

Dénombrement sélectif des Entérocoques par filtration sur membrane et culture sur milieu de Slanetz et Bartley

Le milieu de Slanetz et Bartley a été spécialement formulé pour les dénombrements d'Entérocoques (marqueurs fécaux) dans l'eau et les boissons par la technique de filtration sur membrane puis culture.

La composition du milieu est la suivante :

Tryptone 20 g/L ; extrait de levures 5,0 g/L ; glucose 2 g/L ; phosphate dipotassique 4,0 g/L ; sodium azoture (azide) 0,4 g/L ; 2-3-5-triphényltétrazolium chlorure (TTC) 1 mg/L ; agar pour bactériologie 10,0 g/L ; pH 7,2 ± 0,2.

Le TTC présente la particularité d'être réduit par les Entérocoques en un formazan rouge qui précipite ce qui facilite la lecture du milieu. Pour mémoire, *Proteus*, *Pseudomonas*... réduisent aussi le TTC ... mais le milieu de Slanetz et Bartley est sélectif par l'azide !

L'objectif du travail est d'illustrer la capacité du milieu de Slanetz et Bartley à sélectionner les Entérocoques et donc sa « pertinence » pour leur dénombrement.

Quatre « eaux tests » sont fabriquées :

	eau test 1	eau test 2	eau test 3	eau test 4
Bouillon de culture de 18 h de <i>Enterococcus faecalis</i>		10 µL		
		A introduire dans 1 litre d'eau + NaCl 9 g/L, stérile. Homogénéiser. On obtient le flacon dit flacon « source enteroc »		
		Transférer stérilement 200 µL de « source enteroc » dans 1 nouveau litre d'eau + NaCl 9 g/L, stérile. On obtient ainsi l'eau test 2.	Transférer stérilement 1 mL de « source enteroc » dans 1 nouveau litre d'eau + NaCl 9 g/L, stérile. On obtient ainsi l'eau test 3.	
Bouillon de culture de 18 h de <i>Proteus vulgaris</i>	5 µL			5 µL
Bouillon de culture de 18 h de <i>Bacillus subtilis</i>	5 µL			5 µL
	A introduire dans 1 litre d'eau + NaCl 9 g/L, stérile. Homogénéiser. On obtient ainsi l'eau test 1.			A introduire dans 500 mL « d'eau test 2 » parfaitement homogénéisée. Homogénéiser. On obtient ainsi l'eau test 4.

Pour chaque eau test, pratiquer la numération des Entérocoques par la méthode de filtration sur membrane puis culture sur milieu de Slanetz et Bartley. En parallèle traiter à l'identique chaque eau test mais avec culture sur milieu TCS non sélectif. Filtrer des échantillons de 20 mL.

Compte-rendu :

Discuter l'emploi de l'azide comme agent sélectif.

Vaut-il mieux risquer des faux positifs ou négatifs ?

Présenter et analyser les résultats pratiques obtenus et conclure.

Bibliographie :

NF EN ISO 7899-2 (08-2000) *Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 2 : méthode par filtration sur membrane et aussi Norme NF T 90-416: octobre 1985. Recherche et dénombrement des streptocoques du groupe D. Méthode générale par filtration sur membrane. (Testing water. Detection and numeration of group D streptococci. General method by membrane filtration).*
 L.W. Slanetz, C.H. Bartley, *Numbers of enterococci in water, sewage, and faeces determined by the Membrane Filter Technique with an improved medium. J. Bacteriol. (1957), 74(5):591.*

Document annexe. Extraits de NF EN ISO 7899-2 (08-2000). Qualité de l'eau - Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux - Partie 2 : méthode par filtration sur membrane

Introduction

Dans la présente partie de l'ISO 7899 est décrite une méthode pour la recherche d'entérocoques intestinaux. *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* et *E. hirae* peuvent être détectés et dénombrés avec la méthode décrite dans la présente partie de l'ISO 7899. Par ailleurs, d'autres espèces d'*Enterococcus* et certaines espèces du genre *Streptococcus* (notamment *S. bovis* et *S. equinus*) peuvent occasionnellement être détectées. Ces espèces de *Streptococcus* ne survivent pas longtemps dans l'eau et ne sont probablement pas dénombrées quantitativement. Pour les besoins de l'analyse de l'eau, les entérocoques peuvent être considérés comme des indicateurs de pollution fécale. Il convient néanmoins de noter que certains entérocoques trouvés dans l'eau peuvent, à l'occasion, provenir d'autres habitats.

