

Recherche et dénombrement des coliformes en milieu liquide

Cette manipulation vise à la recherche des coliformes totaux et fécaux dans un échantillon d'eau et à leur dénombrement éventuel par colimétrie afin de détecter la présence d'une contamination d'origine fécale.

Pour le dénombrement des coliformes, deux méthodes standard sont utilisées :

- La technique de filtration membranaire.
- La technique de fermentation en tubes multiples FTM

La technique FTM permet l'identification des coliformes grâce à leur capacité à fermenter le lactose avec production d'acides et de gaz. Cette technique fournit le nombre le plus probable (NPP) de coliformes après croissance sur milieu liquide, elle comprend deux tests :

- Le test présomptif : pour détecter la présence de coliformes totaux.
- Le test de confirmation : appelé test McKenzie, utilisé pour détecter la présence de coliformes fécaux dans les tubes positifs du test présomptif.

I. Matériel :

- Milieux de culture :
 - bouillon lactosé : Bromocresol Purple Lactose Broth (BCPL) de concentration simple et double contenant la cloche de Durham
 - Milieu de Schubert avec cloche de Durham.
- Pipettes stériles
- Flacon stérile
- Etuve.

II. Mode opératoire

II.1. Échantillonnage

1. Nettoyer et flamber l'orifice du robinet ;
2. Laisser couler l'eau pendant 3 minutes ;
3. Remplir le flacon stérile avec de l'eau à analyser.

II.2. Test présomptif

1. À l'aide de pipettes stériles, transférer aseptiquement :

- 10 ml de l'échantillon dans 10 ml du milieu BCPL double concentration (répéter 3 fois).
- 1 ml de l'échantillon dans 10 ml du milieu BCPL de concentration simple (3 fois).
- 0,1 ml de l'échantillon dans 10 ml du milieu BCPL simple concentration (3 fois).

2. Homogénéiser l'échantillon pour assurer une distribution homogène de micro-organismes.

3. Incuber les tubes à 37°C pendant 24h. Si aucun tube n'apparaît positif, ré-incuber jusqu'à 48 heures.

4. Après incubation, noter les tubes positifs de chaque dilution en observant la croissance (turbidité), le changement de couleur du milieu dû à la production d'acide ainsi que la production de gaz dans la cloche de Durham.

5. Calculez le nombre le plus probable (NPP) selon le tableau Mac GRADY pour estimer le nombre de coliformes par 100 ml d'échantillon d'eau.

Remarque : Si le test présomptif est négatif, le test de confirmation n'est pas nécessaire et l'eau est considérée comme microbiologiquement sûre.

II.3. Le test de confirmation

1. Transférer 1 ml de chaque tube positif dans un tube contenant le milieu Schubert.

2. Incuber à 44,5 °C pendant 24 à 48 h

3. Les tubes avec turbidité et production de gaz sont positifs.

4. Ajoutez 2-3 réactifs de Kovacs aux tubes positifs : l'apparition d'un "anneau rouge cerise" dans la couche supérieure indique la présence de coliformes fécaux.