

DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'AMÉNAGEMENT LITTORAL

Méthode d'analyse bactériologique pour le contrôle des coquillages :
Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (*E. coli*
préssumé) par la méthode NPP 3 x 5 tubes

par Christiane HERVÉ

R.INT.DEL/97.11/NANTES



**DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE
L'AMÉNAGEMENT LITTORAL**

**Méthode d'analyse bactériologique pour le contrôle des coquillages :
Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (*E. coli*
préssumé) par la méthode NPP 3 x 5 tubes**

par Christiane HERVÉ

R.INT.DEL/97.11/NANTES

Numéro d'identification du rapport : DEL/CAQ/RST/97.11		date de publication Décembre 1997	
Diffusion : libre		nombre de pages 13	
Validé par : Pierre MAGGI – secrétaire du Comité de lecture des rapports de la DEL		bibliographie : Non	
Version du document :		illustration(s) : Oui	
		langue du rapport Français	
Titre et sous-titre du rapport : Méthode d'analyse bactériologique pour le contrôle des coquillages : Recherche et dénombrement des coliformes thermotolérants (<i>E. coli</i> présumé) par la méthode NPP 3 x 5 tubes.			
Titre traduit : Bacteriological analysis method for shellfish examination. Detection and enumeration of thermotolerant coliform (<i>E. coli</i>) by 5_tube 3_dilution – MPN Test.			
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom HERVÉ Christiane		Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER / DEL / Cellule Assurance Qualité	
Collaborateur(s) : nom, prénom		Organisme / Direction / Service, laboratoire	
Travaux universitaires : diplôme : discipline : établissement de soutenance : année de soutenance :			
Titre du contrat de recherche :			n° de contrat IFREMER
Organisme commanditaire : nom développé, sigle, adresse			
Organisme(s) réalisateur(s) : nom(s) développé(s), sigle(s), adresse(s)			
Responsable scientifique :			
Cadre de la recherche : Programme : Convention : Projet : Autres (préciser) : Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)			

Résumé :

Ce document technique concerne le dénombrement des coliformes thermotolérants (*E. coli*) dans les coquillages selon la méthode NPP sur milieux liquides (Bouillon Bilié lactosé au Vert Brillant).

Le matériel nécessaire est inventorié, il décrit les méthodes de préparation des milieux de culture et de l'échantillon, et comment procéder à l'analyse

Abstract :**Mots-clés :**

Contamination fécale – Enumération – Coquillages – Méthode d'analyse

Keywords :**Commentaire :**

Ce rapport actualise la méthode colimétrique déjà décrite dans un précédent rapport (R.INT.DEL/93.01/Nantes) qui devient caduc.

SOMMAIRE

I – APPAREILLAGE, VERRERIE, PETIT MATERIEL	5
II – DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS	6
1. <i>Préparation de l'échantillon pour essai</i>	7
2. <i>Recherche et dénombrement d'Escherichia coli présumé</i>	7
III – PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI	9
IV – RECHERCHE ET DENOMBREMENT D'ESCHERICHIA COLI présumé.....	10
1. <i>Ensemencement*</i>	10
2. <i>Incubation</i>	10
3. <i>Repiquage</i>	12
4. <i>Incubation</i>	12
5. <i>Examen des tubes</i>	12
6. <i>Interprétation</i>	12
7. <i>Expression des résultats</i>	12
8. <i>Table NPP – 3 séries de 5 tubes</i>	13

* Le schéma descriptif de l'analyse se trouve p. 11

I – APPAREILLAGE, VERRERIE ET PETIT MATERIEL

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

- Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) et en chaleur humide (autoclave).
Le matériel utilisé doit être stérilisé, soit au four en le maintenant à une température de $180^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 1 heure, soit à l'autoclave en le maintenant à une température de $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant au moins 20 minutes.
- Armoire de séchage pour la verrerie.
- Bain-marie couvert, réglable à $44^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- Etuves réglables à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
- Répartiteurs de milieux manuels ou automatiques Optifix 10 ml, 50 ml. Les pompes péristaltiques sont à proscrire.
- pH-mètre permettant de mesurer le pH des milieux et réactifs préparés avec une précision de lecture de $\pm 0,01$ unité pH à 25°C , assurant la réalisation des mesures précises à $\pm 0,1$ unité pH.
- Balance électronique à plateau supérieur permettant une pesée au décigramme près.
- Broyeur-homogénéisateur mécanique, dont la vitesse de rotation permet d'obtenir 15 000 tours par minute et équipé de bols stérilisables, fermant hermétiquement, de 0,5 l de capacité WARING BLENDOR.
- Réfrigérateur réglable à $2^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Plaque électrique ou réchaud permettant la dissolution des milieux gélosés.
- Bêchers en verre de différentes capacités, pour la préparation des milieux.
- Flacons de 100 ml et de 250 ml bouchés à vis pour la stérilisation et la conservation du diluant.
- Tubes à essais en verre de 16 mm x 160 mm et de 18 mm x 180 mm bouchés à vis.
- Cloches de Durham d'un diamètre de 8 mm et de 40 mm de longueur.
- Ensemenceurs stériles calibrés en matière plastique à usage unique de 10 μl .
- Eprouvettes graduées de 250, 500 et 1 000 ml.
- Pipettes à usage bactériologique à écoulement total de 5 ml, avec une incertitude de mesure de $\pm 0,5\%$.
- Système d'aspiration mécanique pour pipettes.
- Lames porte-objet pour observation microscopique.

- Matériel pour le prélèvement et le transport des échantillons :
 - . sachets en matière plastique, à usage unique, étanches et résistants,
 - . coffrets isothermes,
 - . accumulateurs de froid.
- Matériel pour la préparation de l'échantillon pour essai : brosses de différentes dimensions, couteaux à huitres, scalpels.

II – DILUANTS, MILIEUX DE CULTURE ET REACTIFS

Pour améliorer la reproductibilité des résultats, il est recommandé d'utiliser des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés pour la préparation des milieux de culture. De la même façon, des préparations commerciales de réactifs peuvent être utilisées, si elles donnent satisfaction. Sauf indications contraires, les instructions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les composants de base et les milieux déshydratés doivent être conservés dans un endroit frais, sec et à l'abri de la lumière.

Les produits chimiques utilisés pour la préparation des milieux de culture doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être purifiée (eau distillée ou déionisée ou bien osmosée), exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Le pH des milieux doit être mesuré au moyen d'un pH-mètre préalablement étalonné. Si nécessaire, l'ajuster avec une solution normale d'hydroxyde de sodium (40 g/l) ou une solution normale d'acide chlorhydrique (36,5 g/l), de sorte qu'après stérilisation, le milieu soit au pH demandé.

Les milieux de culture sont généralement stérilisés à l'autoclave à $121^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ pendant 15 minutes, sauf indications contraires. Veiller à ce que le temps pour atteindre la température de stérilisation et le temps nécessaire au refroidissement ne soient pas trop longs, afin d'éviter la dégradation de certains composants du milieu. Ne pas surcharger l'autoclave.

Si les milieux de culture ne sont pas utilisés immédiatement après leur préparation, ils doivent être conservés dans des tubes ou dans des flacons fermant hermétiquement, à une température de $20^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, à l'obscurité, pendant 1 mois au maximum ou bien au réfrigérateur à température $+2 \pm 2^{\circ} \text{C}$ pendant 3 mois au maximum.

Ne jamais utiliser des milieux de culture préparés qui se sont desséchés.

Voici la liste des milieux déshydratés et réactifs à utiliser :

DILUANT

- . Tryptone sel Biokar BK 014

COLIFORMES

- . Bouillon lactosé bilié, au vert brillant (BLBVB) DIFCO 007
- . Eau peptonnée : Biokar BK 084 ou Merck 10859
- . Réactif de Kovacs : Merck 9293

1. Préparation de l'échantillon pour essai

Diluant tryptone-sel

Composition

Peptone de caséine trypsique (tryptone)	1,0 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau	1 000 ml
soit milieu complet déshydraté	9,5 g/l

Préparation

Dissoudre les composants ou le milieu déshydraté complet dans l'eau distillée. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,0 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir à raison de 200 ml environ dans des flacons de 250 ml.

Stériliser à l'autoclave à $121 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 15 minutes.

2. Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* présumé

2.1 Diluant tryptone-sel

Composition et préparation : voir ci-dessus la préparation de l'échantillon pour essai, mais répartir, par quantité de 45 ml dans des flacons de 100 ml. L'incertitude des mesures de volumes ne doit pas excéder $\pm 2\%$.

2.2 Bouillon lactose bilié au vert brillant

Composition	milieu simple concentration	milieu concentré (1,5)
Peptone	10,0 g	15,0 g
Lactose	10,0 g	15,0 g
Bile de boeuf déshydratée	20,0 g	30,0 g
Vert brillant	0,0133 g	0,0200 g
Eau	1 000 ml	1 000 ml
Soit milieu complet déshydraté	40 g/l	60 g/l

Préparation

Dissoudre dans l'eau distillée le milieu complet déshydraté, ou les composants.

Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,3 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir le milieu simple concentration dans des tubes à essais de 16 mm x 160 mm et le milieu concentré dans des tubes à essais de 18 mm x 180 mm à raison de 10 ml par tube et les munir de cloche de Durham.

Stériliser à l'autoclave à $121 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 15 minutes.

*2.3. Eau peptonée*Composition

Peptone de caséine tryptique	10,0 g
Chlorure de sodium	5,0 g
Eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre dans l'eau distillée le milieu complet déshydraté ou les composants. Si nécessaire, ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,2 \pm 0,2$ à 25°C .

Répartir par quantités de 10 ml dans des tubes à essais de 16 x 160 mm.

Stériliser à l'autoclave à $121 \pm 1^\circ \text{C}$ pendant 15 minutes.

*2.4. Réactif pour la recherche de l'indole (Réactif de Kovacs)*Composition

Diméthylamino-4 benzaldéhyde	5,0 g
Méthyl-2 butanol ou pentanol	75,0 ml
Acide chlorhydrique (35 à 37 %)	25,0 ml

Préparation

Dissoudre l'aldéhyde dans l'alcool en chauffant modérément au bain-marie (50 à 55°C).

Refroidir et ajouter l'acide goutte à goutte en remuant constamment.

Mettre le réactif préparé dans un flacon en verre brun et le conserver à $2 \pm 2^\circ \text{C}$ environ à l'abri de la lumière.

Le réactif doit être de couleur jaune clair à brun clair.

Une préparation commerciale est conseillée.

III – PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR ESSAI

L'échantillon pour essai doit comprendre un nombre d'individus au moins égal à 5 et suffisant pour obtenir de 70 à 100 g de chair et de liquide intervalvaire par type de germe recherché.

S'assurer que les coquillages sont encore vivants (coquille bien fermée) et non endommagés.

Nettoyer soigneusement chaque individu sous courant d'eau froide potable avec une brosse appropriée de manière à éliminer les souillures externes, en insistant au niveau de la charnière ou du point d'ouverture. S'il y a présence d'un byssus, l'arracher après un nettoyage soigneux.

Egoutter les coquillages lavés et les poser sur un plateau propre étiqueté et recouvert de papier absorbant renouvelé pour chaque échantillon.

Se laver soigneusement les mains avant d'ouvrir les coquillages.

Ouvrir la coquille à l'aide d'un couteau à huître ou d'un scalpel stérilisé par flambage à l'éthanol et refroidi.

Recueillir dans un bol de broyeur WARING BLENDOR stérile préalablement taré :

- le liquide intervalvaire ;
- la totalité de la chair, après l'avoir détachée de la coquille (fond et couvercle) à l'aide d'un scalpel stérilisé par flambage à l'éthanol et refroidi ou d'un bistouri stérile.

Peser la chair additionnée du liquide intervalvaire et ajouter, au moyen d'un récipient stérile, une masse de diluant (en g) égale à 2 fois le poids (en g) de chair + liquide intervalvaire.

Broyer, au moyen du broyeur-homogénéisateur WARING BLENDOR, pendant 45 ± 15 secondes suivant les coquillages, en réglant la vitesse de rotation de l'appareil pendant 5 à 10 secondes à petite vitesse et terminer à grande vitesse.

On obtient ainsi une suspension-mère au 1/3 qui constitue l'échantillon pour essai.

N.B. – Pour les gros coquillages, il est parfois nécessaire d'utiliser les bols d'une capacité plus grande ou plusieurs bols. Dans ce dernier cas, transférer dans un bol de broyeur stérile une quote-part de chaque broyat obtenu précédemment, à l'aide d'une éprouvette stérile, de façon à obtenir un volume correspondant à 75 g de mélange par germe recherché ; mélanger pendant 5 à 10 secondes à l'aide du broyeur homogénéisateur, puis procéder à l'ensemencement.

IV – RECHERCHE ET DENOMBREMENT D'*ESCHERICHIA COLI* présumé

Trois séries de cinq tubes de milieu liquide sont ensemencées avec l'échantillon pour essai et les dilutions décimales de celui-ci. Le dénombrement indirect est effectué à l'aide de la méthode du nombre le plus probable (NPP).

1. *Ensemencement (Figure 1 – page 11)*

1.1. Vingt à trente minutes après le broyage, prélever 5 ml de l'échantillon pour essai (suspension-mère) à l'aide d'une pipette stérile de 5 ml et transférer dans un flacon contenant 45 ml de diluant, réalisant ainsi une dilution au 1/10 (10^{-1}).

Prélever à nouveau 5 fois 5 ml de la suspension-mère à l'aide de la même pipette et transférer à chaque fois dans un tube contenant 10 ml de bouillon lactosé bilié au vert brillant concentration 1,5. Mélanger l'inoculum et le milieu de culture par retournement du tube. S'assurer de l'absence d'air dans la cloche de Durham et dévisser légèrement le bouchon du tube pour que l'air puisse passer librement.

1.2. Homogénéiser la dilution au 1/10 (10^{-1}) par retournement du flacon de diluant. Prélever 5 ml de cette dilution à l'aide d'une nouvelle pipette stérile de 5 ml et transférer dans un flacon contenant 45 ml de diluant, réalisant ainsi une dilution au 1/100 (10^{-2}).

Après homogénéisation, prélever à nouveau 5 fois 5 ml de la même dilution (10^{-1}) à l'aide de la même pipette et transférer à chaque fois dans un tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant concentration 1,5. Mélanger l'inoculum et le milieu de culture par retournement du tube. S'assurer de l'absence d'air dans la cloche de Durham et dévisser légèrement le bouchon du tube pour que l'air puisse passer librement.

1.3. Répéter avec la dilution au 1/100 (10^{-2}) les opérations décrites précédemment en 1.2.

N.B. – Afin d'éviter des résultats indéterminés et en fonction du nombre présumé d'*E. Coli* dans l'échantillon pour essai, une ou plusieurs dilutions supplémentaires pourront être préparées pour ensemencer une ou plusieurs autres séries de 5 tubes de bouillon lactosé bilié au vert brillant concentration 1,5.

2. *Incubation*

Incuber les séries de tubes ensemencés à l'étuve à $37^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C pendant $48 \text{ h} \pm 2$ heures. Observer les cultures pendant cette période d'incubation.

