


Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 1 de 15

**AVERTISSEMENT** : Avant d'appliquer cette méthode, consulter les manuels d'instructions, les fiches signalétiques et autres documents portant sur la sécurité.

**Le timbre d'encre coloré indique que ceci est un document contrôlé. L'absence de couleur indique que cette copie n'est pas contrôlée et ne recevra pas des mises à jour de révision.**

## **INTRODUCTION**

Les coliformes thermotolérants (fécaux) renferme toutes les espèces bactériennes faisant partie de la famille des *Enterobacteriaceae* qui sont aérobies ou anaérobies facultatives, à Gram négatif, asporulées, en forme de bâtonnet et produisant des colonies bleues en moins de 24 heures à 44,5°C sur une gélose m-FC contenant du lactose. L'espèce caractéristique et principale des coliformes thermotolérants est *Escherichia coli*, mais d'autres souches de coliformes, telles *Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp et *Klebsiella* spp, peuvent aussi se reproduire dans un milieu lactosé à 44,5°C.

Les coliformes thermotolérants (fécaux) doivent également produire une réaction positive à l'épreuve de l'ONPG (enzyme  $\beta$ -galactosidase) et une réaction négative à l'épreuve de la cytochrome-oxydase.

Un autre test, le test du MUG (4-méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide), s'il est positif, identifie formellement la présence de *E. coli* et l'origine fécale obligatoire de la contamination.


Les coliformes thermotolérants (fécaux) sont des micro-organismes indicateurs d'une pollution d'origine fécale humaine ou animale. Ils sont généralement en nombre inférieur aux coliformes totaux et indiquent qu'il y a contamination récente ou constante.

### **1. INTERVALLE DE MESURES**

La présente décrit une méthode de dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) par filtration sur membrane, puis de confirmer leur appartenance à l'espèce *E. coli*. Cette méthode s'applique à tous les genres d'eau, mais tout particulièrement ici aux eaux de surface et usées.

### **2. PRINCIPE ET THÉORIE**

2.1. La méthode de filtration sur membrane consiste à recueillir, identifier et dénombrer à la surface d'une membrane filtrante stérile, les bactéries coliformes d'origine fécale dans un échantillon d'eau. Il s'agit de filtrer à travers une membrane de porosité de 0,45  $\mu$ m un volume déterminé de l'échantillon, de déposer cette membrane sur un milieu de culture sélectif, la gélose m-FC et d'incuber cette gélose à 44,5  $\pm$  0,2 °C pendant 24  $\pm$  2 heures. Dans ces conditions, les coliformes thermotolérants (fécaux) forment des colonies bleues, permettant ainsi de les énumérer et de les identifier de façon présomptive. La présence de coliformes thermotolérants (fécaux) est confirmée ensuite par une réaction positive au test

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 2 de 15

de l'ONPG et une réaction négative à l'épreuve de la cytochrome-oxydase. Une confirmation spécifique de *E. coli* demande aussi une réaction positive de l'épreuve du MUG.

- 2.2. La présence de sels biliaires dans le milieu m-Fc inhibe la croissance de la majorité des organismes à Gram positif et les micro-organismes sporulants alors que le sel de sodium de l'acide rosolique inhibe la croissance d'une variété de bactéries non coliformes.


### 3. **FIABILITÉ**

#### 3.1. **Interférences et limitations**

- 3.1.1. Les bouteilles d'échantillonnage de 250 ml remplies à pleine capacité ne permettent pas d'agiter l'échantillon de façon à disperser uniformément les bactéries présentes dans tout le volume initial. Le rejet d'une portion aliquote de l'échantillon au laboratoire risquerait de modifier la concentration initiale des bactéries par unité de volume et de fausser le résultat. L'analyse de tels échantillons doit être faite en ajoutant un commentaire à l'échantillon.
- 3.1.2. La gélose m-FC doit être conservée entre 2 et 5°C à l'abri de la lumière pendant un maximum de deux semaines. Une période d'entreposage prolongée peut conduire à une baisse appréciable de la sélectivité et du rendement de ce milieu.
- 3.1.3. 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.
- 3.1.4. L'incubation des boîtes de Pétri à 44,5°C doit s'effectuer dans un délai de 30 minutes après la filtration, en raison de l'importance de la température d'incubation comme facteur de sélectivité de la méthode.
- 3.1.5. Certains genres bactériens tels que *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* peuvent croître sur le milieu m-FC à 44,5°C et produire des colonies bleues typiques des coliformes thermotolérants (fécaux). Toutefois, ces dernières ne produisent pas de réaction positive au MUG.

#### 3.2. **Limites**

- 3.2.1. La limite de détection de la méthode est établie à (1) UFC (unité formatrice de colonie) par volume analysé par unité d'analyse.
- 3.2.2. Le domaine de quantification pour cette méthode se situe entre 20 et 60 UFC de coliformes thermotolérants (fécaux).
- 3.2.2.1. Le nombre total de colonies de toutes sortes doit être inférieur à 200 par membrane.
- 3.2.2.2. 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 :

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 3 de 15

- **TNI ou "colonies trop nombreuses pour être identifiées"**, signifie qu'il y a un nombre indéterminable de colonies sans égard à leur identité.

### 3.3. **Performance**

#### 3.3.1. **Sensibilité**

3.3.1.1. Le résultat obtenu pour la sensibilité (fraction de tous les résultats positifs correctement attribuée dans le comptage présumé) lors de la vérification de méthode de 2011 est de 94%.

#### 3.3.2. **Spécificité**

3.3.2.1. Le résultat obtenu pour la spécificité (fraction de tous les résultats négatifs correctement attribuée dans le comptage présumé) lors de la vérification de la méthode de 2011 est évalué à 43%.

#### 3.3.3. **Sélectivité**

3.3.3.1. Le résultat obtenu pour la sélectivité (proportion des colonies typiques observées par rapport au nombre total de colonies typiques et atypiques) lors de la vérification de méthode de 2011 est évalué à 79%.

#### 3.3.4. **Efficacité**

3.3.4.1. Le résultat obtenu pour l'efficacité (nombre de colonies typiques ou atypiques classées correctement lors de la confirmation) lors de la vérification de la méthode en 2011 est évalué à 73%.

#### 3.3.5. **Taux de faux positifs**

3.3.5.1. Le taux de colonies classées faussement positives sur le milieu m-FC lors de la vérification de la méthode de 2011 est évalué à 29%.

#### 3.3.6. **Taux de faux négatifs**

3.3.6.1. Le taux de colonies classées faussement négatives sur le milieu m-FC lors de la vérification de la méthode de 2011 est évalué à 19%.


### 3.4. **Fidélité**

#### 3.4.1. Fidélité intermédiaire

3.4.1.1. Suite aux tests réalisés en laboratoire en 2012, la fidélité intermédiaire obtenue pour la méthode est de 14.2%.

#### 3.4.2. Répétabilité

3.4.2.1. Suite aux tests réalisés en laboratoire en 2012, la répétabilité obtenue pour la méthode est de 10.6%.

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 4 de 15

3.4.3. Le paramètre de reproductibilité n'est requis que lorsque la méthode est développée à l'interne.

### 3.5. **Justesse**

3.5.1. La justesse est supérieure à 98%.

### 3.6. **Récupération**


3.6.1. Le pourcentage de récupération obtenu en laboratoire sur 5 échantillons naturels est de 90%.


## 4. **PRÉLÈVEMENT ET CONSERVATION**

Les échantillons sont prélevés et conservés selon le document n° L-CR-5.8-001, *Contenants, modes et délais de conservation pour les échantillons d'eau*.

## 5. **APPAREILLAGE, ACCESSOIRES ET DOCUMENTS QUALITÉ REQUIS**

- 5.1. Membranes filtrantes stériles quadrillées de porosité de 0,45 µm et de 47 mm de diamètre
- 5.2. Pipettes stériles de 11,0 ml et 1,0 ml de type TD
- 5.3. Sondes de température ou thermomètres (permettant une lecture à 0,1 °C)
- 5.4. Pincettes en acier inoxydable à bouts plats
- 5.5. Sondes d'humidité ou hygromètre
- 5.6. Barreau magnétique
- 5.7. Boîtes de Pétri d'environ 49 mm x 9 mm
- 5.8. Fil droit en nichrome ou boucle d'inoculation
- 5.9. Flacon laveur en Téflon et bouteille en polypropylène pour l'eau de rinçage
- 5.10. Tubes à essais de 16 mm x 125 mm et de 13 mm x 100 mm stériles et non-fluorescents aux rayons ultraviolets
- 5.11. Verrerie
- 5.12. Stérilisateur
- 5.13. Balance analytique
- 5.14. Brûleur à gaz
- 5.15. Pompe à vide (pression de 69 kPa)

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 5 de 15


- 5.16. Rampe de filtration
- 5.17. Entonnoirs et supports de filtres
- 5.18. Stérilisateur à rayons UV
- 5.19. Électromètre
- 5.20. Bain-thermostaté avec agitation à 44,5 °C ± 0,2 °C
- 5.21. Plaque chauffante avec agitation
- 5.22. Réfrigérateur de 2 °C à 5 °C
- 5.23. Stéréoscope avec lampe fluorescente
- 5.24. Sacs en polyéthylène
- 5.25. Scelleuse
- 5.26. Lampe UV à large spectre
- 5.27. Applicateurs en bois stériles
- 5.28. Comparateur Colilert®/Colitag™, acheté commercialement
- 5.29. Incubateur à 35 °C ± 0,5 °C
- 5.30. Bain-thermostaté avec agitation de 44 °C à 47 °C
- 5.31. Chronomètre
- 5.32. Lunettes de protection
- 5.33. Pour la consultation des documents liés à la méthode, cliquer sur l'icône  « lien vers la documentation » dans le logiciel Isovision.

## 6. **MILIEUX DE CULTURE, RÉACTIFS ET ÉTALONS**

Les milieux et réactifs énumérés ci-après sont offerts sur le marché et/ou doivent être préparés et stérilisés selon les instructions du fabricant. Consulter le document de préparation de milieux de culture, solutions et réactifs afin de connaître le mode opératoire pour chacun d'eux.

### 6.1. **Milieux de culture et produits spéciaux utilisés au laboratoire**

- 6.1.1. Eau dont la conductivité est < que 2 µmhos/cm ou la résistivité est > que 0,5 MΩ/cm
- 6.1.2. Alcool 95%

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 6 de 15

- 6.1.3. Désinfectant en vigueur
- 6.1.4. Eau peptonée de dilution et de rinçage
- 6.1.5. Gélose m-FC
- 6.1.6. Gélose trypticase de soya (TSA)
- 6.1.7. Gélose infusion cœur-cervelle

## 6.2. Souches contrôles

### 6.2.1. Témoins positifs


- *Escherichia coli* ATCC 25922 ou équivalent (milieu m-FC et test ONPG-MUG)
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488 ou équivalent (Test ONPG-MUG)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 ou équivalent (Test oxydase)

### 6.2.2. Témoins négatifs

- *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 ou équivalent (milieu m-FC)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 ou équivalent (Test ONPG-MUG)
- *Escherichia coli* ATCC 25922 ou équivalent (Test d'oxydase)
- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 31488 ou équivalent (Test d'oxydase)

## 6.3. Réactif

- 6.3.1. Substrat enzymatique (Colilert® ou Colitag™) en tubes pour les épreuves de l'ONPG et du MUG.
- 6.3.2. Bandelettes pour la détection de la cytochrome-oxydase (trousse commerciale) : Garder à température pièce (15 à 30 °C), à l'abri de la lumière jusqu'à la date d'expiration. Sceller les pochettes ouvertes, et les conserver pour une durée maximale de 7 jours. Inscrire la date d'ouverture sur le sachet.
- 6.3.3. Acide chlorhydrique (HCl) : liquide de qualité ACS ou supérieure
- 6.3.4. HCl 1N
- 6.3.5. Hydroxyde de sodium (NaOH) : sel de qualité ACS ou supérieure
- 6.3.6. NaOH 1N
- 6.3.7. NaOH 0.2N : Faire les dilutions nécessaires d'une solution de NaOH afin d'obtenir 0.2N.


Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 7 de 15

## 7. PROCÉDURE ANALYTIQUE

### 7.1. Témoin de la stérilité (absence de coliformes) des entonnoirs et supports de filtre

**Note :** Le contrôle doit être effectué à tous les dix (10) échantillons. Dans le cas où les analyses demandées sont combinées (coliformes totaux et coliformes thermotolérants (fécaux)), le témoin de stérilité peut être fait avec le milieu de culture pour les coliformes totaux.

- 7.1.1. Allumer le stérilisateur à rayons UV (5.18) et vérifier à l'aide des lunettes de protection (5.32) que les UV fonctionnent.
- 7.1.2. Allumer le brûleur à gaz (5.14).
- 7.1.3. Nettoyer la surface de travail avec le désinfectant en vigueur (6.1.3).
- 7.1.4. Placer les entonnoirs et les supports de filtres (5.17) dans le stérilisateur à rayons ultraviolets pendant au moins deux minutes. Calculer le temps à l'aide d'un chronomètre (5.31).
- 7.1.5. Mettre les supports sur la rampe de filtration (5.16).
- 7.1.6. Mettre en fonction la pompe à vide (5.15).
- 7.1.7. Prendre une membrane filtrante stérile (5.1) par son rebord avec une pincette (5.4) stérilisée à l'alcool (6.1.2) et flambée au brûleur et la déposer sur le support de filtre.
- 7.1.8. Placer l'entonnoir sur le support. Tourner le collier de serrage de l'entonnoir au besoin.
- 7.1.9. Fermer les robinets de la rampe de filtration pour couper le vide.
- 7.1.10. Avec le flacon laveur (5.9) rempli aseptiquement avec de l'eau de rinçage, verser environ 50 ml d'eau de rinçage (6.1.4) dans chacun des trois entonnoirs.
- 7.1.11. Ouvrir les robinets de la rampe de filtration pour filtrer l'eau de rinçage.
- 7.1.12. Retirer les entonnoirs et déposer chacune des membranes filtrantes à l'aide de la pincette stérile (en la prenant par le rebord) sur une gélose m-FC (6.1.5).
- 7.1.13. Bien identifier les boîtes avec le numéro de l'entonnoir correspondant.
- 7.1.14. Placer les boîtes de Pétri dans des sacs en polyéthylène étanches (5.24), les fermer hermétiquement avec la scelleuse (5.25) et les immerger complètement en position inversée dans un bain thermostaté à  $44,5 \pm 0,2$  °C pendant  $24 \pm 2$  heures.

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 8 de 15


## 7.2. Filtration des échantillons

- 7.2.1. Placer les entonnoirs et les supports de filtres dans le stérilisateur à rayons ultraviolets pendant deux minutes. Calculer le temps à l'aide d'un chronomètre.
- 7.2.2. Mettre les supports sur la rampe de filtration.
- 7.2.3. Mettre en fonction la pompe à vide.
- 7.2.4. Agiter vigoureusement l'échantillon d'un mouvement vertical.
- 7.2.5. Prendre une membrane filtrante stérile par son rebord avec une pincette stérilisée à l'alcool et flambée au brûleur, et la déposer sur le support de filtre.
- 7.2.6. Placer l'entonnoir sur le support. Tourner le collier de serrage de l'entonnoir au besoin.
- 7.2.7. Fermer les robinets de la rampe de filtration pour couper le vide.
- 7.2.8. Lorsque des échantillons sont soupçonnés d'être fortement contaminés, des bouteilles de dilution contenant de l'eau peptonée doivent être utilisées de façon à obtenir, pour un volume donné d'échantillon, un compte bactérien se situant dans les limites de quantification mentionnées au point 3.2.2.
- 7.2.9. Les dilutions sont effectuées en pipettant initialement 11 ml de l'échantillon dans une bouteille de 99 ml d'eau peptonée.
- 7.2.10. Répéter l'opération jusqu'à la dilution désirée en changeant de pipette entre chaque dilution.
- 7.2.11. Verser dans l'entonnoir les volumes requis, selon la nature de l'échantillon (voir le tableau ci-dessous).

