
- les détails opératoires non prévus dans la présente méthode, ainsi que tout facteur ayant pu affecter les résultats.

13. Références

ISO 7899-2 : 2000: Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux- partie 2 : méthode par filtration sur membrane.

ISO 8199 : 2005 - Water quality -- General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture