



Laboratoire
Départemental
de l'Eau



Forum C : Intérêts et limites des nouvelles méthodes d'analyses bactériologiques à réponse rapide



Laboratoire
Départemental
de l'Eau



Présentation de la méthode normalisée en application de la réglementation

Didier FONTAN
Ingénieur microbiologiste
LDE31

25/06/2009

2



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

PLAN :

1. Réglementation
2. Méthode
3. Interprétation des résultats



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

1. Réglementation

Arrêté du 23 septembre 2008

relatif aux règles de traitement des échantillons
et aux méthodes de référence pour les analyses
d'eau dans le cadre de la surveillance de la
qualité des eaux de baignade.



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

1. Réglementation

ARTICLE 3

Les analyses de la qualité des eaux de baignade, mentionnées à l'article [D. 1332-24](#) du code de la santé publique, portent sur les paramètres **Entérocoques intestinaux** et **Escherichia coli** et sont réalisées selon les méthodes de référence fixées conformément aux prescriptions, respectivement, de la **norme NF EN 7899-1** et de la **norme NF EN 9308-3**.



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

1. Réglementation

SUITE ARTICLE 3

L'utilisation d'autres méthodes d'analyses que celles mentionnées au présent article peut être autorisée par le ministre chargé de la santé après avis d'un organisme de certification indépendant **si ces méthodes fournissent des résultats équivalents** au sens de la norme ISO 17994 : 2004 (E) Qualité de l'eau — Critères permettant d'établir l'équivalence de méthodes microbiologiques.



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

2. Méthode

TECHNIQUES ANALYTIQUES

- ❑ Afnor NF EN ISO 9308-3 (Escherichia coli)
- ❑ Afnor NF EN ISO 7899-1 (entérocoques intestinaux)



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

2. Méthode

PRINCIPE

- ❖ Dilution et ensemencement d'une série de puits d'une microplaque contenant le milieu de culture déshydraté.
- ❖ Incubation 36 h minimum et 72 h maximum à $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- ❖ Examen des microplaques sous rayonnement ultraviolet à 366nm.
- ❖ La fluorescence d'un puits indique la présence d'un *Escherichia coli* (ou d'un entérocoque).
- ❖ Les résultats sont donnés en Nombre le Plus Probable (NPP) par 100ml.