Provenance de l'eau	Volumes
Eaux propres traitées ou non traitées, eaux souterraines (puits)	100ml
Eaux de surface (rivières, lacs, plages, etc.)	50, 10, 1ml
Eaux usées domestiques, municipales, industrielles, etc.	10 et 1ml de chacune des dilutions*
Boues d'eaux usées industrielles, municipales, domestiques, etc. Sols, déchets solides et sédiments contaminés	10 et 1ml de chacune des dilutions effectuées à partir de la suspension dans l'eau tamponnée*

\*Des volumes supérieurs ou inférieurs pourraient être filtrés, selon la turbidité de l'échantillon analysé.



Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 9 de 15

**Note** : Pour les volumes inférieurs à 50 ml, verser au préalable environ 20 ml d'eau peptonée de rinçage et ajouter ensuite à la pipette (5.2) les volumes désirés afin d'avoir une bonne distribution des bactéries sur la membrane. Laisser couler l'échantillon en appuyant le bout de la pipette sur l'épaulement interne de l'entonnoir.

Pour les volumes de 50 ml et plus, verser directement dans l'entonnoir.

- 7.2.12. Ouvrir les robinets de la rampe de filtration pour filtrer l'échantillon.
- 7.2.13. Rincer au moins deux fois la paroi intérieure de l'entonnoir avec environ 20-30 ml d'eau de rinçage en utilisant un flacon laveur.
- 7.2.14. Retirer l'entonnoir et déposer la membrane filtrante à l'aide de la pincette stérile (en la prenant par le rebord) sur une gélose m-FC préalablement identifiée avec le numéro d'échantillon et le volume filtré.

**ATTENTION: Déposer la membrane en la roulant sur la gélose pour obtenir un contact étroit de façon à éviter la présence de bulles d'air (taches blanches).**

- 7.2.15. Le plus rapidement possible après la filtration, placer les boîtes de Pétri dans des sacs en polyéthylène étanches (5.24), les fermer hermétiquement avec la scelleuse (5.25) et les immerger complètement en position inversée dans un bain thermostaté à  $44,5 \pm 0,2$  °C pendant  $24 \pm 2$  heures. L'inversion des boîtes empêche la condensation sur les membranes.

### 7.3. Témoins positif et négatif

7.3.1. Strier les souches de *E.coli* (6.2.1) et de *E. faecalis* (6.2.2) sur des géloses m-FC.

7.3.2. Préparer une série de témoins pour les analyses faites en avant-midi et une autre série de témoins pour les analyses faites en après-midi.

**Note** : Chacun des bains thermostatés utilisés pour l'incubation devrait contenir au minimum une série de témoins pour accompagner les échantillons.


7.3.3. Incuber les géloses des témoins avec les échantillons. Voir le point 7.2.15.

### 7.4. Observation des résultats

7.4.1. Préparation des boîtes de Pétri

7.4.1.1. Après la période d'incubation, sortir et ranger les boîtes de Pétri (7.3.12) par ordre de numéro d'échantillon.

7.4.1.2. Généralement, l'observation des membranes s'effectue le plus tôt possible après leur sortie du bain thermostaté.

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 10 de 15

#### 7.4.2. Dénombrement et identification

7.4.2.1. Vérifier dans les boîtes de Pétri des témoins de la stérilité des entonnoirs (7.1.13) qu'il n'y a aucune croissance bactérienne.

7.4.2.2. Vérifier les boîtes de Pétri des témoins positif et négatif (7.2.3). Il devrait y avoir croissance avec des colonies typiques (voir la description des colonies en 7.4.2.5) pour la gélose ensemencée avec *E. coli* et absence de croissance sur la gélose ensemencée avec *E. faecalis*.

