**

**COMBOURIEU Quitterie**

**CHEMIN Thomas**

**2AG1**

**TRAVAUX PRATIQUES**

**FICHE DE RESULTATS**

**MODULE MICRO ORGANISMES**

**ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DE L’EAU**

FICHE DE RESULTATS DE L’ANALYSE DE L’EAU

1. Dénombrement des microorganismes revivifiables (FMAR) par méthode d’incorporation en gélose

**I.1. FLORE AEROBIE MESOPHILE 22°C**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Gélose glucosée à l’extrait de levure** | **10-1** | **10-2** | **10-3** | **Moyenne** |
| Boite 1 | >300 | 280 | 32 | 3,095.104 UFC/mL |
| Boite 2 | >300 | 298 | 34 |
| Moyenne | / | 289 | 33 |
| **Résultat par ml** | / | 2,89.104 UFC/mL | 3,3.104 UFC/mL |

**I.2. FLORE AEROBIE MESOPHILE 36°C**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Gélose glucosée à l’extrait de levure** | **10-1** | **10-2** | **10-3** | **Moyenne** |
| Boite 1 | >300 | 210 | 26 | 2,36.104 UFC/mL |
| Boite 2 | >300 | 285 | 19 |
| Moyenne | / | 247,5 | 22,5 |
| **Résultat par ml** | / | 2,47.104 UFC/mL | 2,25.104 UFC/mL |

***CONCLUSION :***

Cette méthode permet de dénombrer toute bactérie aérobie, levure ou moisissure capable de former des colonies après dilution dans la masse dans une gélose à l’extrait de levure incubée dans les conditions suivantes :

* A 36°C pendant 24 heures, ce qui favorise plutôt les germes d’origine humaine ou animale
* A 22°C pendant 68 heures, ce qui favorise plutôt les flores saprophytes

Cependant, certains germes saprophytes comme *Bacillus*, certains *Pseudomonas* et *Microcoques* peuvent aussi se développer à 36°C.

La méthode FMAR est un indicateur de contamination microbienne. On ne connait pas les bactéries. On cherche si la contamination est d’origine animale ou saprophyte. On utilise donc un milieu non sélectif.

On constate que la majorité des microorganismes sont favorisés par la température de 36°C. Les quantités exactes trouvées sont rassemblées dans le tableau ci-dessus.

**On peut donc conclure que les microorganismes présents dans cette eau sont majoritairement d’origine animale ou humaine.**

1. Dénombrement des germes de contamination fécale coliformes par méthode NPP

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | **3 tubes DC 10 0** | **3 tubes SC 100** | **3 tubes SC 10-1** | **3 tubes SC 10-2** | **3 tubes SC 10-3** | **3 tubes SC 10-3** | **NC** | **NPP** |
| **Milieu BLBCP** Nombre de tubes positifs : virage, trouble + gaz | +++ | +++ | +++ | +++ | +-- | --- | 310 | 4,5 |
| **Confirmation sur BLBVB**  **trouble + gaz à 37°C** | +++ | +++ | +++ | +++ | +-- | --- | 310 | 4,5 |
| **Confirmation sur BLBVB**  **trouble + gaz à 44°C** | +++ | +++ | +++ | +-+ | +-- | --- | 210 | 1,5 |
| **Tryptophane à 44°C + indole** | +++ | +++ | +++ | -++ | --- | --- | 320 | 9,5 |
| **Coliformes totaux par 100 ml :** | **4,5.104 UFC/mL** | | **= NPP de BLBVB à 37°C/Td =** | | | | | | |
| **Coliformes thermotolérants par 100 ml :** | **1,5.104 UFC/mL** | | **= NPP de BLBVB à 44°C/Td =** | | | | | | |
| **E.coli présumé par 100 ml :** | **9,5.103 UFC/mL** | | **= NPP de Tryptophane à 44°C + indole/Td =** | | | | | | |

***CONCLUSION :***

Cette méthode permet dans un premier temps de rechercher les coliformes totaux qui sont des Entérobactéries (bacilles asporulés gram -). Ces bactéries sont oxydase -, aérobies-anaérobies facultatives se développant sur un milieu bilié ou contenant des agents tensio-actifs et capables de fermenter le lactose avec production de gaz à 37°C en 48 heures. Dans un second temps, on recherche les coliformes thermotolérants qui ont les mêmes propriétés mais à 44°C en 48 heures. On les appelle aussi les coliformes fécaux. Dans un troisième temps, on recherche la présence d’*E. Coli* présumés qui sont des coliformes thermotolérants produisant de l’indole à 44°C à partir du tryptophane.