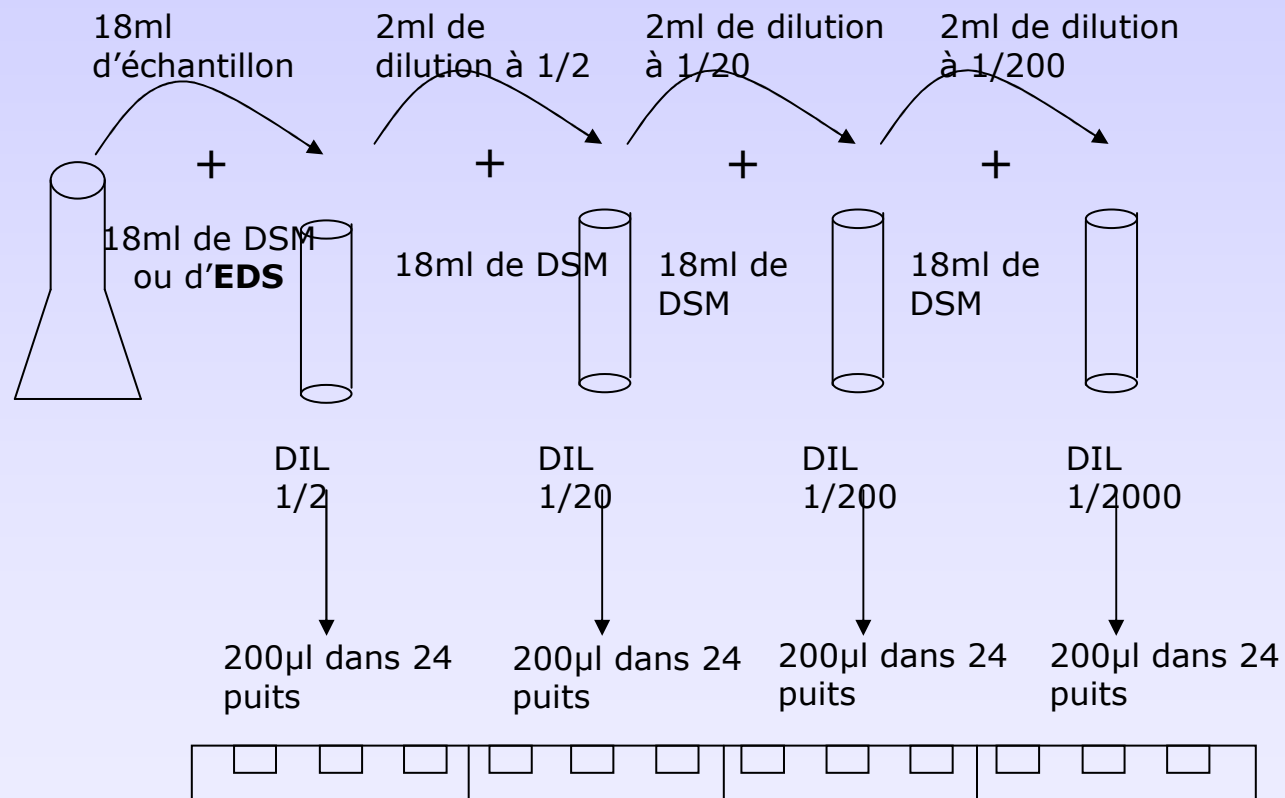
Laboratoire
Départemental
de l'Eau

2. Méthode

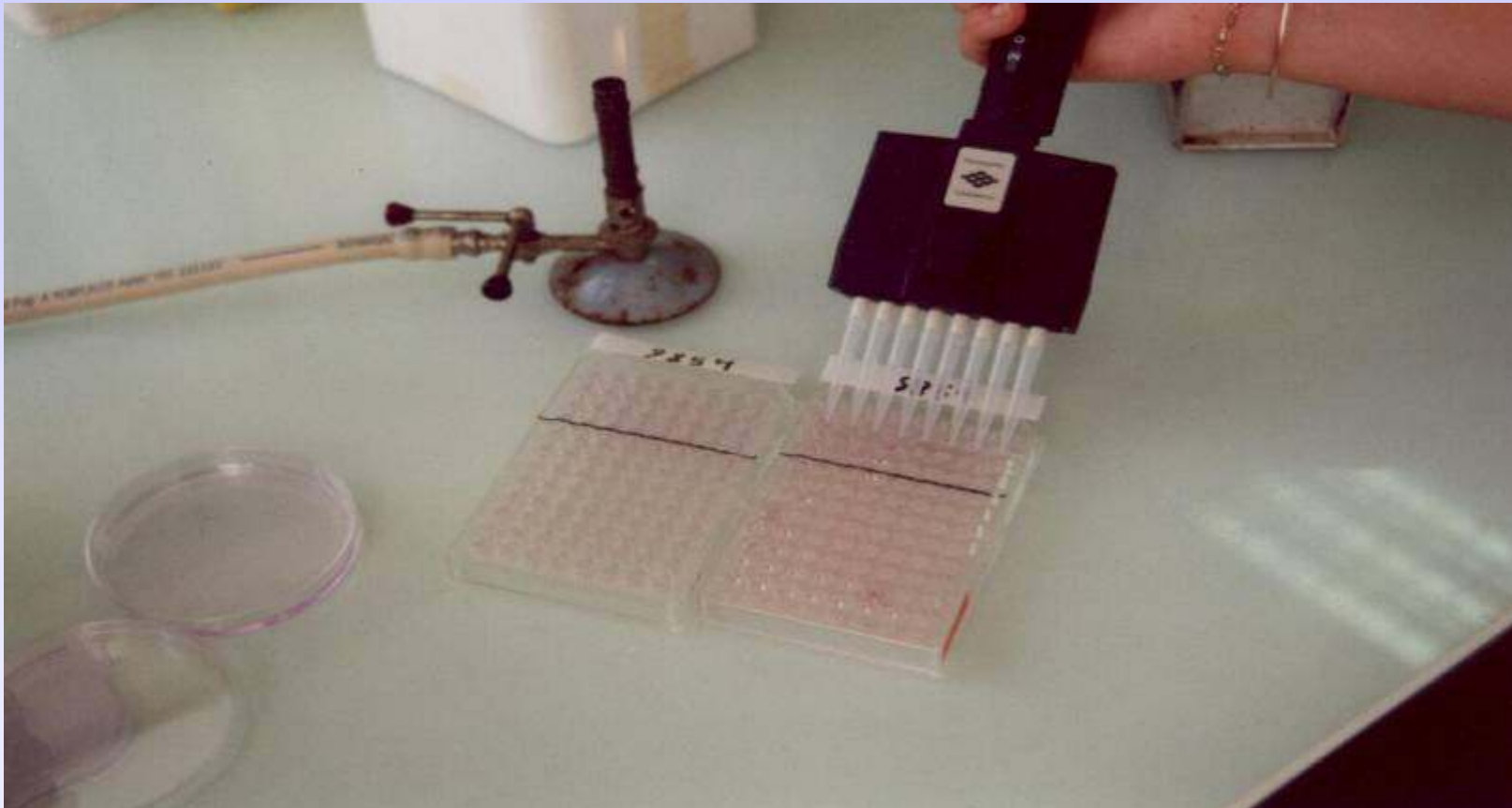
CHOIX DES DILUTIONS

Origine de l'échantillon	Nombre de dilutions	Nombre de puits par dilution
Eaux de baignade	2	64 puits au 1 / 2 32 puits au 1 / 20
Eaux douces superficielles	4	24 puits au 1 / 2 24 puits au 1 / 20 24 puits au 1 / 200 24 puits au 1 / 2000
Eaux résiduaires et stations d'épuration	6	16 puits au 1 / 2 16 puits au 1 / 20 16 puits au 1 / 200 16 puits au 1 / 2000 16 puits au 1 / 20000 16 puits au 1 / 200000