7.4.2.3. S'il y a présence de coliformes dans les boîtes de Pétri des témoins de la stérilité (voir la description des colonies en 7.4.2.5) ou qu'il n'y a pas de croissance sur la gélose ensemencée avec *E. coli*, aviser le responsable technique.

7.4.2.4. Choisir les membranes sur lesquelles il y a entre 20 et 60 colonies typiques et pas plus de 200 colonies de toutes sortes.

7.4.2.5. Les colonies typiques de coliformes thermotolérants (fécaux) sur gélose m-FC sont **bleues pâles à bleues foncées**.

7.4.2.6. Si la lecture est difficile, effectuer les observations à l'aide d'un stéréoscope. Le grossissement recommandé est de 10X à 15X.

7.4.2.7. En cas de doute, procéder à la confirmation biochimique (section 7.6).

#### 7.5. Enregistrement des résultats

7.5.1. Inscrire sur le document n° F-CR-5.10-064 *Analyse d'eau par membrane filtrante*, le nombre de colonies typiques et atypiques\* pour chaque volume d'eau filtrée.


\*NOTE : Pour les besoins du laboratoire, enregistrer les colonies typiques seulement ou inscrire >200 si le nombre de colonies typiques et atypiques dépassent 200.

7.5.2. Reporter le résultat par 100 ml.

#### 7.6. Confirmation

La technique décrite précédemment est une méthode de dénombrement et d'identification **présomptive** des coliformes thermotolérants (fécaux). Cette désignation signifie que les bactéries isolées sont reconnues comme la bactérie cible recherchée, à l'aide d'une seule réaction biochimique caractéristique. Dans certains cas (ex. : en cas de doute sur l'observation, à la demande client, etc.), il peut être souhaitable de vérifier que les coliformes thermotolérants (fécaux) mis en évidence à l'étape présomptive appartiennent à l'espèce *E.coli*.

Le degré de certitude avec lequel le technicien doit préciser l'identification de la bactérie isolée détermine l'ampleur que prendra la confirmation. Elle peut être sommaire en indiquant

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 11 de 15

l'appartenance ou non au groupe des coliformes avec les épreuves traditionnelles (oxydase, ONPG et MUG) ou aller à une identification plus complète à l'aide de systèmes d'identification biochimique (ex : API 20E, Entérotube, analyseur biochimique Vitek).

Utiliser des témoins positifs et négatifs (6.2.1 et 6.2.2) à chacune des étapes de confirmation.

### 7.6.1. Taux de confirmation

7.6.1.1. Lorsqu'effectuée, et par souci de commodité, d'efficacité, de rapidité et de coût, la confirmation devrait se faire sur au moins 5 colonies suspectes ou selon un nombre évalué à 10% des colonies présentes sur la plaque.

7.6.1.2. Maintenir en tout temps la fréquence minimale de confirmation de cinq (5) colonies typiques et cinq (5) colonies atypiques sur une base hebdomadaire.

7.6.1.3. Conformément au Règlement sur la qualité de l'eau potable (RQEP) articles 22 et 53, le laboratoire doit confirmer les colonies typiques de coliformes fécaux pour les **échantillons d'eaux brutes du RQEP** de la façon suivante pour produire des résultats en *E.coli* :

7.6.1.3.1. Confirmer et enregistrer un minimum de deux (2) colonies typiques pour les échantillons ayant une numération inférieure à 30 UFC par membrane. De plus, au moins une colonie par morphologie coloniale différente doit être confirmée.

7.6.1.3.2. Confirmer et enregistrer 10% des colonies typiques jusqu'à concurrence de cinq (5) colonies pour les échantillons ayant une numération supérieure à 30 UFC par membrane. De plus, au moins une colonie par morphologie coloniale doit être confirmée.


### 7.6.2. Propagation des souches suspectes

7.6.2.1. À l'aide d'une boucle d'inoculation ou d'un fil droit (5.8), prélever une colonie bien isolée sur la gélose m-FC (7.4.2.4) et l'étaler en stries sur la pente d'un tube de gélose trypticase de soya (TSA) (6.1.6) et incubé à  $35 \pm 0,5$  °C (5.29) pendant 18 à 24 heures.

