



METHODES USUELLES D'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE
POUR LE CONTROLE SANITAIRE COURANT
DES EAUX DE MER ET DES COQUILLAGES

**METHODES USUELLES D'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE
POUR LE CONTROLE SANITAIRE COURANT
DES EAUX DE MER ET DES COQUILLAGES**

SOMMAIRE

	Pages	
I	Introduction	
II	Nettoyage de la verrerie et stérilisation	5
III	Milieux de culture	7
IV	Techniques d'ensemencement "Eaux et Coquillages"	8
	A) Préparation de l'échantillon	8
	B) Ensemencement en milieux liquides	10
	C) Ensemencement sur milieux gélosés	13
	D) Méthodes de concentration des germes	14
V	Tables N.P.P. de dénombrement des germes	17
VI	Expression des résultats	18
VII	Recherche et dénombrement des coliformes	28
	A) Coliformes totaux et Coliformes fécaux : méthode utilisant le bouillon lactosé à la bile et au vert brillant	28
	B) Coliformes fécaux : méthode utilisant le milieu expérimental au Mannitol	30
VIII	Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux	33
IX	Recherche des Vibrio parahaemolyticus	35
X	Recherche des Salmonella	45
XI	Recherche des Clostridium sulfito-réducteurs	52
XII	Technique de coloration des bactéries et méthode de Gram	54
XIII	Préparation du réactif pour la recherche de l'indole	57
	Références bibliographiques	58

Ouistreham, le 10 avril 1981

J. Mazières

1 - INTRODUCTION

1 - BASE MICROBIOLOGIQUE DU CONTROLE SANITAIRE

Le contrôle sanitaire des eaux de mer et des coquillages a pour but de garantir aux consommateurs des produits sans risque pour leur santé. Sont à redouter les germes pathogènes qui se transmettent par voie hydrique tels que les salmonelles (fièvres typhoïdes), les shigelles (dysenteries), les vibrions (choléra) et certains virus comme ceux responsables des hépatites infectieuses. La présence d'organismes pathogènes constituent une preuve convaincante d'une pollution dangereuse, mais leur nombre est souvent limité dans le milieu et leur mise en évidence difficile à cause de la durée, du coût et parfois de l'insuffisance des techniques d'analyses actuelles. De plus, si on fait de leur présence le critère de refus de mise à la consommation des denrées éminemment périssables comme les coquillages, on risque de voir consommer celles-ci avant qu'un diagnostic soit fait et que des mesures prophylactiques soient prises.

2 - NOTION DE GERMES INDICATEURS DE CONTAMINATION

Le but véritable de l'hygiéniste ne sera donc pas, dans le plupart des cas, de déceler la présence effective de bactéries pathogènes dans l'eau ou les coquillages, mais de définir les circonstances dans lesquelles cette présence est vraisemblable. Les germes pathogènes ci-dessus sont normalement rejetés par l'homme et les animaux à sang chaud par voie intestinale. La mise en évidence d'une contamination fécale constitue donc un excellent signal d'alarme et permet d'évaluer les risques encourus par le consommateur éventuel. Une telle contamination peut être décelée par la présence d'une bactérie ou d'un groupe de bactéries particulièrement nombreuses dans la flore intestinale. On s'est accordé à retenir comme organismes témoins les coliformes fécaux pour les raisons suivantes

...

- ils sont toujours présents dans les fécès en concentrations beaucoup plus grandes que les germes pathogènes (10^9 - 10^{10} coliformes/g de matières fécales) ;
- ils ont une résistance aux agents antiseptiques, notamment au chlore et à ses dérivés, voisine de celle des bactéries pathogènes à l'encontre desquelles ces produits sont employés ;
- ils produisent des réactions caractéristiques permettant leur mise en évidence par des techniques simples à la portée de tous les laboratoires.

Sous la dénomination de coliformes sont regroupées plusieurs espèces bactériennes appartenant à la famille des entérobactéries et qui, au sein de celle-ci, fermentent le lactose avec production de gaz en moins de 48 heures. Cette réaction n'étant pas spécifique, les coliformes constituent un rassemblement assez hétéroclite du point de vue taxonomique. Bien que tous les coliformes puissent exister dans les matières fécales, certains sont aussi les hôtes habituels du sol et des eaux tandis que d'autres ne peuvent vivre que dans le seul habitat fécal. La présence de ces derniers dans une eau ou dans des coquillages est la preuve d'une contamination d'origine fécale alors que celle des premiers n'est pas probante. *Escherichia coli* est le type de coliforme d'habitat fécal exclusif, mais on estime que, parmi les germes appartenant aux autres genres, ceux qui vivent dans l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud acquièrent des propriétés spéciales caractéristiques de cet habitat dont la plus notable est une meilleure résistance aux températures de culture élevées.

Du point de vue pratique, cela se traduit par l'existence de trois types d'examens colimétriques :

- la recherche et le dénombrement de l'ensemble des coliformes (coliformes totaux) sans préjuger de leur appartenance taxonomique et de leur origine. Ce type d'examen, capital pour la vérification de l'efficacité d'un traitement antiseptique, présente peu d'intérêt pour déceler une contamination fécale étant donné son manque de spécificité ;
- la recherche et le dénombrement des seuls *Escherichia coli*, examen ayant une base taxonomique ;
- la recherche et le dénombrement des coliformes fécaux, examen sans base taxonomique, mais qui met en évidence des germes ayant la même signification pour

...

l'hygiène. La très grande majorité des coliformes fécaux est constituée par *Escherichia coli* d'où l'excellente concordance avec la numération de *E. coli* qui implique une identification systématique.

Pour toutes ces raisons, le contrôle sanitaire courant des eaux de mer et des coquillages repose sur la recherche et le dénombrement des coliformes fécaux qui sont considérés à l'heure actuelle comme les meilleurs germes indicateurs d'une contamination fécale.

3 - METHODES D'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DE L'EAU ET DES COQUILLAGES

L'analyse bactériologique proprement dite se pratique selon deux types de méthodes :

- les méthodes de dénombrement direct par comptage de colonies isolées après ensemencement sur ou dans un support nutritif solide,
- les méthodes de dénombrement indirect, par calcul statistique après répartition de l'inoculum dans un milieu de culture liquide.

Quel que soit le type de méthodes employé, le résultat de la numération n'est toujours qu'une approximation du nombre réel de germes présents dans l'échantillon analysé. De nombreuses causes d'erreur peuvent en effet influencer sur le résultat, par exemple l'homogénéisation, la réalisation des suspensions-mères et des dilutions, la qualification du manipulateur. De plus, la précision des techniques bactériologiques est faible : elles donnent une valeur qui se range à l'intérieur d'un intervalle de confiance plus ou moins large. Pour pallier cette incertitude et pour tenir compte de la sensibilité variable du consommateur, les normes bactériologiques imposées sont telles que la limite de sécurité n'est pas dépassée même si le nombre de germes trouvé est sous-estimé par rapport à la valeur réelle.

3.1. - Méthodes de dénombrement direct

Ces méthodes ne sont pas applicables aux coquillages. Elles sont parfois utilisées pour les eaux de mer. L'ensemencement a lieu sur un milieu gélosé sélectif, soit directement, soit après filtration d'un certain volume

...

d'eau sur une membrane et dépôt de celle-ci sur le milieu solide. Les bactéries donnent naissance dans des conditions favorables à des colonies typiques isolées les unes des autres, différentes suivant les espèces, et qui peuvent être comptées. Connaissant le volume d'eauensemencé ou filtré, le résultat final du dénombrement peut être exprimé en fonction d'un volume pris comme unité : par exemple n colonies pour 100 ml d'eau.

3.2. - Méthodes de dénombrement indirect

L'inoculum est réparti dans un certain nombre de tubes contenant un milieu de culture liquide. La présence de la bactérie ou du groupe de bactéries recherchées se manifeste par une réaction caractéristique. Un tube est considéré comme étant positif lorsqu'il est le siège de cette réaction caractéristique. On postule alors qu'il contenait à l'origine au moins un germe recherché. Une évaluation quantitative n'est possible qu'en jouant sur les volumes de la prise d'essai et en prenant comme hypothèse que les germes sont répartis de façon homogène dans l'inoculum : si l'ensemencement porte par exemple sur 10,1 et 0,1 ml d'inoculum dans trois tubes de milieu liquide, et si le germe recherché est présent seulement dans le premier de ces tubes, il y a au moins un germe dans 10 ml d'inoculum, mais il n'y en a pas dans 1 ou 0,1 ml. Si l'unité de volume d'expression du résultat est de 100 ml, il s'ensuit que le nombre de germes est compris entre 10 et 100 dans 100 ml d'inoculum. Afin d'affiner le dénombrement, plusieurs tubes par série sont ensemencés avec le même inoculum. Pour couvrir une gamme assez étendue de numérations, susceptibles de convenir à la plupart des besoins en hygiène conchylicole on est parfois amené à faire varier les volumes ensemencés par tube, le nombre de séries et l'échelonnement des dilutions décimales. D'ordinaire on répète l'ensemencement du même inoculum dans 3,4 ou 5 tubes d'une même série et on utilise trois séries dans lesquels les inoculums sont respectivement de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml.

...

II - NETTOYAGE DE LA VERRERIE ET STERILISATION

Les boîtes de gélose ayant servi à l'isolement des germes sont recouvertes d'une solution de javel durant 30 minutes avant nettoyage.

Ces boîtes, ainsi que les tubes de bouillon sont vidangés et lavés à l'eau chaude savonneuse, ou contenant un agent mouillant biodégradable. Lorsque des particules grasses demeurent à l'intérieur des récipients on peut utiliser des détersifs du commerce ou le mélange sulfo-chromique. Dans tous les cas, le rinçage doit être abondant et comporter au moins 5 lavages successifs pour éliminer toute trace de produits chimiques. Terminer par un rinçage à l'eau distillée ou désionisée afin d'éliminer, éventuellement, les "louches" dus à l'eau calcaire. L'utilisation d'un lave-pipette est souhaitable.

Après nettoyage du matériel ayant contenu des cultures, se laver soigneusement les mains au savon et les frictionner à l'alcool. Pour les manipulations de produits corrosifs (mélange sulfo-chromique notamment), utiliser des gants de caoutchouc.

Les créneaux des tiges de dispersion du broyeur Ultra-Turrax ainsi que les lames des bols du broyeur Waring-Blendor doivent être lavés et brossés afin d'éliminer les particules de chair de coquillages ou de byssus des moules.

Aire de travail

Disposer sur la paillasse une feuille de papier filtre propre, où seront déposés les coquillages en cours d'analyse.

Après chaque analyse ranger et nettoyer l'aire de travail de la paillasse à l'aide d'une éponge imbibée d'eau javelisée.

On doit se laver les mains après chaque analyse de coquillages.

Lorsqu'on procède à des examens de cultures pathogènes (Salmonelles, Vibrions...), prendre grand soin d'éviter toute dissémination intempestive de germes et nettoyer ensuite la paillasse à l'aide d'une solution javellisée. Se laver soigneusement les mains et les frictionner à l'alcool à 70° C.

...

Stérilisation

Verrerie - (pipettes, boîtes de pétri en verre, tubes, éprouvettes). Elle est protégée par du papier gris et du coton cardé ou des conteneurs appropriés, et stérilisée au four Pasteur pendant 30 minutes à 180° C. Eviter la carbonisation du papier ou du coton qui doit avoir une teinte "café au lait" claire à la sortie du four.

Petits instruments métalliques - (pinces, scalpels, couteaux à huîtres). On utilisera de préférence des scalpels entièrement métalliques. Ces instruments sont stérilisés au moment de l'emploi par trempage dans l'alcool à 90° et flambage. Le passage dans la flamme ne doit servir qu'à enflammer le fluide : l'instrument ne doit pas être maintenu dans la flamme. On peut utiliser l'alcool à brûler du commerce.

Matériel de broyage des coquillages -

- Bols de l'appareil "Waring-Blendor". Ils sont entourés de papier "gris" ou de papier "aluminium" et stérilisés au four Pasteur dans les mêmes conditions que la verrerie.
- Tiges de dispersion de l'Ultra-Turrax. La stérilisation ne peut se faire au four Pasteur. Eviter également la stérilisation à la flamme. Procéder de la façon suivante :
 - . placer la tige dans une éprouvette dans le fond de laquelle on aura disposé un petit tampon de coton hydrophile imbibé de 5 ml d'eau environ, ceci afin d'assurer une bonne stérilisation en atmosphère humide ;
 - . boucher l'éprouvette au coton cardé et stériliser à l'autoclave durant 20 minutes à 120° C.

III - MILIEUX DE CULTURE

Préparation

Il y a toujours avantage à utiliser les milieux déshydratés du commerce en raison de la régularité dans leur composition et de leur facilité d'emploi.

Il est préférable d'utiliser l'eau désionisée ou l'eau distillée neutre pour la confection des milieux, à défaut l'eau déminéralisée peut convenir.

L'ajustement du pH se fait sur le milieu tiède ou froid, de préférence avant adjonction de colorants si l'on se sert de papier indicateur (du type OXYPHEN). Mais il est toujours préférable d'utiliser un pH-mètre électrique. La stérilisation entraîne souvent une légère baisse du pH (de 0,1 à 0,3). Il faut donc ajuster le pH à une valeur telle qu'après stérilisation il se situe dans les limites voulues.

Stérilisation

Sauf exception, les milieux de culture sont stérilisés à l'autoclave. Les durées et températures de stérilisation sont indiquées pour chaque milieu.

Pour les milieux contenant des hydrates de carbone, nous préférons ne pas dépasser la température de 115° C, afin d'éviter tout risque d'hydrolyse des sucres. Cette stérilisation est suffisante lorsque les milieux sont répartis en tubes ne contenant pas plus de 10 à 15 ml de milieu.

Certains milieux ne peuvent être stérilisés au-delà de 100° C. Ils sont indiqués dans les méthodes.