2. Méthode



2. Méthode





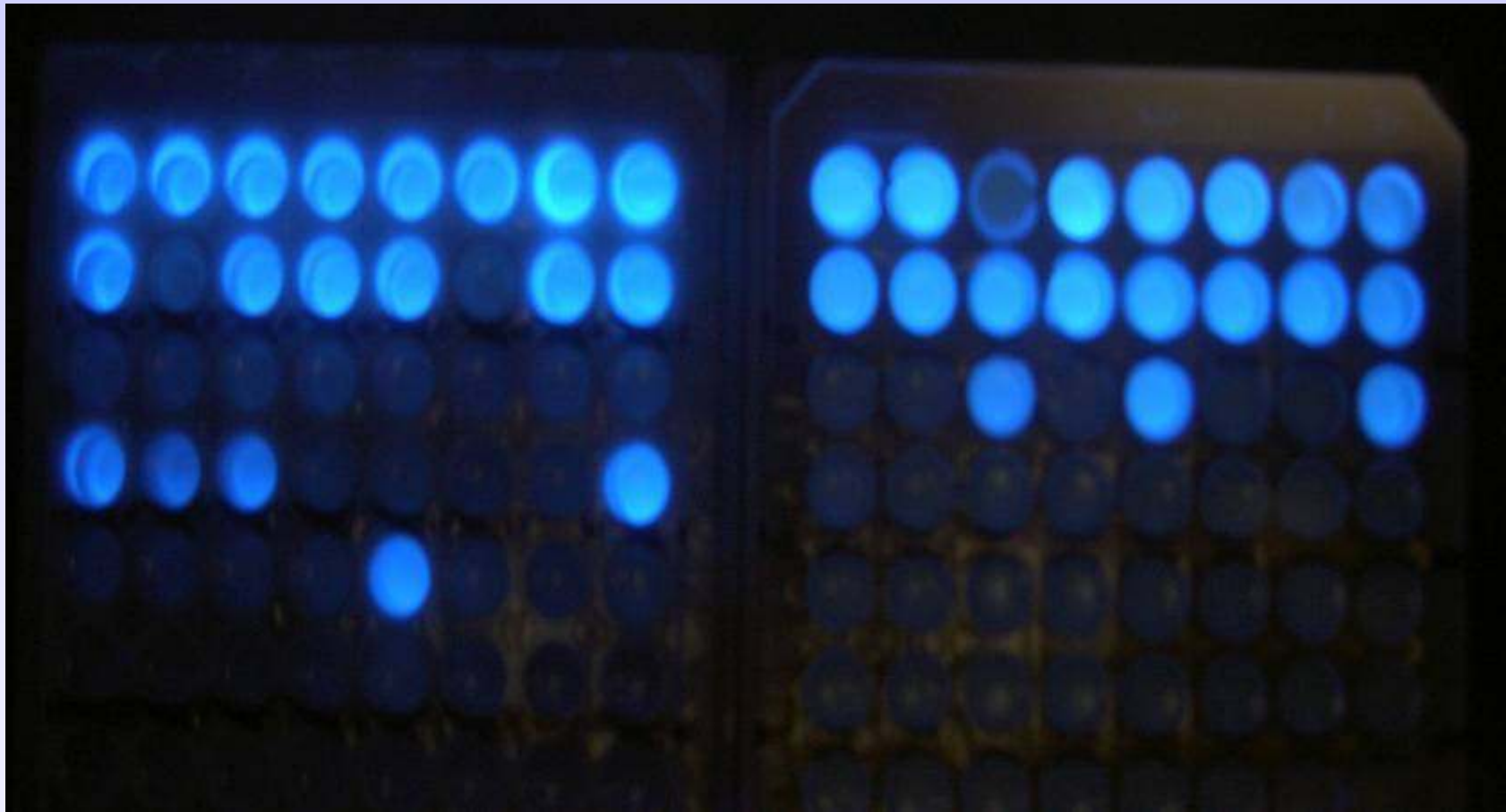
Laboratoire
Départemental
de l'Eau

2. Méthode

INCUBATION

- ❖ 36 h minimum – 72 h maximum à $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$
- ❖ LECTURE : chambre d'observation UV (lampe de Wood) 366 nm (automatique ou manuelle)
- ❖ La présence d'*Escherichia coli* est indiquée par une fluorescence bleue résultant de l'hydrolyse du MUG (4 – méthyllumbelliféryl- β - D-glucuronide).
- ❖ La présence d'entérocoques est indiquée par une fluorescence bleue résultant de l'hydrolyse du MUD (4 – méthyllumbelliféryl- β - D-glucoside).

2. Méthode





Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

Décret n°2008-990 du 18 septembre 2008 relatif à la gestion de la qualité des eaux de baignade et de piscines

Section 3 « baignades aménagées » Art.2

Jusqu'au 31 décembre 2012, les normes microbiologiques auxquelles doivent répondre les eaux de baignades aménagées sont fixées par l'annexe de ce décret (tableau 1).



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

	PARAMÈTRES	GUIDE (G)	IMPÉRATIVE (I)	FRÉQUENCE D'ÉCHANTILLONNAGE minimale
Microbiologiques	Coliformes totaux (/100 ml).	500	10 000	Bimensuelle
	Escherichia coli (/100 ml).	100	2 000	Bimensuelle
	Entérocoques (/100 ml).	100		
	Salmonelles (/1 L).		0	
	Entérovirus PFU (/10 L).		0	



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

CONFORMITE DES EAUX

- Les résultats ne doivent pas être supérieur aux valeurs impératives
- Les baignades sont classées, pour l'année N, en fonction des résultats obtenus sur l'année N-1.

3. Interprétation des résultats

SEUIL DE DETECTION – 2 DILUTIONS

1 / 2	1 / 20
64 puits	32 puits
$64 \times 0.2 \text{ ml} = 12.8 \text{ ml}$	$32 \times 0.02 \text{ ml} = 0.64 \text{ ml}$
$12.8 / 2 = 6.4 \text{ ml}$	$0.64 / 2 = 0.32 \text{ ml}$

$$6.4 + 0.032 = 6.72 \text{ ml}$$

$$100 / 6.72 = 14.88$$

d'où un seuil de 15 / 100 ml

3. Interprétation des résultats

SEUIL DE DETECTION – 4 DILUTIONS

1 / 2	1 / 20	1 / 200	1 / 2000
24 puits	24 puits	24 puits	24 puits
24 x 0.2 ml = 4.8 ml	24 x 0.02 ml = 0.48 ml	24 x 0.002 ml = 0.048 ml	24 x 0.0002 ml = 0.0048 ml
4.8 / 2 = 2.4 ml	0.48 / 2 = 0.24 ml	0.048 / 2 = 0.024 ml	0.0048 / 2 = 0.0024 ml