### 7.6.3. Épreuve de l'ONPG et du MUG (substrat enzymatique)

7.6.3.1. Inoculer un tube de substrat enzymatique (6.3.1) à partir de la culture obtenue sur le tube de TSA (7.6.2.1) ou directement de la colonie (7.4.2.4) et l'incuber à  $35 \pm 0,5$ °C pendant  $24 \pm 2$  heures.

7.6.3.2. Après l'incubation, une coloration jaune indique l'hydrolyse de l'ONPG et confirme la présence de coliformes totaux. En plus de la coloration jaune, une fluorescence observée à l'aide de la lampe UV indique la métabolisation du MUG et confirme la présence de *E.coli*.

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 12 de 15

7.6.3.3. [Un milieu incolore correspond à une réaction négative et confirme une colonie de bactéries non coliforme.](#)

7.6.3.4. [Il est possible d'effectuer l'observation des tubes après 4 heures d'incubation. En cas de réaction négative, poursuivre l'incubation jusqu'à 24 heures.](#)

7.6.4. Épreuve de la cytochrome-oxydase

7.6.4.1. À partir de la culture obtenue sur le tube de TSA (7.6.2.1), à l'aide d'un applicateur en bois stérile (5.27), effectuer un frottis de chaque colonie étudiée sur une lame oxydase (6.3.2).

7.6.4.2. L'apparition d'une couleur pourpre foncée dans les 20 secondes indique une réaction positive. Tout développement de couleur après les 20 secondes prescrites ne doit pas être considéré.

7.6.4.3. L'absence de réaction ou un virement de couleur au gris clair indique une réaction négative et confirme qu'il s'agit d'une colonie de bactéries coliformes qui ne possèdent pas d'enzyme cytochrome-oxydase.

7.6.5. Suite aux confirmations, les résultats peuvent être émis en termes de «coliformes thermotolérants (fécaux) confirmés» ou de «*Escherichia coli*». Les 2 appellations sont équivalentes.


7.6.6. Pourcentage de confirmation

7.6.6.1. Inscrire dans le document n° F-CR-5.10-094, *Confirmation des colonies par la méthode de membranes filtrantes*, le nombre et le pourcentage de colonies qui, selon la confirmation précédente, sont reconnues comme étant des *E.coli*. Établir le pourcentage de confirmation comme suit :

$$\% \text{ de confirmation} = \frac{\text{nombre de colonies confirmées}}{\text{nombre de colonies testées}} \times 100$$

**Exemple :** Si cinq colonies sur le milieu m-FC ont été soumises à la confirmation et si trois de ces colonies se sont avérées être des *E.coli*, le pourcentage de confirmation s'exprime ainsi :

$$\% \text{ de confirmation} = \frac{3}{5} \times 100 = 60\%$$

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 13 de 15

## 8. CALCUL ET EXPRESSION DES RÉSULTATS

### 8.1. Échantillons d'eau potable, d'eau de surface et d'eaux usées

De façon générale, choisir la ou les membranes avec le nombre de colonies acceptables, de préférence à l'intérieur des limites de quantification (3.2.2), et exprimer le résultat en unités formant des colonies (UFC) par 100 ml d'échantillon selon l'équation suivante :

$$UFC/100\text{ ml} = \frac{\text{nombre de colonies de coliformes thermotolérants (fécaux)} \times 100}{\text{volumes d'échantillon analysés en ml}}$$

Dans les cas où une confirmation est effectuée, appliquer le pourcentage de confirmation au résultat précédent.

$$UFC/100\text{ ml confirmées} = UFC/100\text{ ml présumées} \times \% \text{ de confirmation}$$