IV - TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT : EAUX ET COQUILLAGES

A) PREPARATION DE L'ECHANTILLON

Comme indiqué précédemment, se laver soigneusement les mains avant chaque analyse de coquillages.

E A U X

L'ensemencement des eaux en tubes de bouillon n'offre pas de difficultés particulières : après agitation vigoureuse du flacon une dizaine de fois, prélever les volumes nécessaires.

COQUILLAGES

L'analyse des coquillages porte sur un nombre d'individus tel que le volume des corps soit au moins de 40 ml (soit environ, et selon leur taille, 6 à 8 huîtres, une vingtaine de moules, de coques, etc.).

Le broyage au Waring-Blendor permet un broyage fin de la chair et une bonne libération des germes, mais il ne doit pas excéder trente secondes afin d'éviter l'échauffement qui pourrait détruire un certain nombre de germes.

L'analyse porte :

- . soit sur la chair seule (CH)
- . soit de préférence, sur la chair + liquide intervalvaire (CLI)

- CHAIR SEULE -

- a - laver, brosser, égoutter, ouvrir les coquillages après flambage rapide de la charnière (le byssus des moules doit être coupé au ciseau avant ouverture et non arraché),
- b - rejeter l'eau intervalvaire,
- c - trancher le muscle adducteur et placer les corps dans une éprouvette contenant 10 ml d'eau salée à 1 % et stérile,

...

- d - noter le volume des corps par déplacement de l'eau,
- e - verser dans un bol du Waring-Blendor (ou dans un bécher dans le cas de l'Ultra-Turrax), et ajouter un volume d'eau salée 1 % stérile de sorte que le volume total à broyer (chair de coquillages + eau salée stérile) soit égal à trois fois le volume de corps mesuré,
- f - broyer durant 30 secondes,
- g - prélever aussitôt les volumes nécessaires aux ensemencements.

- CHAIR + LIQUIDE INTERVALVAIRE -

- a - laver, brosser, égoutter, ouvrir les coquillages après flambage rapide de la charnière (le byssus des moules doit être coupé au ciseau avant ouverture, et non arraché),
- b - recueillir les eaux intervalvaires dans une première éprouvette,
- c - trancher le muscle adducteur et placer les corps dans une deuxième éprouvette contenant 10 ml d'eau salée 1 % stérile,
- d - noter le volume des corps par déplacement de l'eau,
- e - verser dans un bol du Waring-Blendor (ou dans un bécher dans le cas de l'Ultra-Turrax), le contenu des deux éprouvettes ci-dessus et y ajouter un volume d'eau salée 1 % stérile de sorte que le volume total à broyer soit égal à trois fois le volume des corps,
- f - broyer durant 30 secondes,
- g - prélever aussitôt les volumes nécessaires aux ensemencements.

Une réaction positive dans un tube suppose qu'un germe au moins ait été inoculé. Un calcul statistique a permis d'établir une correspondance entre le nombre de tubes positifs dans chaque série et la population probable existant dans le milieu d'où l'inoculum est issu. Dans la pratique, le passage du nombre de tubes positifs à la population probable se fait en utilisant les tables de Mac GRADY, (p. 18 à 26).

...

B) ENSEMENCEMENT EN MILIEU LIQUIDE

L'analyse des coquillages pose souvent un problème en raison de leur teneur élevée en glycogène ou en produits génitaux lorsque le volume du broyatensemencé est important, par exemple 10 ml dans une combinaison 10 - 1 - 0,1 ml : il risque de se former un bouchon qui place la culture dans des conditions d'anaérobiose et de toute façon une opacification qui empêche de voir un dégagement gazeux éventuel. Il convient alors d'ensemencer des volumes plus faibles ou d'utiliser des tubes de plus fort diamètre.

L'échelonnement numérique correspondant à des séries de 3, 4 ou 5 tubesensemencés par l'inoculation de trois dilutions décimales est donné ci-dessous en fonction des volumes inoculés.

			3 tubes dans chaque série	4 tubes dans chaque série	5 tubes dans chaque série
Combinaison 1	10 - 1 - 0,1	Eau	3 à 2 400	2,3 à 2 160	2 à 2 400
		Coq.	9 à 7 200	6,9 à 6 480	6 à 7 200
"	2 : 5 - 0,5 - 0,05	Eau	6 à 4 800	4,6 à 4 320	4 à 4 800
		Coq.	18 à 14 400	13,8 à 12 960	12 à 14 400
"	3 : 2,5 - 0,25 - 0,025	Eau	12 à 9 600	9,2 à 8 640	8 à 9 600
		Coq.	36 à 28 800	27,6 à 25 920	24 à 28 800

Des dilutions décimales successives permettent d'atteindre des numérations plus élevées en cas de fortes contaminations présumées : il suffit alors d'appliquer aux résultats donnés par les tables N.P.P. le coefficient multiplicateur voulu.

Dans tous les cas, qu'il s'agisse d'eau ou de coquillages, et quelle que soit la combinaison choisie, l'ensemencement primaire se fait toujours en milieu double et chaque tube de 20 x 200 reçoit un volume uniforme de 10 ml, constitué soit par le produit à analyser lui-même, soit par le mélange "Produit à analyser + eau salée 1 % stérile de dilution".

...

Nous prendrons comme exemple la numération des coliformes fécaux en milieu d'EIJKMAN. La présence de coliformes est dictée par la production de gaz résultant de la fermentation du lactose. Pour reconnaître la formation de gaz on introduit dans le milieu une petite cloche en verre.

En cours d'ensemencement, on portera attention aux points suivants :

- avant chaque inoculation, le milieu à ensemercer doit être agité (aspiré puis soufflé trois fois avec la pipette dans le fond de l'éprouvette doucement pour éviter tout débordement),
- après inoculation dans les tubes 20 x 200, assurer le mélange intime des composants, en remuant les tubes doucement et en prenant soin d'éviter toute introduction d'air dans la cloche.

Combinaison choisie	Volumes à ensemercer : dans chacun des 3, 4 ou 5 tubes de la SERIE A	Volumes à ensemercer : dans chacun des 3, 4 ou 5 tubes de la SERIE B (dilution au 1/10ème)	Volumes à ensemercer : dans chacun des 3, 4 ou 5 tubes de la SERIE C (dilution au 1/100ème)
10 - 1 et 0,1 ml	Répartir directement : 10 ml par tube de liquide à analyser	Faire dilution de "A" : 10 ml + 90 ml eau salée 1% stérile : Mélanger : Répartir 10 ml par tube	Faire dilution de "B" : 10 ml + 90 ml eau salée 1% stérile : Mélanger : Répartir 10 ml par tube
5 - 0,5 et 0,05 ml	50 ml liquide à analyser : +50 ml eau salée 1% stér. : Mélanger : Répartir 10 ml par tube	Faire dilution de "A" : 10 ml + 90 ml eau salée 1% stér. : Mélanger : Répartir 10 ml par tube	Faire dilution de "B" : 10 ml + 90 ml eau salée 1% stér. : Mélanger : Répartir 10 ml par tube
2,5 - 0,25 et 0,025 ml	25 ml liquide à analyser : +75 ml eau salée 1% stér. : Mélanger : Répartir 10 ml par tube	Faire dilution de "A" : 10 ml + 90 ml eau salée 1% stér. : Répartir 10 ml par tube	Faire dilution de "B" : 10 ml + 90 ml eau salée 1% stér. : Répartir 10 ml par tube

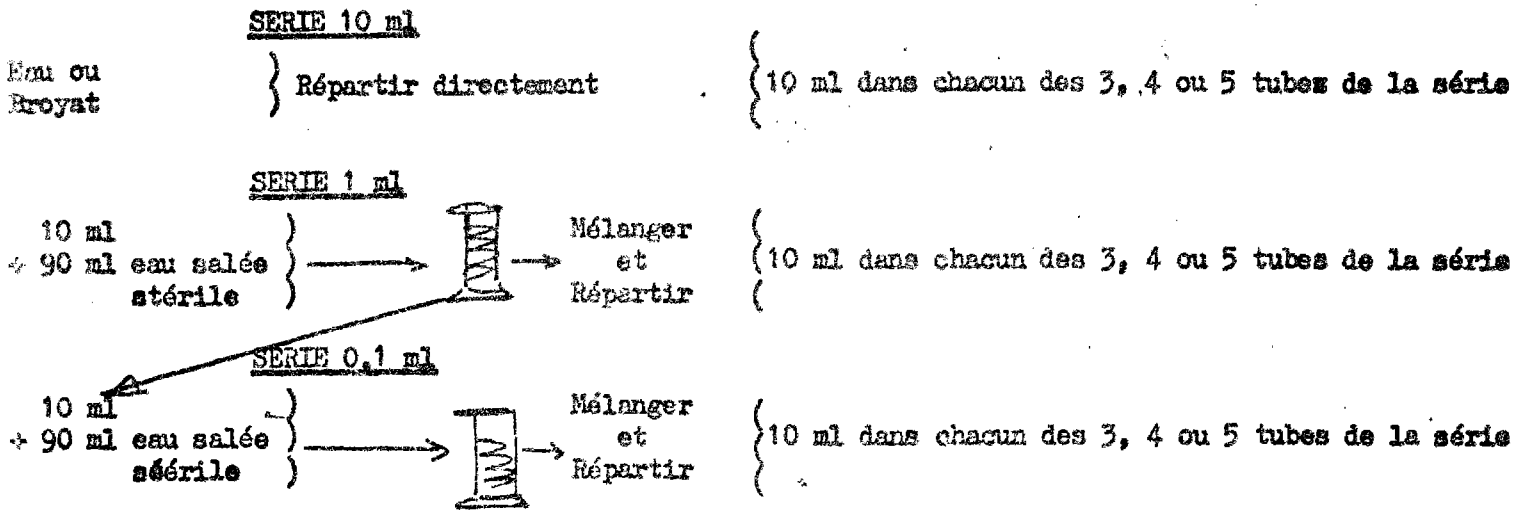
Tableau récapitulatif des principales combinaisons d'ensemencement

...

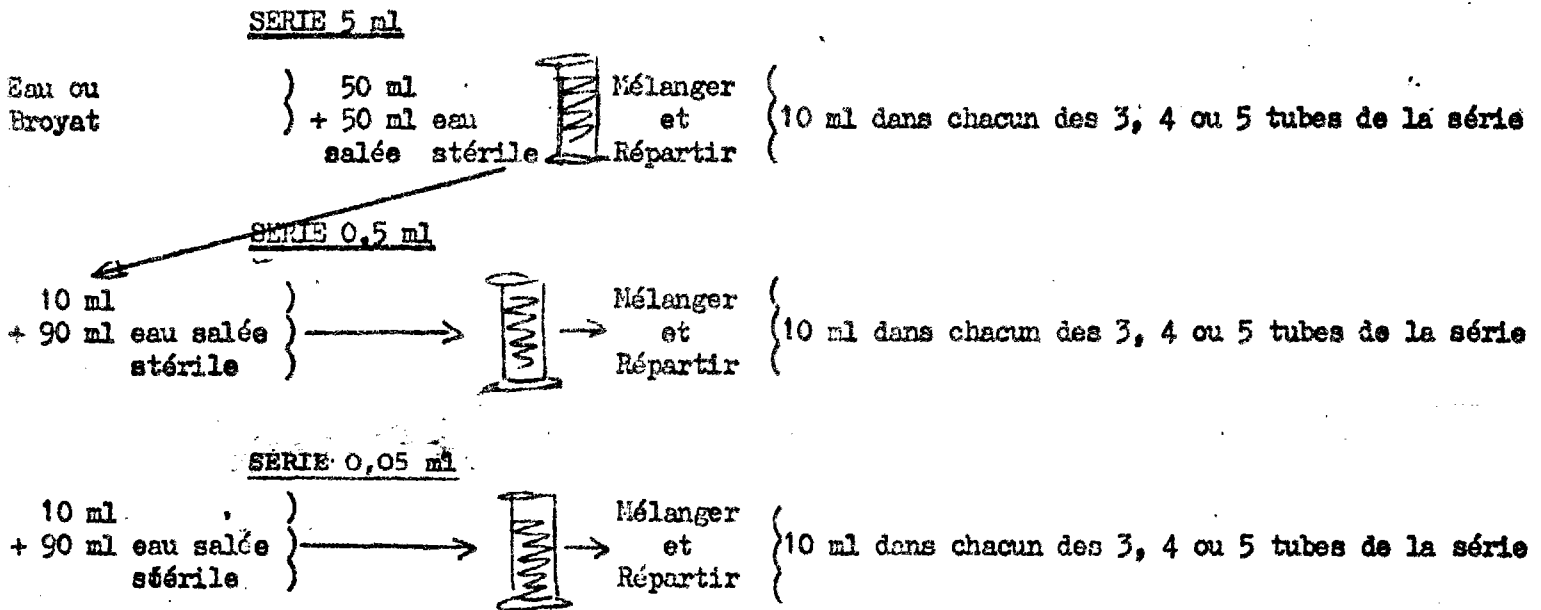
11

SCHEMA DES OPERATIONS D'ENSEMENCEMENT "EAUX et COQUILLAGES" EN 3 SERIES
de 3, 4 ou 5 tubes par série.

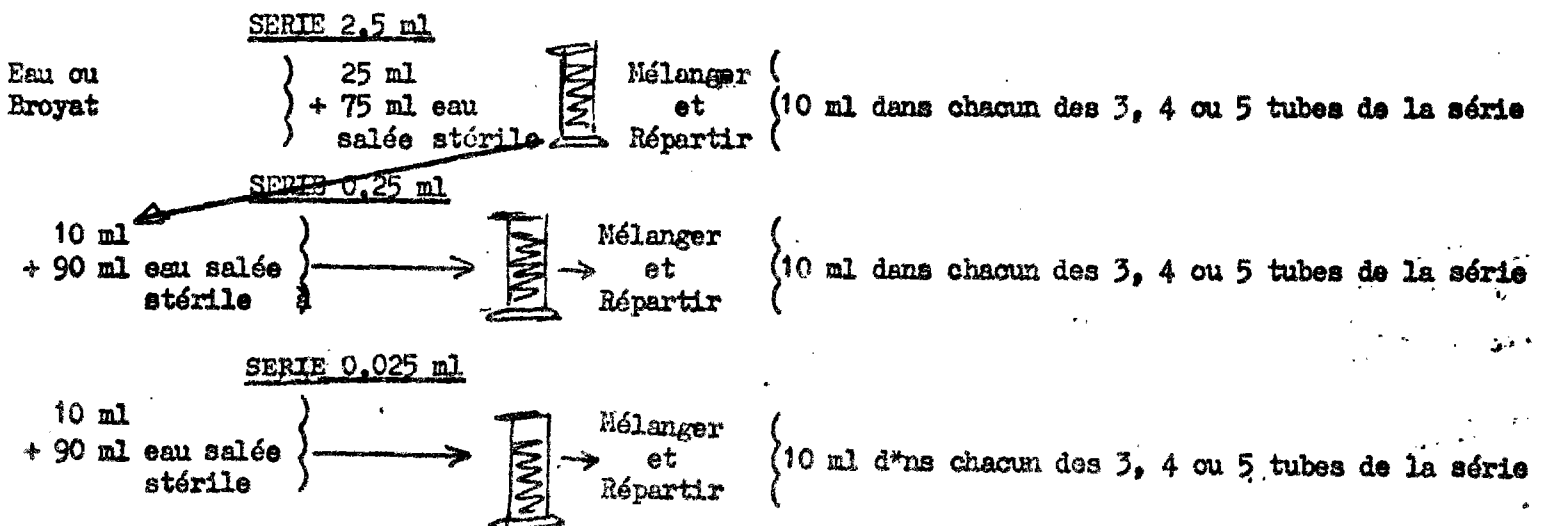
1°/ Combinaison des séries 10ml - 1ml et 0,1 ml



2°/ Combinaison des séries 5ml - 0,5 ml et 0,05ml



3°/ Combinaison des séries 2,5ml - 0,25ml et 0,025ml



C) ENSEMENCEMENT SUR MILIEUX GELOSES

Ce mode de numération n'étant pas applicable aux coquillages, et délicat dans le cas d'eaux turbides, l'ISTPM a opté pour la méthode de dénombrement en milieux liquides, on n'aura pratiquement pas à utiliser les milieux solides (comptage des colonies caractéristiques sur milieux gélosés sélectifs). Toutefois, et selon les circonstances (par exemple en cas de dénombrement paucimicrobien dans les eaux des stations d'épuration de coquillages), il peut être nécessaire d'utiliser la technique des membranes filtrantes sur milieu de CHAPMAN modifié (gélose lactosée au chlorure de triphényltétrazolium et au Tergitol), que nous résumons ci-après :

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Extrait de levure.....	6 g
Lactose.....	20 g
Bleu de bromothymol.....	0,05 g
Eau.....	1 000

Dissoudre en chauffant modérément et jusqu'à complète dissolution. Refroidir jusqu'à 50° environ et ajuster le pH à 7,2.

Répartir 100 ml de milieu par flacon de 150 ml.

Stériliser à l'autoclave 15 minutes à 115° C.

Au moment de l'emploi, faire fondre au bain-marie bouillant. Après refroidissement à environ 50° C, ajouter à chaque flacon :

- 5 ml d'une solution stérile de chlorure de 2-3-5 triphényltétrazolium (TTC) à 0,05 % dans l'eau distillée ;
- 5 ml d'une solution de Tergitol à 0,02 % dans l'eau distillée.

Mélanger intimement sans faire de bulles et couler immédiatement en boîtes de pétri avant refroidissement, à raison de 25 ml par boîte.

(L'Institut Pasteur fournit le produit déshydraté - base - qu'il suffit de dissoudre dans la quantité d'eau nécessaire, mais il faut ensuite ajouter dans les conditions ci-dessus, au moment de l'emploi, les deux solutions de TTC et Tergitol. A noter que des ampoules de ces produits sont également fournies par l'Institut Pasteur).

Ensemencement

On utilise des membranes filtrantes de porosité 0,45 µm, diamètre 5 cm, livrées stériles.

L'appareil à filtration peut être stérilisé au four Pasteur, après entourage de papier "gris ou papier d'aluminium comme la verrerie.

Selon la richesse présumée en germes, onensemencera de 100 à 500 ml d'eau sur une, deux ou plusieurs membranes. Après filtration, la membrane est enlevée à l'aide d'une pince flambée et appliquée soigneusement au centre de la boîte de pétri, en évitant d'enfermer des bulles d'air.

Si l'on désire obtenir les Coliformes totaux et les Coliformes fécaux indépendamment, on doit faire deux ensemencements :

- . l'un sera incubé à 37° durant 24 heures (C.T.),
- . l'autre sera incubé à 44° en atmosphère saturée d'humidité durant 24 heures (C.F.)

A 37°, toutes les colonies jaunes sont présumées être des coliformes (coliformes totaux : ne réduisent pas le triphényltetrazolium).

A 44°, les colonies jaunes sont présumées être des *Escherichia coli* (à 95 %) (coliformes fécaux).

Dans les deux cas, des repiquages sont nécessaires sur gélose au fer de KLIGLER et galerie de diagnostic ou galerie API, si l'on désire une détermination plus précise des germes.

Dénombrement

On fait la somme des colonies caractéristiques et on rapporte à 100 ml d'eau selon le volume filtré.

D) METHODES DE CONCENTRATION DES BACTERIES

Lorsque le nombre des bactéries dans un milieu devient trop faible pour être dénombré dans un volume de l'ordre de 100 ml (cas des bactéries pathogènes : Salmonelles, *Vibrio parahaemolyticus*, etc.), il devient nécessaire de prélever un volume beaucoup plus important et de procéder à une concentration des microorganismes qui y sont éventuellement présents.

Cette opération n'est pas nécessaire dans le cas de coquillages qui, par suite de leur pouvoir filtrant élevé, assurent une concentration "naturelle" des microorganismes. Mais elle peut être indispensable pour les eaux. On utilisera l'une ou l'autre des méthodes suivantes :

1°/ Concentration sur membranes filtrantes

Très intéressante pour les eaux de consommation, cette méthode est beaucoup moins aisément applicable pour les eaux de mer qui sont plus ou moins chargées en matières en suspension vivantes ou inertes et qui ont l'inconvénient de colmater très vite la membrane.

Néanmoins, lorsque les eaux sont suffisamment claires, cette méthode peut être utilisée pour des volumes de 500 ou 1 000 ml, en assurant des filtrations successives à partir de 3, 4 ou 5 membranes différentes.

Dans le cas où l'on désire un dénombrement, celui-ci se fait généralement en utilisant les milieux gélosés choisis, correspondant aux germes à rechercher, en appliquant les 3, 4 ou 5 membranes ayant assuré la totalité du volume filtré sur autant de boîtes de gélose.

2°/ Concentration par l'alumine

a) Préparation du lait d'alumine

Dans un ballon Pyrex de 2 litres, mettre 1 litre d'eau + 100 g de sulfate d'alumine.

Mélanger et précipiter, par additions successives, 190 ml d'ammoniaque à 28 % NH₃.

Faire bouillir pendant 5 minutes pour éliminer l'ammoniaque en excès.

Laisser décanter 24 heures.

Siphonner ou vider avec précaution le liquide clair surnageant et le remplacer par le même volume d'eau pure. Agiter vigoureusement et laisser décanter encore 24 heures.

Refaire cette opération autant de fois que nécessaire jusqu'à élimination de toute trace d'ammoniaque (s'en assurer à l'aide du réactif de NESSLER).

Lorsque l'ammoniaque a disparu en totalité, ajouter une dernière quantité d'eau pure de façon à obtenir un lait assez épais mais suffisamment fluide

...

pour pouvoir être aisément pipeté. Répartir 10 ml par tube de 16 x 160 bouché vis.

Stériliser 15 minutes à 120° C. Très bonne conservation.

b) Concentration des germes

Ajouter 10 ml de ce lait d'alumine (1 tube) à 500 ml d'eau à analyser (ou 2 tubes pour 1 litre).

Agiter vigoureusement pendant 5 minutes.

Laisser décanter au réfrigérateur durant la nuit

Siphonner l'eau surnageante. Le culot d'alumine peut être encore réduit par centrifugation, mais cette opération n'est pas indispensable.

Un volume de 500 ml d'eau à analyser, traitée, fournit un culot d'environ 10 à 15 ml qui peut être alorsensemencé sur les milieux liquides choisis correspondant aux germes recherchés.

V - TABLES N.P.P. DES GERMES EN MILIEU LIQUIDE

	PAGES	
	Eaux	Coquillages
Ensemencements en 3 tubes dans les séries : 10 - 1 - 0,1 ml	18	18
5 - 0,5 - 0,05 ml	19	19
2,5 - 0,25 - 0,025 ml	20	20
Ensemencements en 4 tubes dans les séries : 10 - 1 - 0,1 ml	21	22
5 - 0,5 - 0,05 ml	23	24
2,5 - 0,25 - 0,025 ml	25	26

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml d'eau, après ensemencement de

3 tubes dans chacune des dilutions : 10 ml - 1 ml - 0,1 ml

Nombre de tubes +				NPP	Nombre de tubes +				NPP	Nombre de tubes +				NPP		
10 ml	1 ml	0,1 ml	10 ml		1 ml	0,1 ml	10 ml	1 ml		0,1 ml	10 ml	1 ml	0,1 ml			
0	0	0			1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3		1	0	1	7	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6		1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9		1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3		1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1		1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2		1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12		1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2		1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3		1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12		1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16		1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4		1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13		1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16		1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19		1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	2400

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml de chair de coquillages, après

ensemencement de 3 tubes dans chacune des dilutions : 10 ml - 1 ml - 0,1 ml

0	0	0			1	0	0	10,8	2	0	0	27,3	3	0	0	69
0	0	1	9		1	0	1	21	2	0	1	42	3	0	1	117
0	0	2	18		1	0	2	33	2	0	2	60	3	0	2	192
0	0	3	27		1	0	3	45	2	0	3	78	3	0	3	285
0	1	0	9		1	1	0	22	2	1	0	45	3	1	0	129
0	1	1	18,3		1	1	1	33	2	1	1	60	3	1	1	225
0	1	2	27,6		1	1	2	45	2	1	2	81	3	1	2	360
0	1	3	36		1	1	3	57	2	1	3	102	3	1	3	480
0	2	0	18,6		1	2	0	33	2	2	0	63	3	2	0	279
0	2	1	27,9		1	2	1	45	2	2	1	84	3	2	1	450
0	2	2	36		1	2	2	60	2	2	2	105	3	2	2	630
0	2	3	48		1	2	3	72	2	2	3	126	3	2	3	870
0	3	0	28,2		1	3	0	48	2	3	0	87	3	3	0	720
0	3	1	39		1	3	1	60	2	3	1	108	3	3	1	1380
0	3	2	48		1	3	2	72	2	3	2	132	3	3	2	3300
0	3	3	57		1	3	3	87	2	3	3	159	3	3	3	7200

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml d'eau, après ensemencement

de 3 tubes dans chacune des séries : 5 ml - 0,5 ml - 0,05 ml

Nombre de tubes +			NPP	Nombre de tubes +			NPP	Nombre de tubes +			NPP				
5 ml	0,5 ml	0,05 ml		5 ml	0,5 ml	0,05 ml		5 ml	0,5 ml	0,05 ml					
0	0	0		1	0	0	7,2	2	0	0	18,2	3	0	0	46
0	0	1	6	1	0	1	14	2	0	1	28	3	0	1	78
0	0	2	12	1	0	2	22	2	0	2	40	3	0	2	128
0	0	3	18	1	0	3	30	2	0	3	52	3	0	3	190
0	1	0	6	1	1	0	14,6	2	1	0	30	3	1	0	86
0	1	1	12,2	1	1	1	22	2	1	1	40	3	1	1	150
0	1	2	18,4	1	1	2	30	2	1	2	54	3	1	2	240
0	1	3	24	1	1	3	38	2	1	3	68	3	1	3	320
0	2	0	12,4	1	2	0	22	2	2	0	42	3	2	0	186
0	2	1	18,6	1	2	1	30	2	2	1	56	3	2	1	300
0	2	2	24	1	2	2	40	2	2	2	70	3	2	2	420
0	2	3	32	1	2	3	48	2	2	3	84	3	2	3	580
0	3	0	18,8	1	3	0	32	2	3	0	58	3	3	0	480
0	3	1	26	1	3	1	40	2	3	1	72	3	3	1	920
0	3	2	32	1	3	2	48	2	3	2	88	3	3	2	2200
0	3	3	38	1	3	3	58	2	3	3	106	3	3	3	4800

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml de chair de coquillages, après

ensemencement de 3 tubes dans chacune des dilutions : 5 ml - 0,5 ml - 0,05 ml

0	0	0		1	0	0	21,6	2	0	0	54,6	3	0	0	138
0	0	1	18	1	0	1	42	2	0	1	84	3	0	1	234
0	0	2	36	1	0	2	66	2	0	2	120	3	0	2	384
0	0	3	54	1	0	3	90	2	0	3	156	3	0	3	570
0	1	0	18	1	1	0	43,8	2	1	0	90	3	1	0	258
0	1	1	36,6	1	1	1	66	2	1	1	120	3	1	1	450
0	1	2	55,2	1	1	2	90	2	1	2	162	3	1	2	720
0	1	3	72	1	1	3	114	2	1	3	204	3	1	3	960
0	2	0	37,2	1	2	0	66	2	2	0	126	3	2	0	558
0	2	1	55,8	1	2	1	90	2	2	1	168	3	2	1	900
0	2	2	72	1	2	2	120	2	2	2	210	3	2	2	1260
0	2	3	96	1	2	3	144	2	2	3	252	3	2	3	1740
0	3	0	56,4	1	3	0	96	2	3	0	174	3	3	0	1440
0	3	1	78	1	3	1	120	2	3	1	216	3	3	1	2760
0	3	2	96	1	3	2	144	2	3	2	264	3	3	2	6600
0	3	3	114	1	3	3	174	2	3	3	318	3	3	3	14400

Arrondir à l'unité la plus proche.