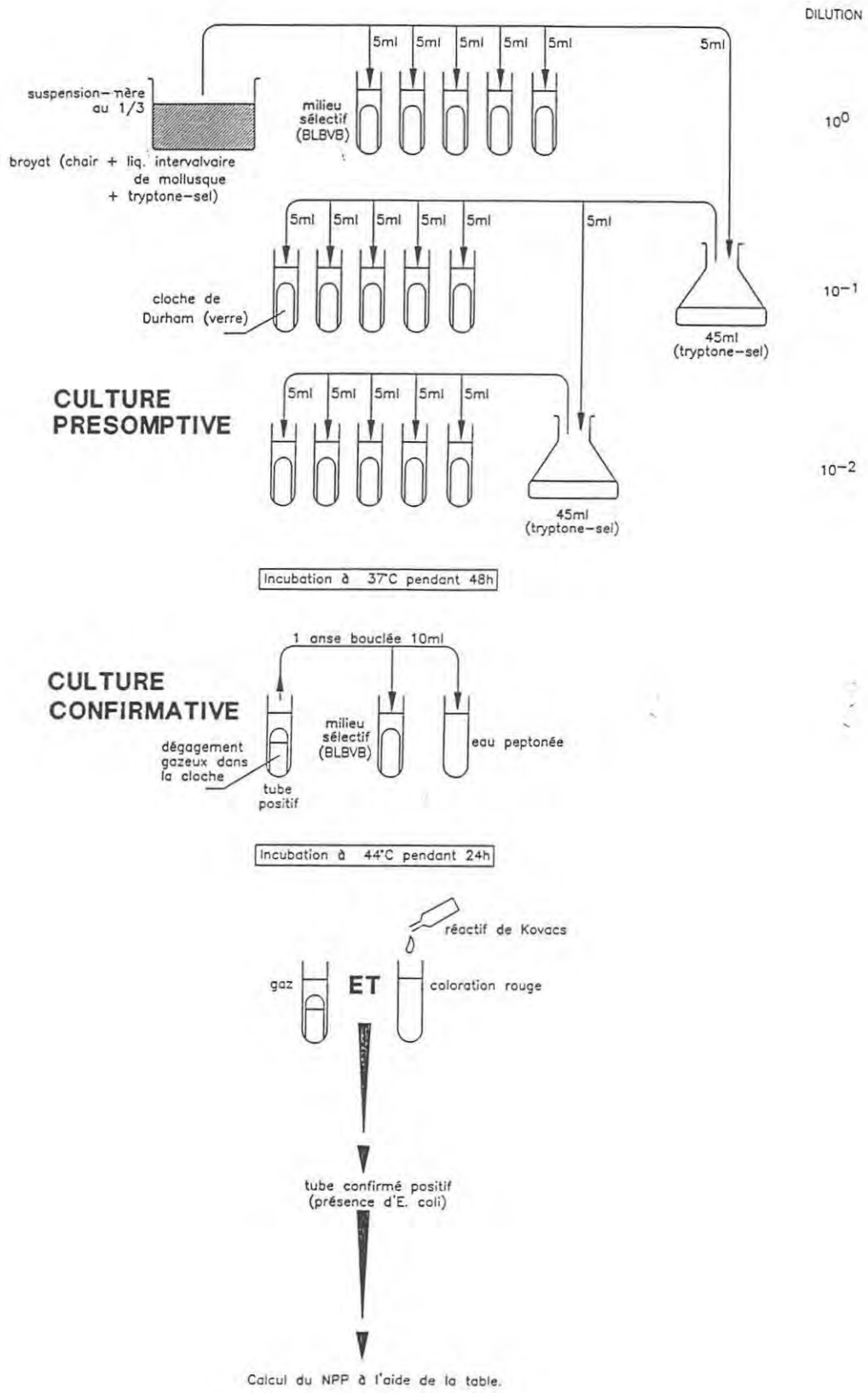


Figure 1 : Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* présumé

3. Repiquage

Dans chaque série, chaque tube positif, c'est-à-dire présentant un dégagement gazeux au moins égal à 1/10 du volume total de la cloche de Durham, est repiqué en portant 10 μ l de la culture dans un tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant simple concentration et dans un tube d'eau peptonée.

Toutefois, dans la série de tubes ensemencés avec la suspension-mère, un épaissement de la culture avec formation d'un bouchon à sa partie supérieure peut se produire, plaçant celle-ci dans des conditions d'anaérobiose et empêchant par ailleurs l'observation d'un dégagement gazeux éventuel. Il convient alors de repiquer systématiquement tous les tubes de cette série.

4. Incubation

Incuber les tubes ainsi ensemencés au bain-marie à $44^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pendant $24\text{ h} \pm 1$ heure.

5. Examen des tubes

Noter les tubes présentant un dégagement gazeux au moins égal à 1/10 du volume total de la cloche de Durham. On admet qu'il y a présomption de coliformes fécaux

Ajouter dans les tubes d'eau peptonée correspondants 0,5 ml environ du réactif de Kovacs pour la recherche de l'indole ; mélanger. La formation d'un anneau rouge-cerise à la partie supérieure du milieu indique la présence d'indole.

