

## UNE METHODE DE RECHERCHE RAPIDE DES COLIFORMES FECAUX DANS LES EAUX DE MER ET LES COQUILLAGES

par Jean MAZIERES, Brigitte RICHARD et Sylviane MAZIERES (1)

Les méthodes de colimétrie actuelles nécessitent un délai excessif dans la plupart des cas (48 ou 72 heures), car elles recourent à la pratique du test présomptif (coliformes totaux) et du test confirmatif (coliformes fécaux). En raison de l'augmentation du nombre des analyses de coquillages découlant de l'intensification du contrôle sanitaire sur les lieux de production, il devient nécessaire de disposer d'une méthodologie adaptée, permettant des interventions rapides. On sait que toutes les méthodes d'investigation en matière de salubrité des coquillages font appel à la recherche des « germes tests de contamination », soit essentiellement : coliformes totaux et coliformes fécaux, auxquels s'ajoutent parfois les streptocoques fécaux. Ces recherches se font sur milieux solides ou liquides.

Dans le premier cas, il y a ensemencement sur le milieu gélosé sélectif choisi, soit directement, soit après filtration d'un fort volume d'eau sur membrane (mais cette technique n'est pas applicable aux coquillages, et rarement à l'eau de mer). Le dénombrement se fait par comptage des colonies caractéristiques.

Dans le second cas, l'inoculation en milieu sélectif liquide (tubes de bouillon) fournit, après incubation, des réactions biochimiques caractéristiques (par exemple : gaz, ou gaz et indole). Le dénombrement se fait à l'aide des tables de dénombrement en usage, dites du « nombre le plus probable » (N.P.P.).

L'ensemencement sur milieu gélosé a l'avantage d'une bonne différenciation des colonies et d'une meilleure exactitude apparente. En effet, chaque germe pousse théoriquement en dehors de toute concurrence et fournit une colonie isolée qu'il suffit de repérer. D'autre part, l'incubation est courte (18 à 24 heures). Toutefois, ces avantages sont contrebalancés par des inconvénients certains. C'est ainsi que la différenciation morphologique ou tinctoriale des colonies est hasardeuse lorsqu'on a affaire à des organismes ayant des caractéristiques biochimiques voisines. Par ailleurs, l'exactitude du comptage est amoindrie ou même nulle lorsque les colonies sont confluentes ou en amas. Enfin, dans le cas des coquillages, la présence de glycogène ou de produits sexuels dans le broyat gêne ou même s'oppose à la croissance des germes en provoquant une « couverture » superficielle de la gélose. Ainsi, malgré ses avantages sur le plan de la rapidité, cette méthode ne peut être utilisée en pratique courante pour les coquillages. C'est pour cela que l'I.S.T.P.M. a opté pour l'utilisation d'un milieu sélectif liquide, méthode qui présente une exactitude suffisante puisque l'application d'une formule mathématique permet de pondérer les aberrations éventuelles résultant d'une dispersion incorrecte des microorganismes.

La méthode utilisée est celle du bouillon à la bile et au vert brillant (B.B.V.) :

---

(1) I.S.T.P.M. — 67, rue Gambetta, 14150 Ouistreham.

une première incubation de 48 heures à 37° C (test présumptif) permet le dénombrement de coliformes totaux (production de gaz seulement) ;

une subculture de 24 heures (test confirmatif) est nécessaire pour le dénombrement des coliformes fécaux grâce à l'application du test de MACKENZIE.

Cette méthode est satisfaisante mais d'une durée excessive ; elle nécessite en effet une subculture et un matériel abondant. On peut se demander par ailleurs si la recherche des coliformes totaux présente un réel intérêt du point de vue du contrôle sanitaire des lieux de production ? En effet, les bactéries coliformes autres que *Escherichia coli* ne sont pas toujours un signe de contamination fécale : certaines d'entre elles ont une origine tellurique. Enfin, à 30 ou 37° C, la présence de gaz peut être due soit à des streptocoques ou *Clostridium* qui peuvent végéter dans la zone inférieure des tubes, soit à des Bacillaceae.

