

TP2 Analyse de l'eau par filtration sur membrane

Dénombrement des entérocoques dans une eau par la méthode du NPP miniaturisée

Objectifs

A : analyse d'une eau destinée à la consommation humaine: flore totale, coliformes et entérocoques par filtration sur membrane. Recherche de spores d'anaérobies sulfitoréducteurs par incorporation dans la masse.

B : dénombrement des entérocoques par la méthode du NPP en microplaques.

A : Analyse d'une l'eau

L'analyse se fera :

- sur une eau « naturelle » (rivière, puits)
- sur une eau préparée avec des germes tests, de façon à vérifier l'aspect des colonies sur les milieux sélectifs utilisés.

A.1. Préparation de cette eau « test » : par binôme

- 1 bouteille d'eau minérale,
- souches en bouillon : E.coli, Enterococcus faecalis à environ 10^7 germes/mL Sachant que le volume filtré est de 100 mL pour les coliformes et pour les entérocoques, déterminer une façon de préparer l'eau test de manière à viser environ 50 colonies de coliformes et environ 50 colonies d'entérocoques sur la membrane.

A.2. Analyse de l'eau par filtration

On travaillera par binôme.

Réaliser l'analyse des eaux comme indiqué dans le tableau récapitulatif ci-dessous :

	Eau « naturelle »	Eau « test »	incubation
Flore totale	1 mL	1 mL	(1)
Coliformes : gélose lactosée + TTC tergitol	100 mL	100 mL	37°C
Entérocoques Slanetz (2)	100 mL	100 mL	37°C
Spores d'anaérobies sulfitoréducteurs VFSR ou	20 mL soit 5 mL x 4	inutile	37°C

(1) La norme prévoit une incubation à 36°C +/- 2°C pendant 44h +/- 4h et à 22°C +/- 2°C pendant 68h +/- 4h . On ne réalisera que celle à 36°C.

(2) Si en jour 2 il y a des colonies présumées d'entérocoques, transférer la membrane sans la retourner sur une gélose BEA. Incuber 2h à 44°C. Les colonies typiques sont entourées d'un halo noir.

A.3. Recherche des spores d' anaérobies sulfito-réducteurs

Ensemencer dans la masse une gélose VFSR régénérée et maintenue en surfusion à 45°C ; pour cela, introduire 5 mL d'au à analyser après avoir détruit si nécessaire les formes végétatives en chauffant un échantillon d'eau 10 min à 80°C.

Le milieu se présente en tubes hauts ; il faut en principe 4 tubes pour tester 20mL d'eau.

Compte rendu

- 1) Expliquer la préparation de l'eau « test »
- 2) Rappeler les composants essentiels des milieux utilisés pour la filtration et donner leur rôle, ainsi

que l'aspect justifié des colonies à dénombrer

- 3) Réaliser un tableau indiquant le nom des milieux utilisés, la recherche effectuée, les volumes filtrés ou ensemencés, la température d'incubation, les résultats bruts
- 4) Donner les résultats des numérations et comparer éventuellement ces résultats avec ceux des normes fournis pour l'eau potable destinée à la consommation humaine
- 5) Quel autre genre de bactérie SPORULEE est susceptible de pousser en profondeur de milieux tels la gélose VFSR ? quel serait l'aspect des colonies ?

B : Dénombrement des entérocoques par la méthode du NPP miniaturisée

B.1. Introduction

Le dénombrement des streptocoques D dans l'eau se fait généralement par filtration sur membrane (norme NF EN ISO 7899-2).

Néanmoins, dans les eaux de surface riches en matières en suspension et de qualité microbiologique médiocre, la filtration ne convient pas et il faut utiliser la méthode classique du NPP (norme NF EN ISO 9308-3, mars 1999). Voici un extrait de cette norme concernant les streptocoques D:

« ..sont considérés comme streptocoques D les micro-organismes donnant une réponse positive en 48h à 37°C dans un bouillon glucose à l'azide de sodium (milieu de Rothe) et, de plus, une réaction positive en 24h et 48h sur une gélose biliée à l'esculine ou sur un milieu de Litsky. Le principe de cette méthode se divise en 2 étapes :

1- Test présomptif : ensemencement des dilutions de l'échantillon dans une série de tubes contenant un bouillon glucose à l'azoture -milieu de Rothe)

2- Après 24 à 48h d'incubation à 37°C +/- 1°C, repiquage des tubes positifs dans un milieu confirmatif ; milieu de Litsky.

Après 24 à 48h d'incubation à 37°C +/-1°C, détermination des tubes positifs correspondants à la présence de streptocoques D et calcul du NPP à partir d'une table statistique. ».

Le but de cette manipulation est d'essayer d'adapter cette norme en microméthode, en utilisant une microplaque, ce qui permet d'augmenter le nombre d'essais par dilution et donc la précision du résultat, tout en limitant la verrerie et le nombre de milieux . On se limitera à l'étape 1 (test présomptif en milieu de Rothe)

B.2. Protocole

Préparation de la microplaque

- Répartir dans 5 tubes à hémolyse 5 x 1mL de milieu de Rothe; double concentration
- Répartir 100 µL de milieu de Rothe double concentration dans 5 puits de la microplaque
- Répartir 200 µL de milieu de Rothe dans 25 puits de la microplaque. Prévoir un puit témoin pour vérifier la stérilité du milieu

Dilution de l'eau

- On utilisera une eau fournie (eau E)
- Réaliser les dilutions décimales de l'eau test jusqu'à la dilution 10^{-4} en eau V distillée stérile. Ces dilutions peuvent être réalisées en microplaque

Ensemencement

- Ensemencer les 5 tubes à hémolyse avec 1 mL de l'échantillon d'eau à tester
- Ensemencer les 5 premiers puits (contenant le milieu double concentration) avec 100 µL d'échantillon d'eau
- Ensemencer les autres puits avec 10 µL de la dilution d'eau : 5 puits par dilution, tester les dilutions 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} .
- Incuber 24h à 37°C : considérer positifs les tubes présentant un trouble.

Utiliser une microplaque pour 2 élèves, donc utiliser 4 rangées par élève au maximum.

Compte rendu

- 1) Justifier l'utilisation du milieu double concentration
- 2) Quelle est la limite de détectabilité des entérocoques par cette méthode dans l'eau ?
- 3) Donner le plan de la microplaque réalisée
- 4) Préparer un tableau de résultats indiquant les différentes dilutions testées et les volumesensemencés :
- 5) Déterminer le NPP de conformes ou d'entérocoques par mL d'eau : utiliser la table ci-jointe (annexe 2)

Attention : le NPP fourni dans la table correspond au nombre le plus probable dans le volume d'inoculum du premier tube retenu

Annexe 1

Normes pour l'eau potable Décret 2001-1220 entré en application le 24/12/2003 Remplace le décret 89-3	
Flore aérobie revivifiable	Non exigée (1) (ancien décret : moins de 100 par mL à 22°C et moins de 10 par mL à 37°C)
Coliformes	Absence dans 100 mL
Entérocoques	Absence dans 100 mL
Spores d'anaérobies sulfitoréducteurs à 37°C	Non exigé Paramètre indicateur pour les eaux de distribution : absence dans 100 mL

(1) Les normes actuelles ne fixent pas de valeur limite pour l'eau potable. Le décret 2001-1220 préconise une variation maximale d'un facteur 10 pour la valeur habituelle pour les germes aérobies revivifiables à 22° et 37°C.