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml d'eau, après ensemencement

de 3 tubes dans chacune des séries : 2,5 ml - 0,25 ml - 0,025 ml

Nombre de tubes +				NPP	Nombre de tubes +				NPP	Nombre de tubes +				NPP		
2,5 ml	0,25 ml	0,025 ml	2,5 ml		0,25 ml	0,025 ml	2,5 ml	0,25 ml		0,025 ml	2,5 ml	0,25 ml	0,025 ml			
0	0	0			1	0	0	14,4	2	0	0	36,4	3	0	0	92
0	0	1	12		1	0	1	28	2	0	1	72	3	0	1	146
0	0	2	24		1	0	2	44	2	0	2	80	3	0	2	256
0	0	3	36		1	0	3	60	2	0	3	104	3	0	3	380
0	1	0	12		1	1	0	29,2	2	1	0	60	3	1	0	172
0	1	1	24,4		1	1	1	44	2	1	1	80	3	1	1	300
0	1	2	38,8		1	1	2	60	2	1	2	108	3	1	2	480
0	1	3	48		1	1	3	76	2	1	3	136	3	1	3	640
0	2	0	24,8		1	2	0	44	2	2	0	84	3	2	0	372
0	2	1	37,2		1	2	1	60	2	2	1	112	3	2	1	600
0	2	2	48		1	2	2	80	2	2	2	140	3	2	2	840
0	2	3	64		1	2	3	96	2	2	3	168	3	2	3	1160
0	3	0	37,6		1	3	0	64	2	3	0	116	3	3	0	720
0	3	1	52		1	3	1	80	2	3	1	144	3	3	1	1840
0	3	2	64		1	3	2	96	2	3	2	176	3	3	2	4400
0	3	3	76		1	3	3	116	2	3	3	212	3	3	3	9600

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml de chair de coquillages, après

ensemencement de 3 tubes dans chacune des dilutions : 2,5 ml - 0,25 ml - 0,025 ml

0	0	0			1	0	0	43,2	2	0	0	109,2	3	0	0	276
0	0	1	36		1	0	1	84	2	0	1	216	3	0	1	438
0	0	2	72		1	0	2	132	2	0	2	240	3	0	2	768
0	0	3	108		1	0	3	180	2	0	3	312	3	0	3	1140
0	1	0	36		1	1	0	87,6	2	1	0	180	3	1	0	516
0	1	1	73,2		1	1	1	132	2	1	1	240	3	1	1	1500
0	1	2	116,4		1	1	2	180	2	1	2	324	3	1	2	1440
0	1	3	144		1	1	3	228	2	1	3	408	3	1	3	1920
0	2	0	74,4		1	2	0	132	2	2	0	252	3	2	0	1116
0	2	1	111,6		1	2	1	180	2	2	1	336	3	2	1	1800
0	2	2	144		1	2	2	240	2	2	2	420	3	2	2	2520
0	2	3	192		1	2	3	288	2	2	3	504	3	2	3	3480
0	3	0	112,8		1	3	0	192	2	3	0	348	3	3	0	2160
0	3	1	156		1	3	1	240	2	3	1	432	3	3	1	5520
0	3	2	192		1	3	2	288	2	3	2	528	3	3	2	13200
0	3	3	228		1	3	3	348	2	3	3	638	3	3	3	28800

Arrondir à l'unité la plus proche.

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml d'eau après ensemencement
de 4 tubes dans chacune des dilutions : 10 ml - 1 ml - 0,1 ml

10	1	0,1	NPP	10	1	0,1	NPP	10	1	0,1	NPP	10	1	0,1	NPP	10	1	0,1	NPP
0	0	0		1	0	0	2,6	2	0	0	6	3	0	0	11	4	0	0	24
0	0	1	2,3	1	0	1	5,1	2	0	1	9,1	3	0	1	16	4	0	1	34
0	0	2	4,5	1	0	2	7,8	2	0	2	12	3	0	2	20	4	0	2	50
0	0	3	6,8	1	0	3	10	2	0	3	16	3	0	3	26	4	0	3	71
0	0	4	9	1	0	4	13	2	0	4	19	3	0	4	31	4	0	4	95
0	1	0	2,3	1	1	0	5,2	2	1	0	9,3	3	1	0	16	4	1	0	36
0	1	1	4,6	1	1	1	7,8	2	1	1	13	3	1	1	21	4	1	1	55
0	1	2	6,8	1	1	2	11	2	1	2	16	3	1	2	26	4	1	2	81
0	1	3	9,1	1	1	3	13	2	1	3	20	3	1	3	32	4	1	3	110
0	1	4	11	1	1	4	16	2	1	4	23	3	1	4	38	4	1	4	140
0	2	0	4,6	1	2	0	8	2	2	0	13	3	2	0	21	4	2	0	62
0	2	1	6,9	1	2	1	11	2	2	1	16	3	2	1	27	4	2	1	94
0	2	2	9,2	1	2	2	13	2	2	2	20	3	2	2	33	4	2	2	130
0	2	3	12	1	2	3	16	2	2	3	24	3	2	3	40	4	2	3	170
0	2	4	14	1	2	4	19	2	2	4	28	3	2	4	47	4	2	4	210
0	3	0	7	1	3	0	11	2	3	0	17	3	3	0	28	4	3	0	110
0	3	1	9,3	1	3	1	14	2	3	1	20	3	3	1	34	4	3	1	160
0	3	2	12	1	3	2	16	2	3	2	24	3	3	2	41	4	3	2	220
0	3	3	14	1	3	3	19	2	3	3	28	3	3	3	48	4	3	3	280
0	3	4	16	1	3	4	22	2	3	4	32	3	3	4	56	4	3	4	360
0	4	0	14,4	1	4	0	14	2	4	0	21	3	4	0	35	4	4	0	240
0	4	1	12	1	4	1	17	2	4	1	25	3	4	1	43	4	4	1	390
0	4	2	14	1	4	2	20	2	4	2	29	3	4	2	50	4	4	2	700
0	4	3	17	1	4	3	23	2	4	3	33	3	4	3	59	4	4	3	1400
0	4	4	19	1	4	4	26	2	4	4	37	3	4	4	67	4	4	4	2160

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml de chair de coquillages
de 4 tubes dans chacune des dilutions : 10 ml - 1 ml - 0,1 ml.

10	1	0,1	NPP	10	1	0,1	NPP	10	1	0,1	NPP	10	1	0,1	NPP				
0	0	0	6,9	1	0	0	7,8	2	0	0	18	3	0	0	33	4	0	0	82
0	0	1	13,5	1	0	1	15,3	2	0	1	27,3	3	0	1	48	4	0	1	102
0	0	2	20,4	1	0	2	23,4	2	0	2	36	3	0	2	60	4	0	2	150
0	0	3	27	1	0	3	30	2	0	3	48	3	0	3	78	4	0	3	213
0	0	4	27	1	0	4	39	2	0	4	57	3	0	4	93	4	0	4	285
0	1	0	6,9	1	1	0	15,6	2	1	0	27,9	3	1	0	48	4	1	0	108
0	1	1	13,8	1	1	1	23,4	2	1	1	39	3	1	1	63	4	1	1	165
0	1	2	20,4	1	1	2	33	2	1	2	48	3	1	2	78	4	1	2	243
0	1	3	27,3	1	1	3	39	2	1	3	60	3	1	3	96	4	1	3	330
0	1	4	33	1	1	4	48	2	1	4	69	3	1	4	114	4	1	4	420
0	2	0	13,8	1	2	0	24	2	2	0	39	3	2	0	63	4	2	0	186
0	2	1	20,7	1	2	1	33	2	2	1	48	3	2	1	81	4	2	1	282
0	2	2	27,6	1	2	2	39	2	2	2	60	3	2	2	99	4	2	2	390
0	2	3	36	1	2	3	48	2	2	3	72	3	2	3	120	4	2	3	510
0	2	4	42	1	2	4	57	2	2	4	84	3	2	4	141	4	2	4	630
0	3	0	21	1	3	0	33	2	3	0	51	3	3	0	84	4	3	0	330
0	3	1	29,1	1	3	1	42	2	3	1	60	3	3	1	112	4	3	1	480
0	3	2	36	1	3	2	48	2	3	2	72	3	3	2	123	4	3	2	660
0	3	3	42	1	3	3	57	2	3	3	84	3	3	3	144	4	3	3	840
0	3	4	48	1	3	4	66	2	3	4	96	3	3	4	168	4	3	4	1080
0	4	0	28,2	1	4	0	42	2	4	0	63	3	4	0	105	4	4	0	720
0	4	1	36	1	4	1	51	2	4	1	75	3	4	1	129	4	4	1	1170
0	4	2	42	1	4	2	60	2	4	2	87	3	4	2	150	4	4	2	2100
0	4	3	51	1	4	3	69	2	4	3	99	3	4	3	177	4	4	3	4200
0	4	4	57	1	4	4	78	2	4	4	111	3	4	4	201	4	4	4	6480

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml d'eau après ensemencement
de 4 tubes dans chacune des dilutions : 5 - 0,5 - 0,05 ml.

5	0,5	0,05	NPP	5	0,5	0,05	NPP	5	0,5	0,05	NPP	5	0,5	0,05	NPP				
0	0	0		1	0	0	5,2	2	0	0	12	3	0	0	22	4	0	0	46
0	0	1	4,6	1	0	1	10,2	2	0	1	18,2	3	0	1	32	4	0	1	68
0	0	2	9	1	0	2	15,6	2	0	2	24	3	0	2	40	4	0	2	100
0	0	3	13,6	1	0	3	20	2	0	3	32	3	0	3	52	4	0	3	142
0	0	4	18	1	0	4	26	2	0	4	38	3	0	4	62	4	0	4	190
0	1	0	4,6	1	1	0	10,4	2	1	0	18,6	3	1	0	32	4	1	0	72
0	1	1	9,2	1	1	1	15,75	2	1	1	26	3	1	1	42	4	1	1	110
0	1	2	13,6	1	1	2	22	2	1	2	32	3	1	2	52	4	1	2	162
0	1	3	18,2	1	1	3	26	2	1	3	40	3	1	3	64	4	1	3	220
0	1	4	22	1	1	4	32	2	1	4	46	3	1	4	76	4	1	4	280
0	2	0	9,2	1	2	0	16	2	2	0	26	3	2	0	42	4	2	0	124
0	2	1	13,8	1	2	1	22	2	2	1	32	3	2	1	54	4	2	1	188
0	2	2	18,4	1	2	2	26	2	2	2	40	3	2	2	66	4	2	2	260
0	2	3	24	1	2	3	32	2	2	3	48	3	2	3	80	4	2	3	340
0	2	4	28	1	2	4	38	2	2	4	56	3	2	4	94	4	2	4	420
0	3	0	14	1	3	0	22	2	3	0	34	3	3	0	56	4	3	0	220
0	3	1	18,6	1	3	1	28	2	3	1	40	3	3	1	68	4	3	1	320
0	3	2	24	1	3	2	32	2	3	2	48	3	3	2	82	4	3	2	440
0	3	3	28	1	3	3	38	2	3	3	56	3	3	3	96	4	3	3	560
0	3	4	32	1	3	4	44	2	3	4	64	3	3	4	112	4	3	4	720
0	4	0	18,8	1	4	0	28	2	4	0	42	3	4	0	70	4	4	0	480
0	4	1	24	1	4	1	34	2	4	1	50	3	4	1	86	4	4	1	780
0	4	2	28	1	4	2	40	2	4	2	58	3	4	2	100	4	4	2	1400
0	4	3	34	1	4	3	46	2	4	3	66	3	4	3	118	4	4	3	2800
0	4	4	38	1	4	4	52	2	4	4	74	3	4	4	134	4	4	4	4320

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml de chair de coquillages,
après ensemencement de 4 tubes dans chacune des dilutions : 5 - 0,5 - 0,05 ml.