Dans ces conditions, la recherche des coliformes totaux ne paraît pas s'imposer en pratique courante. Ce n'est que dans certains cas, et pour apprécier par exemple l'efficacité d'un traitement épurateur (les « autres coliformes » étant généralement tenus pour plus résistants), que l'on aura recours à la recherche préalable des coliformes totaux. Mais dans la plupart des cas, il paraît très suffisant au niveau des lieux de production de s'en tenir aux coliformes fécaux, témoins plus rigoureux d'une contamination fécale. C'est dans ce but qu'une méthode de colimétrie rapide a été étudiée, permettant le dénombrement des seuls « coliformes fécaux » (méthode mannitol).

### 1. Méthode proposée.

Les coliformes fécaux sont des bactéries du groupe des coliformes (famille des Enterobacteriaceae), qui, après incubation à 44° C, fermentent le lactose avec dégagement de gaz et produisent de l'indole aux dépens du tryptophane de la peptone. Il s'agit en fait, le plus souvent, de *Escherichia coli*, ce dernier devant, en outre, répondre aux tests : I.M.VIC : ++— —. Ces deux réactions : pouvoir fermentatif des sucres et pouvoir indologène sont importantes, mais on sait qu'il est impossible de pratiquer les deux tests sur le même tube de bouillon, car la présence du lactose (ou d'autres sucres) empêche la formation d'indole. C'est la raison pour laquelle, le test de MACKENZIE se pratique simultanément sur deux tubes de milieux : l'un pour la recherche du pouvoir fermentatif, l'autre pour la recherche du pouvoir indologène.

Notre étude a donc porté sur la mise au point d'un seul milieu permettant la recherche simultanée de ces deux réactions, et ce, dans un laps de temps n'excédant pas 24 heures. Elle aboutit à la formule ci-après dans laquelle le lactose a été remplacé par le mannitol qui est un hexalcool :  $(\text{CH}_2\text{OH} - (\text{CHOH})_4 - \text{CH}_2\text{OH})$ . On sait que le mannitol est attaqué et fermenté par *Escherichia coli* dans 98 % des cas ; il donne du gaz dans les mêmes conditions que le lactose mais ne gêne en rien la production d'indole lors de la dégradation du tryptophane. Ces propriétés l'ont déjà fait utiliser dans des milieux servant à l'identification de *Escherichia coli* et notamment :

le milieu de SCHUBERT (modifié par FENNEL), contenant 15 g de mannitol ;

le milieu de PUGSLEY *et al.*, contenant 5 g de mannitol pour 1 litre.

Toutefois, il s'agissait là de milieux destinés à l'identification, à partir de colonies isolées, mais non de milieux sélectifs destinés à la recherche directe de *Escherichia coli*, dans un produit hétérogène, contenant de nombreuses espèces microbiennes.

Le milieu proposé, après ensemencement, a la formule suivante :

Tryptone	12 g
Tryptophane	1 g
Mannitol	9 g
Bile de bœuf déshydratée	25 g
Chlorure de sodium	5 g
Phosphate monopotassique	1,5 g
Phosphate di-potassique	3,5 g
Lauryl-sulfate de sodium	0,2 g
Eau pH = 7	1000

Pour l'analyse, il convient de disposer d'un milieu double qui s'obtient soit en multipliant chacune des quantités de produits ci-dessus par 2 pour 1000 ml d'eau, soit en dissolvant les quantités de produits ci-dessus dans 500 ml d'eau seulement. Répartir à raison de 10 ml très exactement par tube de 20 × 200 mm muni d'une cloche de Durham (9 × 36 mm), et bouché vis. Stériliser à l'autoclave 15 minutes à 115° C.