6. Interprétation

On admet qu'il y a présomption de coliformes thermotolérants (*Escherichia coli*) présumé lorsqu'il y a simultanément production de gaz et présence d'indole après incubation à $44^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

7. Expression des résultats

L'interprétation numérique des résultats de l'analyse, exprimés en nombre de tubes positifs par dilution, fournit l'estimation du nombre le plus probable (NPP) d'*Escherichia coli* présumé (ou de coliforme thermotolérants) dans 100 g de chair et de liquide intervalvaire de l'échantillon analysé.

La table ci-après donne les estimations précises, ou résultats du NPP pour trois dilutions et cinq tubes par dilution, selon le mode opératoire précédemment décrit.

Lorsque le résultat obtenu est supérieur à 1 000, les résultats sont exprimés en conservant trois chiffres significatifs.

Quand le quatrième chiffre du résultat est inférieur à cinq, il est arrondi à la valeur inférieure et lorsqu'il est supérieur ou égal, il est arrondi à la valeur supérieure.

Un programme informatique, réalisé par B. BELIAEFF (IFREMER, Nantes) permet de construire des tables NPP, quelles que soient les nombres de dilutions ou de tubes par dilution, les volumes d'inoculum et les facteurs de dilution.

8. Table NPP - 3 séries de 5 tubes

Res	NPP/100ml	p	CI (95%)		CI (99%)	
0 1 0	11	0.033444	3 -	61	1 -	81
1 0 0	12	0.364834	3 -	67	1 -	90
1 0 1	24	0.005352	7 -	88	4 -	113
1 1 0	24	0.054502	7 -	88	4 -	114
1 2 0	37	0.005629	13 -	109	8 -	137
2 0 0	27	0.265794	8 -	100	5 -	129
2 0 1	41	0.007429	15 -	123	9 -	155
2 1 0	41	0.076618	15 -	124	9 -	157
2 2 0	56	0.012823	23 -	148	15 -	184
3 0 0	47	0.217378	17 -	146	10 -	186
3 0 1	63	0.009966	26 -	174	17 -	218
3 1 0	64	0.104593	26 -	177	17 -	222
3 1 1	82	0.006387	36 -	206	25 -	255
3 2 0	83	0.027199	36 -	210	25 -	259
4 0 0	77	0.186809	31 -	228	20 -	292
4 0 1	99	0.013736	43 -	272	30 -	344
4 1 0	101	0.148273	44 -	279	30 -	353
4 1 1	127	0.014185	58 -	328	42 -	409
4 2 0	130	0.062588	59 -	338	42 -	421
4 2 1	159	0.007585	76 -	391	55 -	482
4 3 0	163	0.017161	77 -	403	57 -	498
5 0 0	139	0.166427	60 -	521	41 -	696
5 0 1	188	0.022731	84 -	667	59 -	869
5 1 0	197	0.263795	88 -	730	61 -	958
5 1 1	274	0.052064	122 -	914	86 -	1170
5 1 2	379	0.005750	166 -	1108	118 -	1390
5 2 0	296	0.260160	130 -	1030	91 -	1327
5 2 1	420	0.078924	180 -	1263	127 -	1593
5 2 2	566	0.013433	244 -	1505	173 -	1867
5 3 0	475	0.225641	198 -	1488	138 -	1896
5 3 1	652	0.110376	276 -	1802	193 -	2259
5 3 2	843	0.029163	373 -	2135	264 -	2643
5 4 0	780	0.199227	324 -	2337	223 -	2994
5 4 1	1034	0.161477	452 -	2872	316 -	3633
5 4 2	1327	0.069817	608 -	3479	435 -	4349
5 4 3	1669	0.019685	794 -	4168	580 -	5153
5 5 0	1439	0.187215	625 -	5622	425 -	7553
5 5 1	2086	0.312381	929 -	8063	642 -	10608
5 5 2	3254	0.336837	1403 -	11697	972 -	15117
5 5 3	5507	0.345420	2232 -	17702	1531 -	22712
5 5 4	9657	0.409600	3961 -	31738	2668 -	41444

Table produite a l'aide du programme FORTRAN 'npp.f' sur station SUN par

E. Beliaeff
 IFREMER DEL/QM
 BP 1105
 Rue de l'île d'Yeu
 44311 Nantes Cedex 03
 Tel: 40374158
 e-mail: bbeliaef@ifremer.fr