5	0,5	0,05	NPP	5	0,5	0,05	NPP	5	0,5	0,05	NPP	5	0,5	0,05	NPP	5	0,5	0,05	NPP
0	0	0		1	0	0	15,6	2	0	0	36	3	0	0	66	4	0	0	138
0	0	1	13,8	1	0	1	30,6	2	0	1	54,6	3	0	1	96	4	0	1	204
0	0	2	27	1	0	2	46,8	2	0	2	72	3	0	2	120	4	0	2	300
0	0	3	40,8	1	0	3	60	2	0	3	96	3	0	3	156	4	0	3	426
0	0	4	54	1	0	4	78	2	0	4	114	3	0	4	186	4	0	4	570
0	1	0	13,8	1	1	0	31,2	2	1	0	55,8	3	1	0	96	4	1	0	216
0	1	1	27,6	1	1	1	47,25	2	1	1	78	3	1	1	126	4	1	1	330
0	1	2	40,8	1	1	2	66	2	1	2	96	3	1	2	156	4	1	2	486
0	1	3	54,6	1	1	3	78	2	1	3	120	3	1	3	192	4	1	3	660
0	1	4	66	1	1	4	96	2	1	4	138	3	1	4	228	4	1	4	840
0	2	0	27,6	1	2	0	48	2	2	0	78	3	2	0	126	4	2	0	372
0	2	1	41,4	1	2	1	66	2	2	1	96	3	2	1	162	4	2	1	564
0	2	2	55,2	1	2	2	78	2	2	2	120	3	2	2	198	4	2	2	780
0	2	3	72	1	2	3	96	2	2	3	144	3	2	3	240	4	2	3	1020
0	2	4	84	1	2	4	114	2	2	4	168	3	2	4	282	4	2	4	1260
0	3	0	42	1	3	0	66	2	3	0	102	3	3	0	168	4	3	0	660
0	3	1	58,3	1	3	1	84	2	3	1	120	3	3	1	204	4	3	1	960
0	3	2	72	1	3	2	96	2	3	2	144	3	3	2	246	4	3	2	1320
0	3	3	84	1	3	3	114	2	3	3	168	3	3	3	288	4	3	3	1680
0	3	4	96	1	3	4	132	2	3	4	192	3	3	4	336	4	3	4	2160
0	4	0	56,4	1	4	0	84	2	4	0	126	3	4	0	210	4	4	0	1440
0	4	1	72	1	4	1	102	2	4	1	150	3	4	1	258	4	4	1	2340
0	4	2	84	1	4	2	120	2	4	2	174	3	4	2	300	4	4	2	4200
0	4	3	102	1	4	3	138	2	4	3	198	3	4	3	354	4	4	3	8400
0	4	4	114	1	4	4	156	2	4	4	222	3	4	4	402	4	4	4	12960

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml d'eau, après ensemencement de 4 tubes, dans chacune des dilutions : 2,5 - 0,25 et 0,025 ml

2,5	0,25	0,025	NPP	2,5	0,25	0,025	NPP	2,5	0,25	0,025	NPP	2,5	0,25	0,025	NPP	2,5	0,25	0,025	NPP
0	0	0		1	0	0	10,4	2	0	0	24	3	0	0	44	4	0	0	92
0	0	1	9,2	1	0	1	20,4	2	0	1	36,4	3	0	1	64	4	0	1	136
0	0	2	18	1	0	2	31,2	2	0	2	48	3	0	2	80	4	0	2	200
0	0	3	27,2	1	0	3	40	2	0	3	64	3	0	3	104	4	0	3	284
0	0	4	36	1	0	4	52	2	0	4	76	3	0	4	124	4	0	4	380
0	1	0	9,2	1	1	0	20,8	2	1	0	37,2	3	1	0	64	4	1	0	144
0	1	1	18,4	1	1	1	31,5	2	1	1	52	3	1	1	84	4	1	1	220
0	1	2	27,2	1	1	2	44	2	1	2	64	3	1	2	104	4	1	2	324
0	1	3	36,4	1	1	3	52	2	1	3	80	3	1	3	128	4	1	3	440
0	1	4	44	1	1	4	64	2	1	4	92	3	1	4	152	4	1	4	560
0	2	0	18,4	1	2	0	32	2	2	0	52	3	2	0	84	4	2	0	248
0	2	1	27,6	1	2	1	44	2	2	1	64	3	2	1	108	4	2	1	376
0	2	2	36,8	1	2	2	52	2	2	2	80	3	2	2	132	4	2	2	520
0	2	3	48	1	2	3	64	2	2	3	96	3	2	3	160	4	2	3	680
0	2	4	56	1	2	4	76	2	2	4	112	3	2	4	188	4	4	4	840
0	3	0	28	1	3	0	44	2	3	0	68	3	3	0	112	4	3	0	440
0	3	1	37,2	1	3	1	56	2	3	1	80	3	3	1	136	4	3	1	640
0	3	2	48	1	3	2	64	2	3	2	96	3	3	2	164	4	3	2	880
0	3	3	56	1	3	3	76	2	3	3	112	3	3	3	192	4	3	3	1120
0	3	4	64	1	3	4	88	2	3	4	128	3	3	4	224	4	3	4	1440
0	4	0	37,6	1	4	0	56	2	4	0	84	3	4	0	140	4	4	0	960
0	4	1	48	1	4	1	68	2	4	1	100	3	4	1	172	4	4	1	1560
0	4	2	56	1	4	2	80	2	4	2	116	3	4	2	200	4	4	2	2800
0	4	3	68	1	4	3	92	2	4	3	132	3	4	3	236	4	4	3	5600
0	4	4	76	1	4	4	104	2	4	4	148	3	4	4	268	4	4	4	8640

Nombre le plus probable d'organismes présents dans 100 ml de chair de coquillages,

après ensemencement de 4 tubes dans chacune des dilutions : 2,5 - 0,25 - 0,025 ml.

2,5	0,25	0,025	NPP	2,5	0,25	0,025	NPP	2,5	0,25	0,025	NPP	2,5	0,25	0,025	NPP	2,5	0,25	0,025	NPP
0	0	0		1	0	0	31,2	2	0	0	72	3	0	0	132	4	0	0	276
0	0	1	27,6	1	0	1	61,2	2	0	1	109,2	3	0	1	192	4	0	1	408
0	0	2	54	1	0	2	93,6	2	0	2	144	3	0	2	240	4	0	2	600
0	0	3	81,6	1	0	3	120	2	0	3	192	3	0	3	312	4	0	3	852
0	0	4	108	1	0	4	156	2	0	4	228	3	0	4	372	4	0	4	1140
0	1	0	27,6	1	1	0	62,4	2	1	0	111,6	3	1	0	192	4	1	0	432
0	1	1	55,2	1	1	1	94,5	2	1	1	156	3	1	1	252	4	1	1	660
0	1	2	81,6	1	1	2	132	2	1	2	192	3	1	2	312	4	1	2	972
0	1	3	109,2	1	1	3	156	2	1	3	240	3	1	3	384	4	1	3	1320
0	1	4	132	1	1	4	192	2	1	4	276	3	1	4	456	4	1	4	1680
0	2	0	55,2	1	2	0	96	2	2	0	156	3	2	0	252	4	2	0	744
0	2	1	82,8	1	2	1	132	2	2	1	192	3	2	1	324	4	2	1	1128
0	2	2	110,4	1	2	2	156	2	2	2	240	3	2	2	396	4	2	2	1560
0	2	3	144	1	2	3	192	2	2	3	288	3	2	3	480	4	2	3	2040
0	2	4	168	1	2	4	228	2	2	4	336	3	2	4	564	4	2	4	2520
0	3	0	84	1	3	0	132	2	3	0	204	3	3	0	336	4	3	0	1320
0	3	1	116,6	1	3	1	168	2	3	1	240	3	3	1	408	4	3	1	1920
0	3	2	144	1	3	2	192	2	3	2	288	3	3	2	492	4	3	2	2640
0	3	3	168	1	3	3	228	2	3	3	336	3	3	3	576	4	3	3	3360
0	3	4	192	1	3	4	264	2	3	4	384	3	3	4	672	4	3	4	4320
0	4	0	112,8	1	4	0	168	2	4	0	252	3	4	0	420	4	4	0	2880
0	4	1	144	1	4	1	204	2	4	1	300	3	4	1	516	4	4	1	4680
0	4	2	168	1	4	2	240	2	4	2	348	3	4	2	600	4	4	2	8400
0	4	3	204	1	4	3	276	2	4	3	396	3	4	3	708	4	4	3	16800
0	4	4	228	1	4	4	312	2	4	4	444	3	4	4	804	4	4	4	25920

VI - EXPRESSION DES RESULTATS

Le résultat à donner doit dans tous les cas être exprimé par un nombre entier.

Les nombres décimaux seront arrondis à l'unité la plus proche.

Exemples :	18,3	sera reporté	18
	27,9		28
	10,8		11
	54,6		55

...

VII - RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES COLIFORMES

A) RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES COLIFORMES TOTAUX ET DES COLIFORMES FECAUX

sur bouillon lactosé bilié au vert brillant

Milieux utilisés

Bouillon lactosé à la bile et au vert brillant

Bouillon peptoné ordinaire

Formules du bouillon lactosé bilié

	Milieu simple	Milieu double
Peptone	10 g	20 g
Lactose	10 g	20 g
Bile de boeuf déshydratée	20 g	40 g
Vert brillant	0,0133 g	0,0266 g
Eau	1 000	1 000

Dissoudre par chauffage modéré

Ajuster le pH à 7,2

Répartir :

- . le milieu simple - 10 ml par tube de 16 x 160 muni d'une cloche de Durham 6 x 35 mm
- . le milieu double - 10 ml par tube de 20 x 200 " " " 9 x 35 mm

Stériliser à l'autoclave 15 minutes à 115° C.

(Il est préférable d'utiliser un milieu déshydraté, commercialisé par diverses marques le milieu fourni par l'Institut Pasteur - Lille, donne de bons résultats. On l'utilise à raison de :

- . 40 g par litre pour le bouillon simple) dissolution, pH, répartition
- . 80 g " " double) et stérilisation comme ci-dessus

...

Formule du bouillon peptoné (pour subculture)

Peptone (ou tryptone)	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau	1 000

Dissoudre par chauffage modéré.

Ajuster le pH à 7, après refroidissement.

Répartir environ 10 ml par tube de 16 x 160.

Stériliser à l'autoclave : 15 minutes à 115° C.

- . Le premier ensemencement (Test présomptif : Coliformes totaux) se fait sur milieu lactosé bilié DOUBLE
- . La subculture (Test confirmatif : Coliformes fécaux) se fait sur milieux :
lactosé bilié SIMPLE
et
peptoné ordinaire

Ensemencement (voir Ch. IV § B)

Rappel : En pratique courante, onensemencera les coquillages, de préférence selon la combinaison faisant intervenir les trois dilutions :

5 ml - 0,5 ml et 0,05 ml
en trois tubes pour chaque dilution.

(Toutefois, en cas de coquillages très gras on pourra pratiquer des ensemencements plus faibles de : 2,5 ml - 0,25 ml et 0,025 ml en trois, quatre ou cinq tubes pour chaque dilution, et selon l'échelonnement souhaité des numérations).

L'ensemencement des EAUX ne pose aucun problème et les volumes ensemencés pourront s'échelonner selon l'une ou l'autre des trois dilutions, le plus souvent en trois tubes.

Incubation

Placer les tubes de culture primaire (20 x 200) à l'étuve à 37° C durant 48 heures.

...

1°/ Recherche des coliformes totaux

Noter les tubes gazogènes (au moins 1/4 de la cloche) : ils correspondent aux coliformes totaux. Le dénombrement est donné par les tables N.P.P.

2°/ Recherche des coliformes fécaux

A partir des tubes gazogènes ci-dessus, pratiquer le test de MACKENZIE.

Chaque tube est repiqué :

- . sur milieu lactosé bilié à concentration SIMPLE (tubes 16 x 160),
- . sur bouillon peptoné ordinaire.

Placer au bain-marie réglé très exactement à 44° C durant 24 heures.

Noter les tubes gazogènes et rechercher l'indole dans les tubes homologues (ajouter environ 0,5 ml de réactif de l'indole). En présence d'indole, une coloration rouge cerise se développe immédiatement (ne pas tenir compte des réactions tardives ou de teintes rose, brune, orangé-rougeâtre, etc.).

Tout tube de culture primaire gazogène à 37° C et ayant donné : GAZ + INDOLE à 44° C, contient un Coliforme fécal (*Escherichia coli* dans la quasi totalité des cas).

Dénombrement

Selon Tables N.P.P., correspondant aux dilutions et nombre de tubesensemencés dans chaque série.

B) RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES COLIFORMES FECAUX sur bouillon au Mannitol (milieu expérimental de dénombrement rapide des C.F.)

Milieu utilisé

Bouillon bilié au mannitol.

Formule (concentration double)

Tryptone	24 g
Tryptophane	2 g
Mannitol	18 g
Bile de boeuf déshydratée	50 g
Chlorure de sodium	10 g
Phosphate monopotassique	3 g
Phosphate Di-potassique	7 g
Lauryl-sulfate de sodium	0,4 g
Eau	1 000

Dissoudre par chauffage modéré.

Ajuster le pH à 7, après refroidissement.

Répartir le milieu double à raison de 10 ml par tube de 20 x 200 mm, muni d'une cloche de Durham de : 9 x 35 mm et bouché vis.

Stériliser à l'autoclave 15 minutes à 115° C.

Ensemencement (voir Ch. IV § B)

Rappel : Pour les analyses habituelles, et quelle que soit la combinaison choisie
 =====
 (voir ci-après), on ensemence chaque tube de milieu double avec un volume uniforme de 10 ml constitué soit par le produit à analyser lui-même, soit par un mélange "produit à analyser + eau salée 1 % stérile de dilution".

En pratique courante, on ensemencera les coquillages de préférence selon la combinaison faisant intervenir les trois dilutions :

5 ml - 0,5 ml et 0,05 ml en trois tubes

(toutefois en cas de coquillages très gras, on pourra pratiquer des ensemencements plus faibles de 2,5 ml - 0,25 ml et 0,025 ml, en trois, quatre ou cinq tubes pour chaque dilution, selon l'échelonnement souhaité des numérations).

L'ensemencement des eaux ne pose aucun problème et les volumesensemencés pourront s'échelonner selon l'une ou l'autre des trois dilutions, le plus souvent en trois tubes.

...

Incubation

Immédiatement après ensemencement, placer dans un bain-marie réglé très exactement à 44° C (tolérance thermique maximale : $\pm 0,2^{\circ}$ C).

Utiliser un bain-marie parfaitement calorifugé ou une cuve munie d'un thermo-plongeur à circulation et disposant d'un thermomètre à contact.

Durée d'incubation : 24 heures.

Recherche des coliformes fécaux

Repérer les tubes gazogènes (dont la cloche contient au moins 1/4 de gaz) et y ajouter environ 1 ml de réactif d'indole.

Agiter doucement.

En présence d'indole, une coloration rouge cerise se développe immédiatement (ne pas tenir compte des réactions tardives ou de teintes rose, brune, orangé-rougeâtre, etc.).

Tout tube présentant Gaz + indole est réputé contenir un coliforme fécal (*Escherichia coli* dans la quasi totalité des cas).

Dénombrement

Selon Tables N.P.P. correspondant aux dilutions et au nombre de tubes ensemencés dans chaque série.

VIII - RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES STREPTOCOQUES FECAUX

Milieux utilisés

Test présomptif..... Milieu de ROTHE
 Test confirmatif..... Milieu de LITSKY

- Formule du milieu de ROTHE

	Milieu simple	Milieu double
. Peptone.....	20 g	40 g
. Glucose.....	5 g	10 g
. Chlorure de sodium.....	5 g	10 g
. Phosphate bipotassique.....	2,7 g	5,4 g
. Phosphate monopotassique.....	2,7 g	5,4 g
. Azothydrate de sodium.....	0,2 g	0,4 g
. Eau distillée.....	1 000	1 000

Dissoudre en chauffant modérément - filtrer.