### 8.2. Dénombrement à l'intérieur des limites de quantification

8.2.1. Calculer le résultat en ne retenant que les membranes sur lesquelles il y a 20 à 60 colonies.

8.2.1.1. Si des volumes d'échantillon filtrés de 100 ml, 50 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml 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 générale:

$$\frac{25 \times 100}{10} = 250\text{ UFC}/100\text{ ml}$$

8.2.1.2. Si des volumes d'échantillon filtrés de 10,0 ml, 1,0 ml, 0,1 ml et 0,01 ml produisent respectivement des dénombrements de 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) et calculer le résultat à l'aide de l'équation générale:


$$\frac{55 + 30}{1,0 + 0,1} \times 100 = 7\,727\text{ UFC}/100\text{ ml}$$

### 8.3. Dénombrement à l'extérieur des limites de quantification

8.3.1. Dénombrement lorsque le nombre de colonies isolées sur les membranes sont **inférieures** à la limite de quantification.

8.3.1.1. Additionner toutes les colonies sur **l'ensemble** des membranes tout en tenant compte du volume de l'échantillonensemencé et exprimer le résultat par 100 ml.

8.3.1.1.1. Si deux volumes d'échantillon filtrés de 50 ml produisent respectivement 5 et 3 colonies :

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 14 de 15

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

8.3.1.1.2. Si des volumes d'échantillon filtrés de 50 ml, 10 ml, et 1 ml 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 lorsqu'**aucune** colonie n'a été isolée sur les membranes correspondant à plusieurs volumes d'échantillon filtrés.

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

8.3.2.1.1. Si des volumes d'échantillons filtrés de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml produisent tous des dénombrements de 0 colonie, calculer le nombre de colonies par 100 ml qui aurait été rapporté, s'il y avait eu une (1) colonie sur la membrane du grand volume d'échantillon utilisé:

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

Transmettre ce résultat comme étant: < 10 UFC/100 ml

8.3.3. Dénombrement lorsque tous les résultats de plusieurs volumes d'échantillon filtrés sont **au-delà** de la limite supérieure de quantification.

8.3.3.1. Calculer le résultat à l'aide du plus petit volume d'échantillon filtré utilisé.

8.3.3.1.1. Si des volumes de 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml produisent respectivement 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 (60 pour les coliformes thermotolérants (fécaux)) et à l'aide du plus petit volume d'échantillon utilisé (0,01 ml) :


$$\frac{60}{0,01} \times 100 = 600\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant : >600 000 UFC/100ml

8.3.4. Dénombrement lorsque les colonies ne sont **pas suffisamment isolées** pour réussir un dénombrement adéquat (TNC)

8.3.4.1. Calculer le résultat à l'aide de la limite de quantification et de plus faible volume d'échantillon utilisé.

8.3.4.1.1. Si des volumes d'échantillon filtrés de 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml produisent sur les membranes des colonies non distinctes (TNC), estimer le résultat à l'aide de la limite de

Émis par : Division de l'expertise technique <b>Montréal</b> 	<b>Méthode</b>	No : <b>M-CR-5.4-022</b>
	Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce <i>Escherichia coli</i>	Version : 7.1.0
		Page : 15 de 15

quantification (60 pour les coliformes thermotolérants (fécaux)) et du plus faible volume d'échantillon filtré (0,01 ml):

$$\frac{60}{0.01} \times 100 = 600\,000 \text{ UFC}/100 \text{ ml}$$

Transmettre ce résultat comme étant >600 000 UFC/100 ml

## 9. RÉFÉRENCES

- 9.1. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION AND WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 22e édition, 2012.
- 9.2. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Lignes directrices concernant les travaux analytiques en microbiologie*, DR-12-SCA-02, Québec, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques, 2018, 38 p.
- 9.3. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (fécaux) et confirmation à l'espèce Escherichia coli : méthode par filtration sur membrane*, MA. 700 – Fec.Ec 1.0, Rév. 5, Ministère du Développement durable, de l'Environnement et de la Lutte contre les changements climatiques du Québec, 2014, 20 p.
- 9.4. CENTRE D'EXPERTISE EN ANALYSE ENVIRONNEMENTALE DU QUÉBEC, *Protocole pour la Validation et la Vérification d'une Méthode d'Analyse en Microbiologie*, DR-12-VMM, Québec, Centre d'expertise en analyse environnementale du Québec, 6 février 2012.