#### *Ensemencement.*

En général, onensemence 3 séries de 3 tubes contenant 10 ml de milieu double, avec un volume uniforme de 10 ml constitué soit par le produit à analyser lui-même, soit par une dilution : produit à analyser + eau salée 1 % stérile. Selon la richesse présumée en germes, on retiendra l'une des combinaisons suivantes : 10 ml - 1 ml - 0,1 ml ou 5 ml - 0,5 ml - 0,05 ml ou 2,5 ml - 0,25 ml - 0,025 ml.

L'analyse des coquillages pose souvent, en raison de leur teneur élevée en glycogène ou en produits génitaux, un problème de dégagement du gaz, ou de son observation dans la cloche lorsque les volumes inoculés sont trop importants (c'est le cas par exemple des 3 premiers tubes ensemencés avec 10 ml de broyat de chair de coquillages pour la série : 10 ml - 1 ml et 0,1 ml). Nous conseillons donc, en pratique courante pour les coquillages, de recourir à la série : 5 ml - 0,5 ml et 0,05 ml : ces volumes et l'adoption des tubes 20 × 200 mm permettent une bonne observation du pouvoir gazogène. En outre, la gradation des résultats paraît bien adaptée à la plupart des situations en hygiène conchylicole. Pour les eaux, l'opacité des cultures primaires ne se posant pas, onensemence indifféremment l'une ou l'autre des séries, en fonction de l'échelonnement souhaité des numérations. Des dilutions décimales successives permettent d'atteindre des numérations plus élevées en cas de fortes contaminations : il suffit alors d'appliquer aux résultats fournis par les tables N.P.P. le coefficient multiplicateur voulu.

#### *Incubation.*

Les portoirs supportant les 9 tubes ensemencés sont placés, immédiatement après inoculation, dans un bain-marie à circulation thermostaté, réglé très exactement à 44° C (tolérance thermique maximale : ± 0,2° C). Utiliser pour cela un bain-marie parfaitement calorifugé ou une cuve munie d'un thermo-plongeur à circulation et disposant d'un thermomètre à contact. Après 24 heures d'incubation, les tubes sont sortis du bain-marie. On ajoute dans tous les tubes présentant un dégagement gazeux important (au moins 1/4 de la cloche) : 1 ml de réactif de KOVACS. La présence d'indole se signale par un anneau « rouge-cerise » qui se concentre à la surface du bouillon après légère agitation.

Tout tube présentant : gaz + indole est positif, c'est-à-dire contenait à l'origine, au moins un coliforme fécal. Pour les dénombrements, se reporter aux tables N.P.P. correspondant aux séries et aux nombres de tubes ensemencés.

## **2. Observations concernant la composition du milieu.**

L'emploi de tryptone riche en acides aminés, contenant au moins 1 % de tryptophane est recommandé et le complexe « phosphates » assure le tampon pH favorable au développement rapide des germes. Le pouvoir sélectif du milieu est assuré par :

la température d'incubation qui doit être réglée et maintenue à 44° C. ;

la présence de la bile qui inhibe la flore secondaire Gram +, les germes sporulés, et est favorable aux bactéries intestinales (facteurs de croissance). On peut remplacer la bile par les sels biliaires, ce qui permet d'obtenir un bouillon plus clair. En effet, la bile déshydratée provoque un trouble du milieu lors de l'adjonction du réactif de KOVACS, mais celui-ci ne gêne en rien l'observation de la coloration rouge cerise de l'indol toujours parfaitement nette. De plus, la bile déshydratée apporte un complexe de substances nutritives et vitaminiques, favorable à la croissance bactérienne. Elle est donc préférable aux sels biliaires ;

la présence de lauryl-sulfate de sodium favorise le pouvoir gazogène des coliformes, tout en s'opposant au développement des bacillaceae et de diverses bactéries Gram +.