Ajuster le pH : 6,8 à 7.

Répartir le milieu double à raison de 10 ml par tube de 20 x 200.

Stériliser à l'autoclave : 15 minutes à 115° C.

Il est préférable d'utiliser un milieu déshydraté, commercialisé par diverses marques le milieu fourni par l'Institut Pasteur de Lille donne de bons résultats. On l'utilise à raison de 71,2 g par litre de milieu double.

- Formule du milieu de LITSKY

. Peptone.....	20 g
. Glucose.....	5 g
. Chlorure de sodium.....	5 g
. Phosphate bipotassique.....	2,7 g
. Phosphate monopotassique.....	2,7 g
. Azothydrate de sodium.....	0,3 g
. Etyl-violet.....	0,0005

...

Dissoudre en chauffant modérément - filtrer.

Ajuster le pH : 6,8 à 7.

Répartir à raison de 10 ml par tube de 16 x 160.

Stériliser à l'autoclave : 15 minutes à 115° C.

Il est préférable d'utiliser un milieu déshydraté, commercialisé par diverses marques : le milieu fourni par l'Institut Pasteur de Lille donne de bons résultats.

On l'utilise à raison de 35,7 g par litre.

- le premier ensemencement (Test présomptif) se fait sur milieu de ROTHE (double);
- la subculture (Test confirmatif) se fait sur milieu de LITSKY (simple)

Ensemencement (voir Ch. IV - § B)

Pour les analyses habituelles, et quelle que soit la combinaison choisie, on ensemence chaque tube de milieu de ROTHE avec un volume uniforme de 10 ml constitué, soit par le liquide à analyser lui-même, soit par un mélange "liquide à analyser + eau salée 1 % stérile".

Incubation

Test présomptif (milieu de ROTHE)

Placer à l'étuve à 37° C durant 48 heures.

Tout tube présentant, après ce délai, un trouble, est présumé contenir un streptocoque fécal, il doit être obligatoirement repiqué sur milieu confirmatif de LITSKY.

Test confirmatif (milieu de LITSKY)

Placer à l'étuve à 37° C durant 48 heures.

Tout tube présentant après ce délai un trouble net ou un louche, accompagné d'un petit amas violacé dans le fond du tube (agglomérat de corps microbiens ayant fixé le colorant), est considéré positif.

Le dénombrement est donné par la table N.P.P.

IX - RECHERCHE DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

(Groupe des Vibrios N.A.G.)

A - GENERALITES SUR LES VIBRIONS PATHOGENES

Famille des spirillaceae

Gram -

Formes courtes, souvent incurvées (en virgule) - polymorphisme fréquent dans les cultures âgées.

Gilature polaire, très mobile.

Aérobic.

Préfère un pH alcalin (de 7,6 à 9).

Végète de 14 à 42° C (Opt. 37° C).

Supporte des teneurs élevées en sel : ce critère a permis de distinguer

1° - Les halophiles modérés végétant dans des milieux dépourvus de sel ou ayant des teneurs en sel n'excédant pas 3 g %.

Ils comprennent les Vibrions agglutinables dits "Vibrions cholériques" :

. *Vibrio cholerae* (ou *Vibrio ccma*) et

. *Vibrio cholerae* El Tor (biotype du précédent).

tous deux très pathogènes et responsables du "choléra asiatique".

2° - Les halophiles stricts ne se développant pas dans un milieu dépourvu de sel et supportant de hautes teneurs (jusqu'à 10 %).

Ils comprennent les Vibrions N.A.G. (non agglutinables) beaucoup moins pathogènes que les précédents, mais responsables de toxi-infections alimentaires, selon les types :

Le Type I : *Vibrio parahaemolyticus* est toujours pathogène, exige du sel pour sa croissance et supporte jusqu'à 6 %.

Le Type II.... : *Vibrio alginolyticus* est rarement pathogène, exige du sel et tolère jusqu'à 10 %.

Le Type III... : *Vibrio anguillarum* n'est jamais pathogène, exige du sel et supporte jusqu'à 8 %.

...

Caractéristiques biochimiques essentielles

SUCRES : glucose, amidon, dextrine, mannose, maltose sont acidifiés sans gaz.
 saccharose est acidifié sans gaz (ce caractère permet de différencier les *Vibrio cholerae* et *Vibrio cholerae* El Tor (saccharose +) de *Vibrio parahaemolyticus* (saccharose -).
 Lactose, inuline, dulcité : -

Réd. des nitrates..... : +
 Gélatine..... : toujours liquéfiée
 Indole..... : toujours +
 H₂S..... : - (parfois des traces)
 Oxydase/cytochrome-oxydase.... : toujours +

Structure antigénique

Les *Vibrio cholériques* (*Vibrio cholerae* et *Vibrio cholerae* El Tor) disposent des anticorps :

H : (flagellaire non spécifique)
 O : (somatique, spécifique)

Seul ce dernier est utilisable : les deux germes agglutinent dans le sérum O (groupe 1).

(ce test important permet, si nécessaire, la distinction entre les vibrions cholériques, les vibrions non-agglutinables - N.A.G. - tels que : *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* et *V. anguillarum*).

Vibrio parahaemolyticus possède trois variétés d'antigènes :

O : (somatique, thermostable),
 H : (flagellaire, thermolabile),
 K : (capsulaire, de surface qui inhibe la réaction d'agglutination par "O" rendant ainsi "O" inagglutinable).

Aucun de ces anticorps n'est spécifique. En outre, d'autres vibrions spécifiquement "marins" sont agglutinés par les anticorps O et K de *V. parahaemolyticus* : le test d'agglutination n'est absolument pas concluant en ce qui concerne *V. parahaemolyticus*.

En pratique courante, l'identification sérologique n'est pas faite pour ce groupe de germes.

...

Lyse des hématies

Les vibrions cholériques (V. cholerae et V. cholerae El Tor) lysent les hématies de l'homme et du lapin, mais seul V. cholerae El Tor lyse en outre les globules rouges du mouton, ce qui permet, si nécessaire, de les distinguer.

Pour *Vibrio parahaemolyticus*, l'hémo-digestion est négative.

Recherche des Vibrions pathogènes

Elle intéresse :

Vibrio cholerae et *Vibrio cholerae* El Tor, responsables du choléra "Asiatique".
Le groupe des *Vibrio* N.A.G. (non agglutinables) et spécialement *Vibrio parahaemolyticus* responsable des toxi-infections alimentaires.

La présente notice traite uniquement de la recherche des *Vibrio* N.A.G. (*Vibrio parahaemolyticus*) dans les eaux de mer et les coquillages.

(en raison cependant des caractères voisins de ces deux groupes de germes, les éléments différentiels importants entre les vibrions cholériques et les vibrions N.A.G. ont été indiqués).

B - RECHERCHE DE VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS

Le petit nombre de ces organismes dans les eaux de mer et les coquillages rend nécessaire un enrichissement préalable.

E A U X

Procéder à une concentration préalable dans au moins 1 litre d'eau à analyser :

- . dans le cas d'eaux claires, on concentre par passage sur une ou plusieurs membranes,
- . dans le cas d'eaux limoneuses, on concentre par l'alumine.

COQUILLAGES

Broyer et diluer selon la technique habituelle et prélever les volumes choisis :

- . si l'on fait une recherche qualitative, il suffit d'ensemencer 3 tubes avec 10 ml, 1 ml et 0,1 ml,
- . si l'on recherche un dénombrement, on ensemence 3 fois 3 tubes avec 10 ml, 1 ml et 0,1 ml (ou encore 5 ml, 0,5 ml et 0,05 ml) - dénombrement selon tables N.P.P.

ENRICHISSEMENT

10 ml eau ou broyat		+ 10 ml milieu d'enrichissement double (2)
1 ml " "	+ 9 ml diluant (1)	+ 10 "
0,1 ml " "	+ 9,9 " (*)	+ 10 "

Bien agiter les tubes avant incubation

INCUBER 24 h à 37° C

(*) NOTA - L'inoculum de 0,1 ml d'eau ou de broyat sera pris dans 1 ml de la dilution précédente rajouté dans 9 ml de diluant.

ISOLEMENT

Prélever une anse de chacun des tubes ci-dessus, EN SURFACE, et isoler en stries parallèles sur Gélose T.C.B.S. (3) coulée en boîtes de pétri, et bien sèche.

INCUBER 15 à 18 h (maxi) à 37° C

Sur ce milieu, les Vibrio poussent plus vite que la flore adventice, qui est presque totalement inhibée durant les premières heures d'incubation. Les plaques doivent donc être examinées entre 15 et 18 heures après isolement : après ce délai les caractéristiques morphologiques et tinctoriales des colonies de vibrio se modifient et des colonies appartenant à d'autres espèces se développent.

- . Petites colonies à centre vert ou bleu-vert (à bord incolore) (Saccharose -)
 \emptyset 2 à 3 mm, lisses, en dôme : Vibrio parahaemolyticus et éventuellement Vibrio anguillarum ;
- . Petites colonies jaunes (saccharose +) \emptyset 2 à 3 mm : Vibrio cholériques possibles,
- . Grosses colonies jaunes-brun (saccharose +) \emptyset 3 à 6 mm : Vibrio alginolyticus.

(Sur ce milieu, les coliformes, les Proteus et Streptocoques donnent des colonies petites et incolores).

Choisir des colonies "suspectes" (c'est-à-dire : vertes ou bleu-vert, rondes, lisses) et les repiquer sur milieu de KLIGLER salé à 3 % (4), en strie sur la tranche et en piqûre centrale profonde dans la butte.

INCUBER 24 h à 37° C

...

Dans les deux cas de : *Vibrio cholériques* (*V. cholerae* et *V. cholerae* El Tor) et des *Vibrio N.A.G.*, le tube de KLIGLER se présente ainsi :

- Tranche	: rouge (lactose -))) Si KLIGLER différent, inutile de poursuivre
- Butte	: jaune (glucose +) Gaz : 0)	
- H ₂ S	: 0)	

Si KLIGLER comme ci-dessus : ensemercer une galerie de 6 tubes d'eau peptonée alcaline (5) (chacun des 6 tubes ayant respectivement une teneur en NaCl de 0 % ; 1 % ; 3 % ; 6 % ; 8 % ; 10 %).

INCUBER 24 h à 37° C

Les *Vibrio N.A.G.* (comme tous les *Vibrio*) sont Oxydase +, et présentent en outre les caractères halophiles suivants sur eau peptonée alcaline, non salée, salée et hypersalée.

Type I : *Vibrio parahaemolyticus* : Végète et donne de l'indole pour des teneurs en sel de 1, 3 et 6 % (mais non pour 0, 8 et 10 %) Oxydase : +

Type II : *Vibrio alginolyticus* : Végète et donne de l'indole pour des teneurs en sel de 1, 3, 6, 8 et 10 % (mais non pour 0 %) Oxydase : +

Type III : *Vibrio anguillarum* : Végète et donne de l'indole pour des teneurs en sel de : 1, 3, 6 et 8 % (mais non pour 0 et 10 %) Oxydase : +

EXAMENS COMPLEMENTAIRES

L'identification biochimique est fastidieuse et pratiquement inutile en analyse de routine.

On pourra cependant pratiquer les examens complémentaires suivants destinés à assurer le diagnostic :

Examen microscopique : . Mobilité (grande) entre lame et lamelle,
 . Morphologie,
 . Coloration de Gram (-)

...

Distinction entre les 3 types ci-dessus :

	NaCl		Acétoïne	Culture à 42°	Saccharose
	8 %	10 %			
V. parahaemolyticus	-	-	-	+	-
V. alginolyticus	+	+	+	+	+
V. anguillarum	+	-	-	-	-

Epreuves d'agglutination

Dans le cas des Vibrio N.A.G. (V. parahaemolyticus), il n'y a pas d'épreuve d'agglutination possible.

Mais si l'on a pris soin de repiquer des colonies jaunes provenant des plaques T.C.B.S. et ayant donné des éléments positifs sur KLIGLER et EAU PEPTONÉE faisant penser à des Vibrions cholériques, on doit faire une épreuve d'agglutination, elle-ci se fait d'abord en eau physiologique pour s'assurer qu'il n'y a pas auto-agglutination puis, si le résultat est négatif, avec l'antisérum O1.

Si agglutination avec O1 : il s'agit probablement de V. cholerae ou de V. cholerae El Tor : la distinction peut être faite par la recherche de l'acétoïne.

CARACTERES COMMUNS ET DIFFERENTIELS

	Vibrions responsables du choléra		Vibrions responsables de toxi-infections alimen- taires		
	Vibrio Cholerae	Vibrio cholerae El Tor	Vibrio parahaemo- lyticus (Type I)	Vibrio alginolyticus (Type II)	Vibrio anguillarum (Type III)
Entéropathogénicité	+++	+++	++	- (+)	-
Color. colonies sur TCBS	jaune	jaune	Bleu-vert	jaune	bleu-vert
Liquéfaction de la gélatine	+	+	+	+	+
Réduction des nitrates	+	+	+	+	+
Production H ₂ S	-	-	-	-	-
Acidification du saccharose	+	+	-	+	-
Indole (sur E.P. pH 8)	+	+	+	+	+
Acétoïne	-	+	-	+	-
Cytochrome-oxydase	+	+	+	+	+
Arginine dihydrolase	-	-	-	-	-
Lysine-décarboxylase	+	+	+	+	+
Halophilie sur E.P. pH 8					
Teneurs en ClNa					
0 %	+	+	-	-	-
1 %	+	+	+	+	+
3 %	+	+	+	+	+
6 %	-	-	+	+	+
8 %	-	-	-	+	+
10 %	-	-	-	+	-
Hémodigestion (hématies mouton)					
partielle					
totale					
(zone verdâtre) (zone incolore)				-	-
Agglutination sur Antisérum O1	+	+	-	-	-
Croissance à 42° C	+	+	+	+	-

PRINCIPAUX MILIEUX UTILISES(1) Diluant Tryptoné salé*pour enumeration*

Tryptone	1 g)	pH : 8
NaCl	30 g)	Stériliser 20' à 120° C
Eau distillée	1 000 ml)	

(2) Milieu d'enrichissement double

Peptone	40 g)	pH : 8,6
NaCl	60 g)	Stériliser 20' à 120° C
Eau distillée	1 000 ml)	

(3) Gélose TCBS

Peptone	10 g	
Extrait de levure	5	
Citrate de sodium	10	
Thiosulfate de sodium	10	
Chlorure de sodium	10	
Bile de boeuf	8	pH: 8,6
Citrate ferrique	1	
Saccharose	20	
Bleu de bromothymol	0,04	
Bleu de thymol	0,04	
Agar	14	

Dissoudre en chauffant modérément et porter à ébullition jusqu'à dissolution complète dans 1 litre d'eau distillée.

