

TP 01 : Recherche et dénombrement des coliformes dans un échantillon d'eau par colimétrie

Objectif

Rechercher et dénombrer les coliformes totaux, coliformes thermotolérants et *Escherichia coli* dans un échantillon d'eau, en appliquant la colimétrie selon la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). Ces tests permettent de détecter une contamination fécale et d'en évaluer l'importance.

I. Matériel

- Flacon stérile pour échantillonnage
- Milieux de culture :
 - BLBVB (Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant) + cloche de Durham
 - Milieu de Schubert (avec cloche de Durham)
- Réactif de Kovacs

II. Mode opératoire

II.1. Échantillonnage

1. Nettoyer et flamber l'orifice du robinet.
2. Laisser couler l'eau pendant 2 à 3 minutes.
3. Prélever l'échantillon dans un flacon stérile.

II.2. Test présomptif (recherche des coliformes totaux)

- Ensemencer :
 - ✓ Une série de tubes avec 10 ml d'échantillon + 10 ml BLBVB double concentration
 - ✓ Une série tubes avec 1 ml d'échantillon + 10 ml BLBVB simple concentration
 - ✓ Une série tubes avec 0,1 ml d'échantillon + 10 ml BLBVB simple concentration
- Incubation 24 h à **30 °-37 °C**, puis lecture :
 - ✓ Tube **positif** : turbidité + **gaz** dans la cloche (au moins 1/10 du volume)
 - ✓ Calculer le Nombre le Plus Probable (NPP) à l'aide de la table de Mac Grady
- Attribuer une valeur de "1" aux tubes positifs et "0" aux tubes négatifs.
- Construire un triplet de résultats correspondant au nombre de tubes positifs.
- Rechercher ce triplet dans la table de Mac Grady, afin d'obtenir la valeur statistique du Nombre le Plus Probable (NPP) de coliformes contenus dans le volume total analysé.
- Calculer la concentration estimée de coliformes totaux pour 100 mL d'eau

II.3. Test de confirmation (Coliformes thermotolérants et *E. coli*)

Ce test a pour but de confirmer la présence de coliformes thermotolérants (ou coliformes fécaux) dans un échantillon d'eau ayant donné un résultat positif au test présomptif.

- Transférer 1 mL de chaque tube BLBVB présomptif positif dans un tube de milieu de Schubert (avec cloche de Durham).
- Incuber les tubes à 44,5 °C pendant 24 à 48 heures.
- Le test de Schubert est positif si le micro-organisme est capable de :
 - Fermenter le mannitol
 - Croître à 44,5 °C
 - Produire du gaz (visible dans la cloche)

Cela indique la **présence de coliformes fécaux**

- Ajouter quelques gouttes de réactif de Kovacs pour vérifier la production d'indole (indique *E. coli* si anneau rouge cerise apparaît).

Table de Mac Grady

Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP	Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP
0	0	0	< 0,3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	2	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2,3
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	2	3	29
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	> 110