*Essais comparatifs.*

Une première série de comparaison a été faite avec le milieu à la bile et au vert brillant couramment utilisé dans les laboratoires I.S.T.P.M. On a écarté les analyses de produits complètement indemnes de germes ou au contraire très pollués, de façon à obtenir des numérations comparables et comprises dans les limites numériques du N.P.P. Le maximum de précautions a

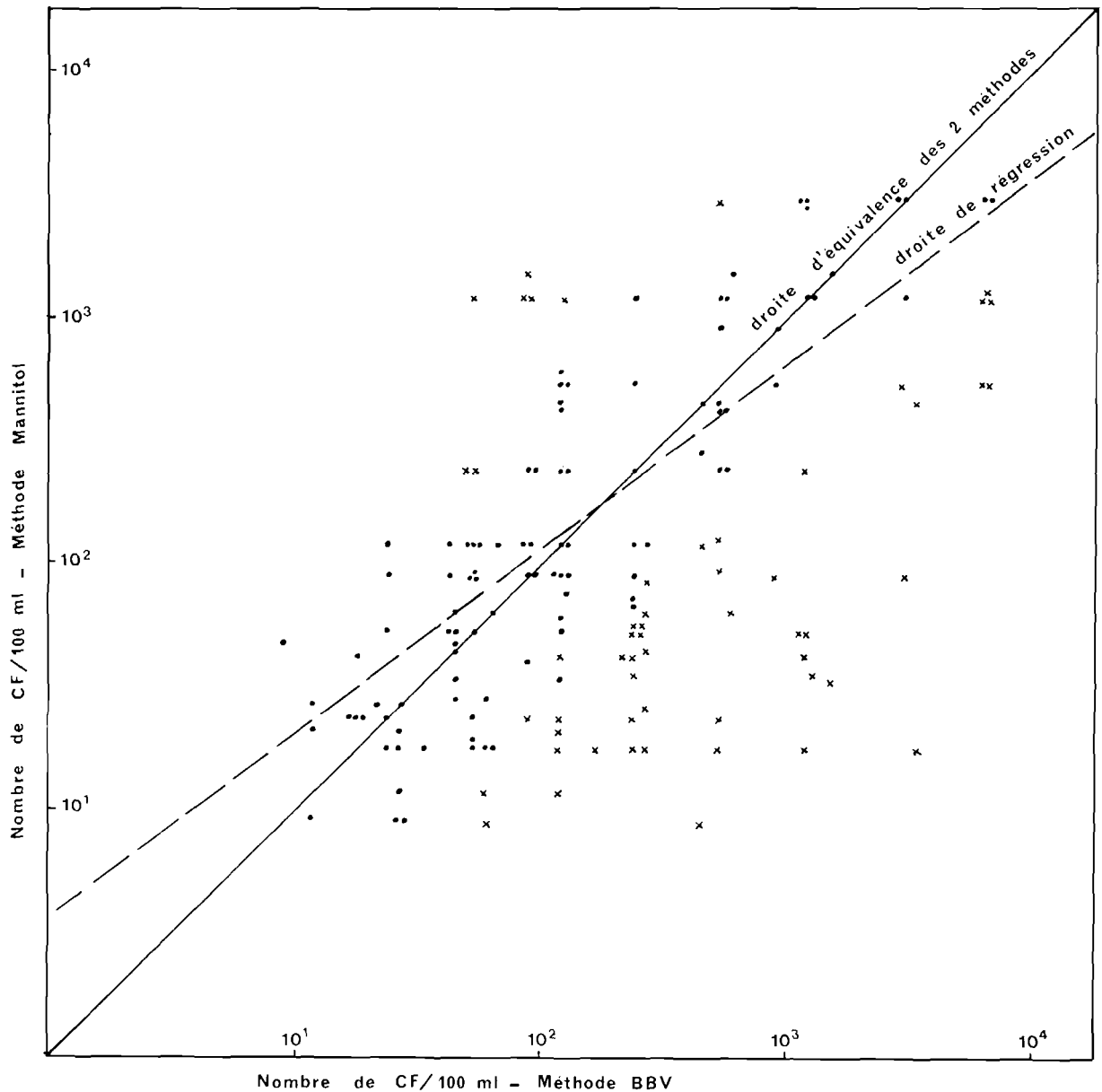


Fig. 1. — Comparaison des teneurs en coliformes fécaux obtenues par les méthodes B.B.V. et Mannitol (● résultats non significativement différents, × résultats significativement différents).