Ne pas autoclaver.

Distribuer en flacons (25 ou 50 ml par flacon) ou directement en boîte de pétri, conserver au réfrigérateur.

L'Institut Pasteur fournit le milieu "prêt à l'emploi en flacon de 25 ml (n° 55 931) ou sous forme déshydratée en boîte de 100 g (n° 69 456) - dans ce cas, il suffit de verser 88 g du produit dans 1 000 ml d'eau, dissoudre en chauffant lentement jusqu'à ébullition - ne pas autoclaver.

(4) Milieu de KLIGLER SALE

Extrait de viande de boeuf	3 g	
Extrait de levure	3	
Peptone	20	
Chlorure de sodium	30	
Citrate ferrique	0,3	
Thiosulfate de sodium	0,3	
Lactose	10	pH : 7,5
Glucose	1	
Rouge de phénol	0,05	
Agar	12	

...

Dissoudre en chauffant et porter à ébullition dans 1 litre d'eau distillée.
 Distribuer en tubes de 16 x 160 - Stériliser à l'autoclave 15 minutes à 120° C.
 Refroidir en position inclinée de façon à obtenir une butte de 3cm de haut environ.
 (le milieu est ensemencé en stries sur la tranche et en piqûre profonde dans la butte).

L'Institut Pasteur fournit le milieu de KLIGLER ordinaire, (c'est-à-dire non salée et contenant seulement 5 g de chlorure de sodium, sous forme déshydratée en boîte de 100 g (n° 64 846) : au moment de la dissolution des 55 g nécessaires pour faire un litre de milieu de KLIGLER ordinaire, il suffit d'ajouter 25 g de chlorure de sodium pour obtenir le milieu de KLIGLER salé nécessaire à la recherche des Vibrio.

(5) Eau peptonée pour recherche caractère halophile du germe

Peptone.....	10 g)	pH 8
NaCl.....	0, 10, 30, 60, 80, 100 g)	
Eau distillée.....	1000 ml)	Stériliser 20' à 120° C

(6) Milieu de CLARK et LUBS

Peptone.....	10 g)	
Phosphate bipotassique.....	2 g)	
Glucose.....	10 g)	pH 7,5
Eau distillée.....	1000 ml)	

Répartir 5 ml par tube. Stériliser 20 mn à 120° C. Recherche de l'Acétyl - Methyl - Carbinol (Acétoïne). Ensemencer largement le milieu. Incuber 24 h à 37°. Prélever 1 ml de la culture, l'additionner de 0,5 ml d'une solution d'alpha-naphtal à 6 % dans alcool à 60° C et de 1 ml d'une solution de soude à 16 %. Agiter. Laisser reposer 1/4 heure. Teinte rouge ou rose : réaction +.

Agglutination avec antisérum (Vibrions cholériques seulement)

Antisérum O1 (Vibrion cholérique) fourni par Institut Pasteur.

...

Test "Cytochrome-oxydase"

On utilise les disques de papier imprégnés d'oxalate de diméthylparaphénylène diamine (Institut Pasteur, n° 53 831), pratiquer ainsi :

- à l'aide d'une effilure de pipette Pasteur (et non d'un fil Nichrome), prélever un fragment de culture sur gélose et le placer sur un disque "OX" imbibé d'eau distillée, la présence d'une oxydase dans le système enzymatique du germe se traduit par une coloration violette immédiate.
- des fausses réactions se produisent lorsqu'on part de culture sur milieux gélosés sucrés (KLIGLER notamment), il est préférable dans ce cas d'utiliser des cultures sur bouillon peptoné. Placer environ 0,5 ml de la culture dans un tube à hémolyse et y ajouter un disque "OX", une coloration violette apparaît après 1/4 d'heure.

Lysine-décarboxylase (milieu de TAYLOR)

Lysine monochlorhydrate	5 g)	
Extrait de levure.....	3 g)	
Glucose.....	1 g)	pH 7,2
Bromocrésol pourpre (solution à 1,6 g % d'alcool à 95° C).....	1 ml)	
Eau distillée.....	1000 ml)	

Répartir environ 5 ml par tube de 16 x 160 et stériliser 15 minutes à 120° C.

Au moment de l'emploi, distribuer aseptiquement l'un des tubes de 16 x 160 en une dizaine de tubes à hémolyse à raison de 0,5 ml par tube.

Ensemencer le tube à hémolyse avec un fragment de culture sur gélose (ou KLIGLER). Placer au bain-marie à 37° durant 2 à 3 heures - la décarboxylation se traduit par une coloration bleu-violet du milieu.

Arginine dihydrolase

Même milieu de base que ci-dessus. Même préparation.

Remplacer la lysine par l'arginine

Saccharose

Peptone.....	10 g)	
Saccharose.....	5 g)	
NaCl.....	30 g)	pH 7,6
Eau distillée.....	1000 ml)	Stériliser 20' à 110° C.

X - RECHERCHE DES SALMONELLA

Nous mentionnerons seulement ici la recherche biochimique des Salmonella permettant d'aboutir au diagnostic de groupe.

Une identification plus précise du type peut cependant être faite, de façon assez facile, à partir des colonies isolées sur gélose et ayant donné un résultat positif sur galeries de diagnostic biochimique, en mettant en oeuvre le diagnostic sérologique.

Nous signalons, pour les laboratoires qui souhaitent faire cette recherche complémentaire, que l'Institut Pasteur distribue les sérums polyvalents T.A.B.C. permettant le diagnostic antigénique de : Salmonella Typhi et des Salmonella paratyphi A, B et C (le mode opératoire - assez simple - est indiqué de façon très claire dans chaque coffret de sérums agglutinants).

PREPARATION DE L'ECHANTILLON

E A U X

On doit procéder à une concentration préalable des germes présents dans au moins 1 litre d'eau à analyser :

- . dans le cas d'eaux de mer limpides, on peut concentrer, par passage de 1 litre (ou plus) sur une ou plusieurs membranes filtrantes (n° Coli 5),
- . dans le cas d'eau limoneuses, on concentre par l'alumine.

COQUILLAGES

Broyer selon technique habituelle et prélever les volumes choisis.

A - IDENTIFICATION BIOCHIMIQUE

1° - Pré-enrichissement non sélectif sur Bouillon nutritif

Dans le cas de filtrat provenant de la concentration par l'alumine ou dans le cas du broyat de chair d'huîtres, les volumes de produit à analyser sont placés dans des flacons contenant le milieu de pré-enrichissement double (soit 1

volume de bouillon double + 1 volume de produit à analyser).

Dans le cas de concentration des germes de l'eau sur membrane, on place directement celle-ci (ou celles-ci) dans un tube ou un flacon contenant le milieu de pré-enrichissement simple.

Dans les deux cas, incuber 16 à 20 h à 37° C.

2° - Enrichissement sur milieux d'enrichissement sélectifs

Transférer 10 ml de la culture précédente dans deux flacons contenant :

- . l'un 100 ml de milieu liquide au Sélénite) incubation 24 h à 37° C)
- . l'autre 100 ml de " " " Tétrathionate) " " à 43° C)

3° - Isolement sur milieux gélosés

A partir de chacun des 2 milieux ci-dessus, pratiquer des isolements (1 öse bouclée) sur des boîtes de Pétri contenant les géloses bien sèches (*)

- . Gélose lactosé au vert brillant et au rouge de phénol) incubation 24 h à 37° C.
- . Gélose au désoxycholate-citrate-lactose)

4° - Identification

a) Examen des colonies isolées :

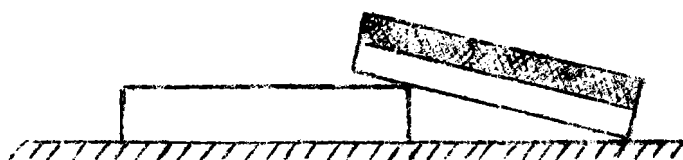
Sur Gélose au vert brillant de Kristensen

- . colonies roses et halo rouge Salmonelles possibles,
- . colonies vertes et halo jaune-vert..... Coliformes ou autres germes lactose + et saccharose +

Sur Gélose au désoxycholate-citrate-lactose

- . colonies incolores ou blanchâtres à centre noir : Salmonelles possibles (H₂S +) Arizona
- . colonies rouges..... : E. coli et autres coliformes lactose +
- . colonies roses à centre noir..... ; Citrobacter freundii.

(*) Pour obtenir des géloses bien sèches, on place le couvercle de la boîte sur une étagère de l'étuve à 37° C, ouverture dirigée vers le bas, le fond qui contient le milieu gélosé solidifié étant posé obliquement sur le couvercle, ouverture également dirigée vers le bas (voir figure).



b) Galerie de diagnostic biochimique

Les colonies typiques repérées sur les plaques précédentes sont repiquées sur l'une des galeries de diagnostic biochimique ci-après :

- Milieu urée-indole

Placer immédiatement au bain-marie à 37° C durant 4 heures.

Si, après ce délai, le milieu devient rouge : uréase +, il ne s'agit pas d'une Salmonelle et il est inutile de poursuivre. Sinon remettre au B.M. jusqu'à 24 h.

Milieu Mannitol-Mobilité)	
et)	incuber 24 heures à 37° C
Gélose au fer de Kligler)	

(Après 24 h : rechercher l'indole. Si indole +, il ne s'agit pas d'une Salmonelle et il est inutile de poursuivre.

Si indole -, voir résultats suivants)

Examiner résultats des tubes de Mannitol-Mobilité et Gélose de Kligler

Si : Mobilité +)	
Mannitol +)	
)	
et Kligler (Lactose -	(tranche rouge)) Salmonelle possible
(Glucose +	(butte jaune)	
(H ₂ S +	(plus ou moins abondant)	

- Ensemencer une Galerie API (se reporter à la technique d'ensemencement et à la fiche de diagnostic différentiel des entérobactéries, éditées par cette Maison).

SCHEMA DE LA RECHERCHE BIOCHIMIQUE

25 g flocculat Eau
ou
broyat de coquillages
ensemencé sur :

Milieu de Pré-enrichissement non sélectif

(16 à 20 h à 37° C)



Enrichissement de 10 ml dans
10 ml de Milieu sélectif au Sélénite

(18 à 24 h à 37° C)

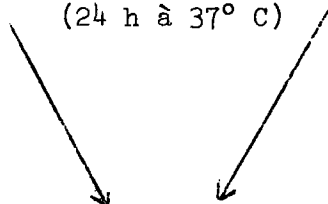


Isolements sur :

Gélose au V.B.

Gélose D.C.L.

(24 h à 37° C)



Repiquages
colonies typiques
sur :

Galerie : Kligler
Urée-Indole
Mannitol-Mobilité

ou : API

Enrichissement de 10 ml dans
100 ml de Milieu sélectif au tétrathionate

(18 h à 43° C)

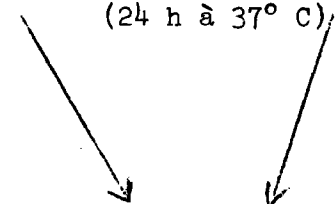


Isolements sur :

Gélose au V.B.

Gélose D.C.L.

(24 h à 37° C)



Repiquages
colonies typiques
sur :

Galerie : Kligler
Urée-Indole
Mannitol-Mobilité

ou : API

Bouillon de pré-enrichissement, non sélectif

	Concentration simple		Concentration double	
Peptone.....	5 g		10 g	
Extrait de viande.....	1		2	
Extrait de levure.....	2	pH 7,4	4	pH 7,4
Chlorure de sodium.....	5		10	

Dissoudre en chauffant modérément, répartir le milieu double à raison de 25 ou 50 ml par flacon. Répartir le milieu simple à raison de 15 ml par tube.

(L'Institut Pasteur fournit le Bouillon nutritif sous forme déshydratée, il suffit de dissoudre dans l'eau les quantités correspondant aux deux formules ci-dessus).

Stériliser 15 minutes à 120° C.

Milieux d'enrichissement sélectif- Bouillon au sélénite

Peptone.....	5 g	
Phosphate de sodium.....	10	
Lactose.....	4	pH 7
Bi-sélénite de sodium.....	4	
Eau.....	1 000	

Dissoudre en chauffant modérément jusqu'à complète dissolution. Ajuster le pH. Répartir 100 ml par flacon. Ne pas autoclaver. Stériliser 10 minutes au bain-marie bouillant.

(L'Institut Pasteur fournit ce milieu sous forme déshydratée).

- Bouillon au tétrathionate de sodium, de Muller-Kauffman

Peptone de soja.....	2,3 g	
Hydrolysate de caséine.....	7	
Chlorure de sodium.....	2,3	
Carbonate de calcium.....	25	pH 7
Hyposulfite de sodium.....	40,7	
Bile de boeuf.....	4,75	
Eau.....	1 000	

Dissoudre en chauffant jusqu'à ébullition. Ajuster le pH après refroidissement.