Les tubes positifs sont de couleur jaune, trouble et avec la présence de gaz due à la fermentation du lactose par les coliformes lactoses +. La couleur de la solution change suite à un changement de pH et à la présence d’un indicateur de pH. Ce milieu est plus spécifique que celui de la première expérience. A 37°C, on recherche donc la quantité de coliformes totaux. A 44°C, on recherche la quantité de coliforme thermotolérants car les coliformes fécaux sont thermotolérants. Pour détecter la présence d’*E. Coli* ont rajoute quelques gouttes de réactif de Kovaks qui réagit avec l’indole : si un halo mauve apparait alors le test est positif, sinon il est négatif. La recherche est de plus en plus spécifique.

**D’après les résultats des tests réalisés, on trouve qu’environ 20% des coliformes totaux sont des *E. Coli* présumés et environ 30% des coliformes totaux sont des coliformes thermotolérants**. Les quantités exactes trouvées sont rassemblées dans le tableau ci-dessus.

1. Dénombrement des germes de contamination fécale coliformes par filtration sur membrane

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Milieu au TTC et tergitol 7**  **Filtration sur membrane** | **100 ml 10 0** | **100 ml 10-1** | **100 ml 10-2** |
| Colonies jaunes -orangées avec halo jaune | Non réalisé | 380 | 65 |
| Repiquage sur gélose TSA et test oxydase | Non réalisé |  | 5 négatifs sur 5 repiqués |
| Repiquage sur bouillon Tryptophane et test indole | Non réalisé | Non réalisé | Non réalisé |
| **Coliformes thermotolérants oxydase - /100 ml** | 6,5.103 UFC/100mL | | |
| **E. COLI / 100 ml** | Non réalisé | | |

***CONCLUSION :***

Cette méthode est efficace lorsque les bactéries sont présentes à une concentration très faible dans l’eau. On peut arrêter sur le filtre toutes les bactéries contenues dans un volume d’eau important. Les pores du filtre doivent être de dimensions inférieures à celles des bactéries. Après avoir récoltées ces bactéries, on peut les analyser en plaçant la membrane filtrante sur un milieu sélectif ou non. On compte tout d’abord le nombre de colonies jaunes-orangées car elles représentent les coliformes lactoses + qui entrainent un virage coloré dû au changement de pH. On réalise ensuite un test oxydase car les coliformes sont oxydases -. On peut donc calculer la concentration initiale de coliformes par la quantité de bactéries oxydases -. Ce test est simple, rapide et spécifique.

**On trouve donc une quantité de 6,5.103 UFC de coliformes thermotolérants oxydases – dans 100mL d’eau. L’eau contient donc bien des coliformes.**

1. Dénombrement d’*E. Coli* par technique sur microplaques

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **MICROPLAQUE**  **Substrat MUG** | **24 puits 1/2** | **24 puits 1/20** | **24 puits 1/200** | **24 puits 1/2000** | |
| Nb. de puits + fluorescence bleue | 24 | 18 | 4 | 0 | |
| NC | 1840 | | | |
| NPP | 14,33 | | | |
| **E. COLI / 100 ml** | **2,9176.104 UFC/100mL** | | | |

***CONCLUSION :***

Il y a 96 puits sur une microplaque qui contiennent chacun un milieu déshydraté permettant de mettre en évidence une enzyme (bétaglucuronidase) spécifique d’*E. Coli*. Le produit d’hydrolyse du milieu est fluorescent sous UV. On peut donc se servir d’une table statistique fournissant le NPP après avoir dénombré le nombre de puits fluorescents après incubation. Cette méthode est très efficace. Les erreurs de manipulations sont minimes. Ce test est très spécifique mais lent.

**Ce test confirme donc la présence d’*E. Coli* dans l’eau analysée.** Les résultats exacts sont rassemblés dans le tableau ci-dessus.