Remarque (texte en dehors de la norme) : Les entérocoques intestinaux sont des bactéries en forme de cocci ou ovoïdes à Gram positif, chimiorganotrophes fermentaires obligatoires cultivant en 24h sur milieux ordinaires, formant des chaînes, catalase-négatives et possédant le marqueur antigénique antigène D.

4 Principe

4.1 Filtration, incubation et dénombrement

Le dénombrement des entérocoques intestinaux est fondé sur la filtration d'un volume spécifié d'un échantillon d'eau à travers une membrane filtrante ayant une grandeur de pore (0,45 µm) suffisante pour retenir les bactéries. Le filtre est placé sur un milieu sélectif solide contenant de l'azoture de sodium (pour supprimer la croissance des bactéries Gram-négatives) et du chlorure de 2,3,5-triphényltétrazolium, un colorant incolore qui est réduit en formazan rouge par les entérocoques intestinaux.

Les colonies typiques sont bombées, avec une couleur rouge, marron ou rose, soit au centre soit sur l'ensemble de la colonie.

4.2 Confirmation

Dans le cas où des colonies typiques sont observées, une étape de confirmation est nécessaire, par transfert de la membrane, avec toutes les colonies, sur une gélose à la bile, à l'esculine et à l'azoture, préchauffée à 44 °C. Les entérocoques intestinaux hydrolysent l'esculine sur ce milieu en 2 h. Le produit de la réaction, la 6,7-dihydroxycoumarine, se combine aux ions ferriques pour donner un composé brun à noir qui diffuse dans le milieu.

Mode opératoire

Filtrer un volume d'eau approprié au type d'eau examinée.

Placer la membrane filtrante sur le milieu de Slanetz et Bartley (6.3.1).

Faire incuber les boîtes à 36 °C ± 2 °C pendant 44 h ± 4 h.

8.3 Confirmation et dénombrement

Après incubation, considérer comme typiques toutes les colonies bombées montrant une couleur rouge, marron ou rose, soit au centre soit sur l'ensemble de la colonie.

S'il y a des colonies typiques, transférer la membrane et les colonies, au moyen de pinces stériles, sans retournement, sur une boîte de gélose bile-esculine-azoture qui a été préchauffée à 44 °C.

Faire incuber à 44 °C ± 0,5 °C pendant 2 h.

Lire la boîte sans délai.

Considérer toutes les colonies typiques montrant une couleur brune à noire dans le milieu environnant comme donnant une réaction positive, et les compter comme entérocoques intestinaux.

NOTE Une distribution inégale des colonies ou la présence de nombreux germes banaux peuvent interférer avec la différenciation des colonies positives, par suite de la diffusion de la couleur aux colonies adjacentes.

10 Expression des résultats

Calculer les résultats conformément l'ISO 8199.

Annexe issue de Norme NF T 90-416: octobre 1985**Limites de confiance à 95% attachées au nombre de colonies dénombrées par boîte**

nombre de colonies par boîtes	limites de confiance à 95%		nombre de colonies par boîtes	limites de confiance à 95%		nombre de colonies par boîtes	limites de confiance à 95%	
	inférieure	supérieure		inférieure	supérieure		inférieure	supérieure
1	.	4	13	5	21	45	31	60
2	.	6	14	6	23	50	36	65
3	.	8	15	7	24	55	40	71
4	0	9	16	8	25	60	44	77
5	0	11	17	8	27	65	49	82
6	1	12	18	9	28	70	53	88
7	1	14	19	10	29	75	58	93
8	2	15	20	11	30	80	62	99
9	3	16	25	15	36	85	66	105
10	3	18	30	19	42	90	71	110
11	4	19	35	23	48	95	75	116
12	5	20	40	27	54	100	80	121