Ajouter : 19 ml d'une solution iodo-iodurée,
9,5 ml d'une solution de vert brillant à 0,1 %

Bien mélanger. Répartir 100 ml par flacon.

Ne pas stériliser.

Utiliser immédiatement ou conserver au réfrigérateur à + 4° C.

(L'Institut Pasteur fournit le milieu sous forme déshydratée - base seulement -. Il convient d'y ajouter les deux solutions ci-dessus au moment de l'emploi).

...

Gélose lactosée au vert brillant et au rouge de phénol (dite de Kristensen)

Protéose-peptone.....	10 g	
Extrait de levure.....	3	
Chlorure de sodium.....	5	
Lactose.....	10	pH 7
Saccharose.....	10	
Vert brillant.....	0,0125	
Rouge de phénol.....	0,08	
Agar.....	12	
Eau.....	1 000	

Dissoudre en chauffant jusqu'à ébullition. Ajuster le pH après refroidissement. Répartir à raison de 100 ml par flacon ou 20 ml par tube de 20 x 200. Stériliser 15 minutes à 115° C.

(les boîtes de pétri recevront par la suite environ 20 ml par boîte).

(L'Institut Pasteur fournit ce milieu prêt à l'emploi ou sous forme déshydratée).

Gélose au désoxycholate-citrate-lactose (Hynes)

Peptone.....	5 g	
Extrait de viande.....	5	
Citrate de sodium.....	8,5	
Hyposulfite de sodium.....	5,4	
Citrate ferrique.....	1	pH 7,3
Désoxycholate de sodium.....	5	
Rouge neutre.....	0,02	
Agar.....	12	
Eau.....	1 000	

Dissoudre en chauffant lentement jusqu'à ébullition, qui ne doit pas être poursuivie. Après léger refroidissement, ajuster exactement à 1 litre. Ajuster le pH. Répartir à raison de 100 ml par flacon ou 20 ml par tube de 20 x 200.

Ne pas stériliser.

(L'Institut Pasteur fournit ce milieu sous forme déshydratée).

Gélose au fer de Kligler-Hajna

Peptone.....	20 g	
Extrait de viande de boeuf.....	3	
Extrait de levure.....	3	
Chlorure de sodium.....	5	
Citrate ferrique.....	0,3	
Hyposulfite de sodium.....	0,3	pH 7,4
Lactose.....	10	
Glucose.....	1	
Rouge de phénol.....	0,05	
Agar.....	12	
Eau.....	1 000	

Dissoudre en chauffant lentement jusqu'à ébullition. Refroidir et

ajuster le pH. Répartir 8 ml par tube. Stériliser à 115° C. pendant 15 minutes.
 Refroidir en position inclinée de façon à avoir une butte de 3 cm environ de haut.

(L'Institut Pasteur fournit le milieu prêt à l'emploi et sous forme déshydratée).

Milieu urée-indole

L-Tryptophane.....	3 g
Phosphate diacide de potassium.....	1
Phosphate monoacide de potassium...	1
Chlorure de sodium.....	5
Urée.....	20
Alcool à 95° C.....	10 ml
Solution de rouge de phénol à 1 %..	2,5 ml
Eau.....	1 000

Dissoudre en chauffant légèrement. Ne pas stériliser par chauffage mais par filtration sur bougie L3 ou membrane.

Répartir 1 ml par tube à hémolyse.

(On a tout avantage à utiliser le milieu fourni tout prêt par l'Institut Pasteur).

Milieu Mannitol-Mobilitéé

Peptone.....	20 g	
Nitrate de potassium.....	2	
Mannitol.....	2	
Rouge de phénol à 1 %.....	4 ml	pH 8
Agar.....	4	
Eau.....	1 000	

Dissoudre en chauffant lentement et en agitant constamment jusqu'à ébullition. Après refroidissement, ajuster le pH.

Répartir environ 8 ml par tube de 16 x 160.

Stériliser 15 minutes à 115° C

(L'Institut Pasteur fournit ce milieu prêt à l'emploi).

XI - RECHERCHE DES SPORES DE CLOSTRIDIUM SULFITO-REDUCTEURS

Milieu utilisé - "Viande-Foie"

Digestion pepsique de viande et de foie de boeuf.....	1 000 ml	
Glucose.....	2 g	
Amidon soluble.....	2 g	pH 7,7
Agar.....	15 g	

Dissoudre en chauffant modérément - Répartir 20 ml par tube de 20 x 200.
Stériliser 15 minutes à 115° C.

Préparer les solutions suivantes :

- . Sol. A) solution de sulfite de soude pur cristallisé à 5 % dans eau distillée
(peut être stérilisée par séjour de 10 mn au bain-marie bouillant)
- . Sol. B) solution de citrate de fer ammoniacal à 5 % dans eau distillée stérile.
(ne pas stériliser)

L'Institut Pasteur fournit le milieu prêt à l'emploi ou le milieu-base déshydraté - Merk fournit le milieu complet sous forme déshydratée).

Préparation de l'eau à analyser

Afin de détruire les formes végétatives des bactéries et conserver seulement les spores thermo-résistantes, placer 10 ml de l'eau à analyser dans un gros tube à essai Pyrex et chauffer au bain-marie réglé à 75° C durant 10 minutes. Refroidir rapidement sous courant d'eau.

Ensemencement

Faire fondre au bain-marie bouillant le tube de gélose V.F. jusqu'à liquéfaction complète. Refroidir ensuite jusqu'à 55° C environ et ajouter à chaque tube :

- 0,5 ml de la solution A) ci-dessus,
 - 4 gouttes de la solution B) ci-dessus.
- Remettre au bain-marie réglé à 55° C environ.

...

Trois tubes de gélose V.F. ainsi préparés sont ensemencés :

- . le premier avec 5 ml de l'eau à analyser
- . le 2ème avec 5 ml d'une dilution au 1/10 de l'eau à analyser
- . le 3ème avec 5 ml d'une dilution au 1/100 de l'eau à analyser.

Mélanger doucement pour éviter toute introduction d'air, refroidir immédiatement sous courant d'eau.

INCUBER 18 à 24 h à 37° C

Lecture

Les Clostridium sulfito-réducteurs (total des bactéries sporogènes réductrices) donnent après 18 à 24 heures des colonies noires par réduction du sulfite et production de sulfure de fer.

(Si l'on recherche spécialement Cl. Perfringens, on cultive à 44° C de façon à rendre le milieu plus sélectif).

XII - TECHNIQUE DE COLORATION DES BACTERIES ET METHODE DE GRAM

Préparation

Sur une lame propre, étaler une petite quantité de culture en bouillon avec une anse de platine. Pour les cultures sur milieu gélosé, prélever une colonie avec un fil et la diluer sur la lame dans une petite quantité d'eau stérile.

Laisser sécher à l'air.

Après dessiccation (aspect terne), fixer la préparation par la chaleur en passant la lame trois fois dans la flamme d'un bunsen, frottis en dessus (le fixage par l'alcool s'utilise surtout pour les produits pathologiques).

Laver à l'eau courante.

Coloration simple

Sur la lame encore mouillée, verser 5 gouttes du colorant choisi qui sera étalé en remuant la lame. Laisser agir une minute et rejeter le colorant.

Laver à l'eau.

Sécher d'abord sur papier Joseph, puis à l'air jusqu'à dessiccation complète.

Observer à l'objectif à immersion.

Double coloration (méthode de GRAM)

Principe :

Alors que la coloration simple permet de teinter toutes les bactéries, la coloration par la méthode de GRAM permet de les classer en deux groupes, selon qu'ils conservent ou ne conservent pas la coloration initiale.

Au cours d'une première coloration, on fait agir un colorant (violet de gentiane ou cristal violet) qui colore tous les germes. Pour fixer ce colorant et supporter les opérations ultérieures on applique un mordant, la solution de LUGOL.

...

Après décoloration par l'alcool, seules restent colorées les bactéries qui gardent la coloration violette initiale : elles sont dites GRAM +. Les autres qui sont décolorées sont dites GRAM -.

Pour distinguer aisément ces bactéries GRAM -, on procède à une deuxième coloration avec un colorant différent du premier, dit "colorant de contraste" (fushine basique de ZIEHL) qui leur donne une teinte rouge.

De la sorte, à la fin du traitement :

- . les bactéries colorées en violet-noir sont dites GRAM +
- . les bactéries colorées en rouge sont dites GRAM -

Technique

- a) sur la préparation séchée et fixée, verser 2 ou 3 gouttes de solution de violet de gentiane ; laisser en contact 60 secondes.
- b) rejeter le colorant et sans laver, recouvrir de solution de LUGOL durant quelques secondes ; jeter la solution et recommencer 2 fois jusqu'à ce que la pellicule mordorée ait disparu (2 minutes environ au total), vider.
- c) laver à l'eau courante.
- d) à la partie supérieure de la lame tenue inclinée, verser quelques gouttes d'alcool à 90° qui, au début s'écoule violet. Arrêter la décoloration dès que l'alcool n'entraîne plus de colorant et laver rapidement à l'eau.
- on peut aussi différencier à l'aide d'un mélange alcool-acétone ainsi composé : alcool absolu 5 parties - acétone 1 partie -
- e) la lame étant bien égouttée, recolorer avec quelques gouttes de solution de fuschine de ZIEHL à diluer au 1/10ème. Maintenir environ 30 secondes en contact.
- f) écouler le ZIEHL, laver à l'eau, sécher au papier Joseph, puis à l'air.
- g) observer à l'objectif à immersion.

Solutions : Coloration simple

Colorant (violet de gentiane, ou cristal violet ou bleu de méthylène)	1 g
Acide phénique cristallisé	2 g
Broyer au mortier en ajoutant peu à peu : alcool	10 ml
Ajouter ensuite eau distillée	100 ml
Laisser reposer 24 heures et filtrer.	

...

Coloration de GRAM

Procéder comme coloration simple avec le violet de gentiane

Solution iodo-iodurée (mordant) de LUGOL

Iodure de potassium.....	2 g
Iode.....	1 g
Eau distillée.....	200 ml

Dissoudre d'abord l'iodure de potassium dans un peu d'eau ; ajouter l'iode et triturer au mortier jusqu'à complète dissolution de l'iode et compléter avec l'eau distillée.

Solution de Fuschine de ZIEHL

Fuschine basique de Ziehl.....	1 g
Alcool à 90°	10 g
Acide phénique cristallisé.....	5 g
Eau distillée.....	500 ml

Dissoudre le colorant dans l'alcool, ajouter l'acide phénique par petites quantités, triturer au mortier, ajouter l'eau peu à peu - laisser reposer 24 heures - filtrer.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- A.F.N.O.R., 1978.- Directives générales pour le dénombrement des coliformes. Technique du Nombre le plus probable, après incubation à 30° C.
Norme française enregistrée.- Nov. 1978.
- A.F.N.O.R., 1976.- Directives générales pour la recherche des Salmonella.
Norme expérimentale.- Mars 1976.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1970.- Recommended procedures for the bacteriological examination of sea water and shellfish (4° ed.)
A.P.H.A. - 1970 New-York.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 1957.- Seventh ed., Baltimore. The William and Wilkin C°. 1094 p. (Lib. Lavoisier, 11 rue Lavoisier, Paris 8è).
- BRISOU (J.), 1955.- Microbiologie du milieu marin.- Paris, Ed. médic. Flammarion, 271 p.
- BRISOU (J.F.) et DENIS (F.A.), 1978.- Hygiène de l'environnement maritime.- Paris, Masson Ed.- 218 p.
- BUTTIAUX (R.), 1951.- L'analyse bactériologique des eaux de consommation.- Paris, Ed. médic. Flammarion, 209 p.
- BUTTIAUX (R.), BEEERENS (H.), TACQUET (A.), 1974.- Manuel des techniques bactériologiques.- Paris, Flammarion Médecine-sciences, 700 p.
- CASSAGNE (H.), 1966.- Milieux de culture (2è ed.), St. Mandé - Ed. de la Tourelle, 379 p. (Lib. de la Cité - 14 r. d'Orléans, Nantes).
- I.C.M.S.F., 1978.- Micro-organisms in foods. 1 - Their significance and methods of enumeration (2è. ed.) - University of Toronto., 434 p. (Lib. Lavoisier, 11 rue Lavoisier, Paris 8ème).
- JOURNAL OFFICIEL du 12.3.1969 : Circulaire du 10.1.1969 relative aux instructions techniques pour la détermination de la pollution bactériologique des eaux superficielles (méthodes recommandées pour l'analyse bactériologique des eaux superficielles).
- LECLERC (H.), BUTTIAUX (R.), GUILLAUME (J.), WATTRE (P.), 1977.- Microbiologie appliquée. Paris, Douin Ed., 228 p. (Lib. Lavoisier, 11 rue Lavoisier Paris 8è).
- LE MINOR (L.), 1967.- Le diagnostic de laboratoire des entérobactéries.- St Mandé, Ed. de La Tourelle, 222 p. (Lib. de la Cité - 14 r. d'Orléans, Nantes).
- O.M.S., 1974.- Guide pour le diagnostic de laboratoire du choléra - 24 p. (Lib. Arnette, 2 rue C. Delavigne, Paris 6è).
- O.M.S., 1974.- Maladies d'origine alimentaire. Méthodes d'échantillonnage et d'examen dans les programmes de surveillance - Rapport technique n° 543, 54 p. (Lib. Arnette, 2 rue C. Delavigne, Paris 6è).

- O.M.S., 1977.- Directives applicables à la surveillance sanitaire de la qualité des eaux littorales.- Bureau régional de l'Europe - Copenhague, 172 p.
- STANIER (R.Y.), DOUDOROFF (M.), ADELBERG (ED.A.), 1966.- Microbiologie générale.- Paris, Masson Ed. - 638 p.
- WOOD (P.C.), 1977.- Manuel d'hygiène des fruits de mer - O.M.S. (édition française) 86 p. (Lib. Arnette, 2 rue C. Delavigne, Paris 6è).

-:-:-:-:-:-:-