1. Détection et dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Dilution** | **100** | **10-1** | **10-2** | **10-4** | **Moyenne bactériophages/50mL** |
| Nombre de plage | 4 | 0 | 0 | 0 | 400 UFC/50mL |
| Bactériophages/50 mL | 400 | 0 | 0 | 0 |

***CONCLUSION :***

Cette méthode est une technique quantitative permettant de connaitre la concentration en phage dans un échantillon. Après incubation, des plages de lyse claires apparaissent sur les boites de Pétri. On considère qu’une plage de lyse correspond à une bactérie lysée par un phage. On peut donc remonter au nombre de phages dans l’échantillon. Si on observe la présence de phages fécaux, cela signifie qu’il y a une infection par des bactéries fécales.

**On observe donc la présence de phages dans l’eau analysée, ce qui confirme que l’on est en présence de bactéries fécales.** Les résultats exacts observés sont rassemblés dans le tableau ci-dessus.

1. Conclusion sur la qualité de l’eau

Ces conclusions ont été réalisées à partir des normes du décret du 3 janvier 1989 modifié par le décret du 5 avril 1995.

1. **Comparaison avec les normes des eaux de baignade**

Dans le cas des eaux de baignade, les valeurs en flore aérobie mésophile (37°C), en coliformes totaux, en coliformes fécaux et en streptocoques fécaux de l’eau du Rhône analysée sont largement supérieures aux normes.

On peut donc conclure que l’eau du Rhône ne peut pas être considérée comme une eau de baignade.

1. **Comparaison avec les normes des eaux destinées à la consommation humaine**

Dans le cas des eaux destinées à la consommation humaine, il ne faut pas de présence de bactériophages fécaux dans 50mL d’eau et l’absence totale de coliformes totaux, de coliformes thermotolérants et de streptocoques fécaux. Or dans le cas de l’eau du Rhône analysée, on trouve 400 UFC de bactériophages fécaux dans 50mL d’eau et on a prouvé la forte présence de coliformes.

On peut donc conclure que l’eau du Rhône ne peut pas être considérée comme une eau destinée à la consommation humaine.

1. **Comparaison avec les normes des eaux conditionnées**

Dans le cas des eaux conditionnées, l’absence de bactériophages fécaux, de coliformes thermotolérants, de streptocoques fécaux, de coliformes totaux est indispensable. De plus, les quantités de flore aérobie mésophile revivifiable à 37°C et à 22°C doivent être minimes. Tous ces paramètres ne sont pas rassemblés par l’eau du Rhône analysée qui contient beaucoup trop de microorganismes.

On peut donc conclure que l’eau du Rhône ne peut pas être considérée comme une eau conditionnée.

1. **Comparaison avec les normes des eaux brutes**

D’après les résultats trouvés après l’analyse de l’eau du Rhône, on voit que ces résultats sont conformes aux normes.

On peut donc conclure que l’eau du Rhône peut être considérée comme une eau brute.

1. **Comparaison avec les normes des eaux brutes superficielles**

Les valeurs trouvées dans l’analyse de l’eau du Rhône ne correspondent pas aux valeurs attendues pour les eaux brutes superficielles A1 et A2, en effet, les taux de microorganismes dans l’eau du Rhône sont trop élevés. Cependant les valeurs trouvées pour l’eau du Rhône sont proches de celles d’une eau brute superficielle A3.

On peut donc conclure que l’eau du Rhône analysée peut être considérée comme une eau brute de type A3.

1. **Comparaison avec les normes des eaux minérales naturelles à l’émergence**

Dans le cas des eaux minérales naturelles à l’émergence, les différents taux des différents coliformes et microorganismes doivent être nuls.

On peut donc conclure que l’eau du Rhône analysée ne peut pas être considérée comme une eau minérale naturelle à l’émergence.

1. **Comparaison avec les normes des eaux industrielles**

D’après la quantité de flore évaluée avec l’analyse de l’eau du Rhône, on sait que la flore totale regroupe entre 10 000 et 100 000 bactéries/mL.

On peut donc conclure que l’eau du Rhône peut être considérée comme une eau industrielle impure.