



Fiche Technique : Analyses Microbiologiques pour la Potabilisation de l'Eau du Lac de GUIERS

Cheikh Tidiane DIOP^{1, 2}, Laurence ANNE³, * Mamadou NIANG,¹ Institut Sénégalais de Recherches Agricoles (CRODT/ ISRA), Pôle de recherches de Hann. BP 2241, Dakar, Sénégal. ² Laboratoire Départemental et Régional de Biologie et d'Hygiène (LBDRH) 14000 Caen, FRANCE. ³ Société Nationale d'Exploitation des Eaux du Sénégal (SONEES), Point B, Dakar, Sénégal.

1° Introduction

Problématique : La pollution biologique des eaux est le *rejet dans les eaux continentales d'une grande quantité de substances ayant des origines diverses* : effluents urbains contenant des débris ménagers, matières fécales, lessives, effluents industriels de diverses entreprises: papeteries, Laiteries etc.

La forte concentration bactériologique peut poser des problèmes sanitaires. **Le rôle auto-épurateur de l'environnement marin, est une hypothèse remise en question.** Car la mise en évidence de survie des bactéries rejetées et leur capacité de croître à nouveau lorsqu'elles rencontrent des conditions favorables est une réalité.

Le rejet des eaux d'égouts urbains en mer présente des risques de contamination pour l'homme, qu'il s'agisse de coquillage ou d'autres produits de mer, de sport nautique. Concernant les rivières, il y a aussi rejet avec accumulation d'origine industrielle. Il est une nécessité de contrôler régulièrement le niveau de pollution des *eaux douces et de la mer*, surtout si l'eau est destinée à l'élevage et à la consommation domestique.

Importance : Depuis de nombreuses années, la contamination des eaux est évaluée en bactériologie par la recherche des indicateurs de pollution fécale. Des micro-organismes présents dans l'intestin de l'homme et des animaux à sang chaud :

1/ les coliformes totaux ; 2/ les coliformes thermo tolérants ; 3/ les streptocoques fécaux.

Colimétrie

Dénombrement des coliformes. Les coliformes font partie des Entérobactéries. C'est-à-dire des bactéries qui sont: Gram - ; Oxydase-, ; Anaérobies facultatives; Fermentant le glucose avec ou sans production de gaz; Réduisant les nitrates en nitrite; Possédant la propriété de fermenter le lactose avec ou sans gaz don Lac+.

Les coliformes thermo tolérants sont des coliformes qui possèdent les mêmes propriétés et sont capables de fermenter le lactose (c'est-à-dire Lac+) à **44 °C**. La colimétrie peut comporter: Les coliformes totaux et les coliformes thermo tolérants.

Ces trois recherches servent de traceurs pour de nombreuses bactéries pathogènes rejetées dans les matières fécales: Salmonella, Vibrions, Shigella, E. coli, Campylobacter. Par la recherche des indicateurs on met en évidence le niveau de pollution des eaux, **s'ils sont en nombre important par rapport aux normes, il ya des consignes d'urgence.** On peut discuter de la validité de ces témoins de contamination fécale. Il sera surtout question dans cette fiche technique de l'analyse microbiologique de l'eau destinée à la consommation humaine.

2° Mode opératoire

Pour faire l'analyse bactériologique des eaux, on dispose de différentes techniques de dénombrement afin de rechercher les germes les plus courantes.

Dénombrement de coliformes totaux

La première est composée d'hôtes habituels du sol et des eaux. La deuxième, les coliformes thermo-tolérants amenés par les matières fécales. Pour les mettre en évidence, on dispose de deux méthodes:

- Technique en milieu liquide (NPP);
- Technique de dénombrement sur membrane;

Nous développerons la dernière qui est pratiquée dans ce laboratoire. *Technique de dénombrement sur membrane:*

On utilise une rampe de filtration avec des creusets stérilisés à chaque échantillon et du verre frité. Sur le verre frité, on dépose la membrane stérile dans les conditions d'asepsie.

Filtrer 100 ml d'eau. La membrane retient les **bactéries de tailles supérieures à 0,45 µm**,

Translater la membrane sur un milieu de BBM (Bleu de BroMoThymol) sans bulles d'air;

Pour 20 ml de milieu, on ajoute 1 ml de TTC à 0,05% et 1 ml de solution de Tergitol, à 0,02% au moment de le couler dans des boîtes de Pétri. C'est un milieu sélectif pour coliformes. Les germes contenus dans 100 ml vont puiser à travers la membrane des éléments nutritifs dans le milieu et donner naissance à des colonies jaunes décolorant le BBM en jaune pendant l'incubation de **24h à 37h**.

Lecture: Toutes les colonies suspectes avec un halot jaune sur le milieu sont repiquées sur le milieu Vert brillant de Shubert

pour déterminer les coliformes totaux et thermo tolérants par 100 ml. On utilise cette méthode pour les eaux d'adduction naturelles ou traitées, qu'elles soient ou de distribution, les particuliers, les eaux d'abreuvement d'animaux, les eaux de piscine (prélèvements en profondeur). En quoi consiste la technique en NPP?

Technique en milieu (NPP):

NPP = Nombre le Plus Probable.

On utilise le nombre suivant qui permet de déterminer la suspicion des coliformes: Le bouillon lactosé utilisé à simple ou double concentration.

Ensemencement:

- 3 tubes de 20 ml du bouillon lactosé concentré,

Ajouter **10 ml** d'échantillon d'eau à analyser. On obtient un bouillon lactosé à simple concentration.

- 3 tubes de 10 ml de bouillon lactosé simple,

Ajouter **1 ml** d'échantillon d'eau à analyser,

- 3 tubes de 10 ml de bouillon lactosé simple,

Ajouter **1ml** de dilution 10^{-1} à 10^{-4} . Mettre à l'étuve à 30 °C pendant 48 h,

Lecture: On considère suspects tous les tubes ayant 1/10 de gaz dans la cloche et un trouble du milieu lactosé.

Confirmation des coliformes totaux et thermo tolérants par repiquage en parallèle sur deux milieux différents à deux températures

Sur Vert Brillant repiquage à **37°C** pendant **48 heures**, permet de déterminer les coliformes totaux;

Sur milieu de Shubert, incubation à **44°C** à bain marie pendant **48 heures**, permet de déterminer les coliformes thermo tolérants;

Sur les coliformes confirmés + au repiquage, on détermine le NPP, par une table. (non indiquée).

Remarque:

On utilise cette méthode pour les eaux de rivière, eau de mer, plan d'eau de baignade.

Pour les eaux résiduaires, on prend deux tubesensemencés à partir de 10 ml jusqu'à la dilution 10^{-7} . Rivières pour consommation humaine
NPP:

Coliformes thermotolérants / 100ml = < 20 00.

Streptocoques fécaux/ 100 ml = <10 000.

Dénombrement des streptocoques fécaux

Ce sont des bactéries du groupe D; Bactéries Gram ⁺; Sphériques à ovoïdes, formant quand elles sont cultivées en milieu liquide des diplocoques, des chainettes; Catalases⁻, possédant l'antigène du Groupe D, Nous disposons de deux techniques:

A / En milieu liquide (NPP):

Ensemencement d'une prise d'essai de l'échantillon homogénéisé, dilué ou non, dans une série de tubes de bouillon glucosé à l'azote NaN_3 ;

Examen des tubes après **24** et **48 heures** d'incubation à **38°C**;

Repiquage des cultures ayant donné lieu à une réaction positive, sont repiqués sur milieu de confirmation (gélose bilié à l'esculine);

On ajoute un indicateur coloré qui donne une coloration **rouge pourpre**, au milieu de Rothe quand il est négatif et une **couleur jaune** quand il est positif (pour éviter de confondre avec le bouillon lactosé, utilisé pour les coliformes

Mode opératoire:

Même méthode pour les coliformes pour ensemencement. Les deux méthodes sont faites en parallèle;

Incubation à **37 °C** pendant **48 heures**,

Lecture: sont considérés suspects les tubes **jaunes** avec trouble du milieu;

Repiquage des tubes suspects sur gélose BEA à **37 °C** pendant **24 heures**.