$$2.4 + 0.24 + 0.024 + 0.0024 = 2.6664 \text{ ml}$$

$$100 / 2.6664 = 37.5$$

d'où un seuil de 38 / 100 ml

3. Interprétation des résultats

SEUIL DE DETECTION – 6 DILUTIONS

1 / 2	1 / 20	1 / 200	1 / 2000	1 / 20000	1 / 200000
16 puits	16 puits	16 puits	16 puits	16 puits	16 puits
16 x 0.2 ml = 3.2 ml	16 x 0.02 ml = 0.32 ml	16 x 0.002 ml = 0.032 ml	16 x 0.0002 ml = 0.0032 ml	16 x 0.00002 ml = 0.00032 ml	16 x 0.000002 ml = 0.000032 ml
3.2 / 2 = 1.6 ml	0.32 / 2 = 0.16 ml	0.032 / 2 = 0.016 ml	0.0032 / 2 = 0.0016 ml	0.00032 / 2 = 0.00016 ml	0.000032 / 2 = 0.000016 ml

$$1.6 + 0.16 + 0.016 + 0.0016 + 0.00016 + 0.000016 = 1.777776$$

$$100 / 1.777776 = 56.25$$

d'où un seuil de 56 / 100 ml



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

LIMITES INFÉRIEURES ET SUPÉRIEURES
2 DILUTIONS : de 15 à $3,5 \cdot 10^4$

1 / 2	1 / 20	NPP / 100 ml
1	0	15
64	31	$3,5 \cdot 10^4$



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

LIMITES INFÉRIEURES ET SUPÉRIEURES
4 DILUTIONS : de 40 à $3,2 \cdot 10^6$

1 / 2	1 / 20	1 / 200	1 / 2000	NPP / 100 ml
1	0	0	0	40
24	24	24	23	$3,2 \cdot 10^6$



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

LIMITES INFÉRIEURES ET SUPÉRIEURES
6 DILUTIONS : de 60 à $6,7 \cdot 10^8$

1 / 2	1 / 20	1 / 200	1 / 2000	1 / 20000	1 / 200000	NPP / 100 ml
1	0	0	0	0	0	60
16	16	16	16	16	15	$6,7 \cdot 10^8$



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

INTERVALLES DE CONFIANCE A 95 %

Escherichia coli : Valeur impérative : 2000 / 100 ml
Valeur guide : 100 / 100 ml
Entérocoques : Valeur guide : 100 / 100 ml

2 DILUTIONS :

1 / 2	1 / 20	NPP / 100 ml	Limite Inférieure	Limite Supérieure	ECART
54	9	2018	1511	2696	1185
5	2	108	52	230	178



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

INTERVALLES DE CONFIANCE A 95 %

Escherichia coli : Valeur impérative : 2000 / 100 ml
Valeur guide : 100 / 100 ml
Entérocoques : Valeur guide : 100 / 100 ml

4 DILUTIONS :

1 / 2	1 / 20	1 / 200	NPP / 100 ml	Limite Inférieure	Limite Supérieure	ECART
21	4	0	1970	1260	3080	1820
2	1	0	120	40	470	430



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

INTERVALLES DE CONFIANCE A 95 %

Escherichia coli : Valeur impérative : 2000 / 100 ml
Valeur guide : 100 / 100 ml
Entérocoques : Valeur guide : 100 / 100 ml

6 DILUTIONS :

1 / 2	1 / 20	1 / 200	NPP / 100 ml	Limite Inférieure	Limite Supérieure	ECART
14	2	1	2010	1170	3460	2290
2	0	0	120	30	480	450



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

3. Interprétation des résultats

- REPARTITION ALEATOIRE
- LECTURE (fluo douteuse)

2 DILUTIONS :

1 / 2	1 / 20	NPP / 100 ml	
54	9	2018	Non conforme
54	8	1972	Conforme



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

CONCLUSION :

- La réglementation pour l'analyse des eaux de baignades fixe les normes techniques à utiliser
- Les méthodes alternatives doivent fournir des résultats équivalents



Laboratoire
Départemental
de l'Eau

Merci de votre attention.