été pris pour assurer la meilleure dispersion-répartition des germes dans les deux milieux. Sur 120 analyses faites dans les conditions ci-dessus, nous avons obtenu, comparativement au milieu B.B.V.: 60 % de résultats identiques ou très proches, 28 % de résultats « mannitol » plus faibles et 12 % de résultats « mannitol » plus forts.

Sur le plan qualitatif, des isollements ont été faits sur gélose à l'éosine et au bleu de méthylène et sur gélose au bromocrésol pourpre à partir des tubes positifs (gaz et indole), diagnostic sur milieu de KLIGER et galerie I.M.VIC (et parfois API) : dans 95 % des cas, il s'agissait bien de *Escherichia coli*. Dans aucun des tubes s'étant révélés positifs pour l'un ou l'autre seulement des paramètres ci-dessus, nous n'avons mis en évidence un *Escherichia coli* typique.

Par la suite, le nouveau milieu a été expérimenté par trois autres laboratoires ayant une bonne pratique du dénombrement des coliformes fécaux dans les eaux de mer et les coquillages. Les ensemencements ont été faits en parallèle sur le milieu à la bile et au vert brillant (B.B.V.) avec deux dilutions au 1/10<sup>e</sup> par séries de trois tubes de manière à utiliser les tables de MAC GRADY. Aucune différence significative n'ayant été observée entre les divers laboratoires, les 193 résultats obtenus ont tous été regroupés.

La méthode au B.B.V. est la méthode de référence. Les N.P.P. donnés par les deux méthodes sont considérés comme non significativement différents quand le N.P.P. obtenu dans la méthode au mannitol se range à l'intérieur de l'intervalle de confiance à 95 % du N.P.P. obtenu dans la méthode au B.B.V. Dans le cas contraire, les N.P.P. sont considérés comme significativement différents. Par rapport à la méthode au B.B.V. : 69,4 % des résultats sont comparables, 26,4 % des résultats « mannitol » sont plus faibles et 4,2 % des résultats « mannitol » sont plus forts.

Une analyse de variance et une régression linéaire ont été effectuées sur l'ensemble des dénombrements de cette seconde série d'essais. Les caractéristiques de la droite de régression (fig. 1) sont les suivantes : pente de la droite,  $a = 0,75$  ; ordonnée à l'origine,  $b = 0,57$ . La corrélation est faible entre les deux méthodes (coefficient de corrélation  $r = 0,35$ ).

En résumé, ce milieu donne des résultats intéressants. Par rapport à la méthode traditionnelle utilisant le milieu à la bile et au vert brillant pour la colimétrie dans les eaux de mer et les coquillages, il ne permet pas la recherche des coliformes totaux, mais seulement celle des coliformes fécaux. Il présente les avantages suivants : temps de réponse court (24 heures au maximum), économie de temps, de produits et de matériel (pas de subculture), réaction spécifique de *Escherichia coli* (gaz et indole) dans un seul et même tube de bouillon.

#### BIBLIOGRAPHIE

- FENNEL (H.), 1972. — A single tube confirmatory test for *E. coli* at 44° C. — *Proc. Soc. Wat. Treatm. Exam.*, **21** : p. 13-20.
- MACKENZIE (E.F.N.), TAYLOR (E.N.) et GILBERT (W.E.), 1948. — Recent experiences in the rapid identification of *Bacterium coli*, type 1. — *J. Gen. Microbiol.*, **2**, p. 197-204.
- OGER (C.) et LECLERC (H.), 1977. — Essai de nouveaux tests « haute température » pour la mise en évidence des coliformes fécaux ou des *E. coli* dans les eaux. — *Microbia*, **3**, n° 1, p. 47-55.
- PUGSLEY (A.P.), EIVSON (L.M.) et HAMES (A.), 1973. — A simple technique for the differentiation of *E. coli* in water examination. — *Water Research*, **7**, p. 1431-1437.
-