Les streptocoques du groupe D se développent et hydrolysent l'**esculine**, le produit final se combine avec les ions Fe^{3+} , pour donner un composé de coloration noire qui diffuse dans le milieu.

Remarque:

Le repiquage par piqûre dans la gélose empêche une diffusion très grande dans le milieu. NPP: On ne tient compte que des tubes suspects confirmés par **BEA à 37 °C** pendant **24 heures**.

B / Technique sur membrane:

On utilise le même matériel pour le dénombrement des coliformes sur membrane. Le milieu est adapté au développement des streptocoques: milieu de **Slanetz** et **Barthley**, auquel on rajoute du **TTC 0,5 ml à 1%** pour 100 ml de milieu. Le TTC donne la coloration aux colonies qui sont développées sur la membrane.

Mode opératoire:

Mettre une membrane stérile sur le verre frité; Filtrer 100 ml d'eau; Translater la membrane sur le milieu Slanetz **sans bulles d'air**.

Les germes contenus dans 100 ml vont se développer et donner des colonies de **couleur rouge pourpre à 37°C, pendant 48 heures**, après incubation.

Lecture: Les colonies suspectes sont repiquées sur milieu BEA, déterminer le nombre de streptocoques pour 100 ml.. On utilise cette méthode pour des eaux d'adduction naturelles ou traitées qu'elles soient d'origine ou de distribution, les particuliers.

On le fait en parallèle avec les coliformes, pour les eaux naturelles d'adduction, les particuliers, les eaux traitées sur demande.

Norme bactériologique: Adduction des particuliers **0/100 ml**.

Dénombrement de spores de bactéries anaérobies sulfito- réductrices

Ce sont des formes de résistance de micro-organismes, se développant en anaérobiose à **37°C en 24 ou 48 heures**, sur une gélose viande foie, donnant des colonies typiques noires avec un halot noir réduisant le sulfite de sodium.

Mode opératoire:

Dans un tube stérile, mettre 20 ml d'échantillon d'eau homogénéisée;

Mettre au bain Marie **10 mn à 80**. Refroidir sous l'eau de robinet; Le choc thermique effectué permet de faire éclater les spores de germes anaérobies, qui vont se développer.

Juste avant de couler dans le tube de 20 ml, sans créer de bulles d'air, ajouter à la gélose viande foie **1,5 ml de sulfite de sodium à 10 % et deux gouttes d'alun de Fer**.

Laisser solidifier avant d'incuber **24 h à 48h à 37 °C**;

Lecture: considérées bactéries anaérobies sulfito-réductrices, toute colonie entourée de **halot noir**.

Norme : **1 spore/20 ml**. Plus d'une spore = eau non potable, pour les eaux d'adduction.

On utilise cette méthode pour les eaux d'adduction, origine et distribution traitée, les particuliers et deux dilutions supplémentaires pour les eaux de rivière. Elle est signe de contamination ancienne et **ne se détruit pas par le chlore. Dénombrement des germes totaux par ml:**

Définition: Les micro-organismes revivifiables se développent en anaérobiose à **20°C**, après **72 heures** ou à **37 °C**, après **24 heures** sur des milieux sélectifs.

3 °CONCLUSION

Dénombrement de coliformes totaux : Hôtes habituels du sol et des eaux, les coliformes thermo-tolérants amenés par les matières fécales. Pour les mettre en évidence, on dispose de la technique de dénombrement sur membrane.

Dénombrement des streptocoques fécaux : Pour les mettre en évidence, on dispose de la technique de dénombrement sur membrane. Norme bactériologique: Adduction des particuliers **0/100 ml**.

Dénombrement de spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices: Norme : **1 spore/20 ml**. Plus d'une spore = eau non potable, pour les eaux d'adduction.