

COMPASS[®] cc AGAR

DENOMBREMENT DES *E. COLI* ET DES COLIFORMES

1 DOMAINE D'UTILISATION

COMPASS[®] cc Agar permet d'effectuer le dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux par la méthode de filtration sur membrane dès 21 heures d'incubation et sans étape supplémentaire de confirmation par les tests de recherche de l'oxydase ou de révélation de la production d'indole à partir du tryptophane.



BKR 23/08-06/12
METHODES D'ANALYSE DE L'EAU

<http://nf-validation.afnor.org/>

COMPASS[®] cc Agar est adapté aussi bien au contrôle des eaux désinfectées et des autres eaux potables ne comprenant qu'un faible nombre de bactéries, qu'au contrôle des eaux chargées en flore interférente.

COMPASS[®] cc Agar est certifié NF VALIDATION pour le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux de consommation humaine en 24 ± 3 heures, par rapport à la méthode de référence NF EN ISO 9308-1 :2000. Se référer au certificat disponible sur le site NF VALIDATION pour la date de fin de validité de la méthode.

Dans le cadre de la marque NF Validation, se référer à la norme ISO 8199 :2018 pour la préparation des milieux et les dénombrements.

2 HISTORIQUE

La classification des coliformes est traditionnellement fondée sur leur capacité à fermenter le lactose avec production d'acide. Des souches lactose lent ou lactose-négatif sont recensées parmi toutes les espèces de coliformes. Les milieux traditionnels ignorent ces biotypes β -galactosidase-positifs mais perméase-négatifs. En 1989, Leclerc et Mossel ont donc proposé que la présence d'une β -galactosidase chez les coliformes soit utilisée comme critère de leur classification. L'utilisation d'un substrat synthétique chromogène, insensible aux variations dans la perméabilité au lactose, permet de mettre en évidence cette enzyme par une réaction colorée.

Buehler *et al.*, en 1949, furent les premiers à relever la présence d'une β -D-glucuronidase chez *Escherichia coli*. Depuis, des études ont montré que 94 à 97% des *Escherichia coli* possèdent une β -D-glucuronidase et qu'elle n'est que très rarement retrouvée chez d'autres espèces.

3 PRINCIPES

La présence simultanée de deux substrats chromogènes permet la détection des deux activités enzymatiques spécifiques : la β -galactosidase et la β -glucuronidase.

Les bactéries appartenant au groupe des coliformes se distinguent par la production d'une β -galactosidase (β -gal). Cette enzyme réagit avec le mélange chromogène pour former un précipité de couleur rose.

Toutes les souches d' *Escherichia coli* possèdent une β -galactosidase et 94 à 97% d'entre elles possèdent également une β -glucuronidase (GUD). La présence de cette enzyme est révélée par la présence d'un composé de couleur bleue. L'action simultanée des deux enzymes fait apparaître les colonies d' *Escherichia coli* en bleu violet.

Du fait du principe utilisé, la méthode met en évidence les bactéries lactose négatives mais β -galactosidase positives.

Microorganismes	Phénotype typique	Coloration des colonies
<i>Escherichia coli</i>	GUD ⁺ / β-gal ⁺	bleue violette
Coliformes non <i>Escherichia coli</i>	GUD ⁻ / β-gal ⁺	rose
Autres bactéries à Gram négatif	GUD ⁻ / β-gal ⁻	blanche

Le mélange spécial de peptones favorise l'excellente croissance des coliformes et le système sélectif permet d'inhiber les espèces potentiellement interférentes.

Le système tampon permet de se placer dans les conditions optimales des réactions enzymatiques.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu complet :

- Mélange spécial de peptones 18,40 g
- Activateurs de croissance 3,55 g
- Système tampon 5,80 g
- Mélange chromogénique 0,44 g
- Système inhibiteur 1,61 g
- Agar agar bactériologique 11,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 6,8 ± 0,2.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 40,8 g de milieu déshydraté (BK210) dans un litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en flacons à raison de 100 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Après refroidissement du milieu à 44-47 °C, ajouter 1 mL de supplément sélectif reconstitué avec 5 mL d'eau stérile (BS084).
- Couler en boîtes de Petri (Ø 55 mm).

- ✓ **Reconstitution :**
40,8 g/L
- ✓ **Stérilisation :**
15 min à 121°C
- ✓ **Ajout du supplément sélectif**

NOTE : Protéger impérativement les boîtes de la lumière.

6 MODE D'EMPLOI

- Filtrer stérilement sur membrane un volume déterminé de l'échantillon à tester.
- A la surface des boîtes déposer la membrane en veillant à ce que le contact soit parfait.
- Incuber à 36 ± 2 °C pendant 24 ± 3 heures.

- ✓ **Ensemencement :**
Filtration
- ✓ **Incubation :**
24 h à 36°C

7 LECTURE

Dénombrer les colonies caractéristiques

Les coliformes autres que *Escherichia coli* présentent des colonies roses.

Les colonies d'*Escherichia coli* sont bleues à violettes et peuvent parfois présenter un halo rose de diffusion.

NOTE : Les lectures peuvent se faire également au dos de la boîte. (Voir annexe 1 : Support photo)

8 CONTROLE QUALITE

Milieu préparé complet : gélose ambrée.

Réponse culturale de croissance après 24± 3h d'incubation à 36 ± 2 °C :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité)	Aspect des colonies
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00179	$P_R \geq 50 \%$	Bleu violet
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	$P_R \geq 50 \%$	Bleu violet
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	$P_R \geq 50 \%$	Rose
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00035	inhibée	-

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

Milieu complet pré-coulé en boîtes de Petri : 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Supplément sélectif : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu de base en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Supplément réhydraté (*) : 30 jours à 2-8 °C.

Milieu complet préparé en boîtes (*) : 30 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu complet précoulé COMPASS® cc Agar en boîtes de Petri (Ø 55 mm) :

Coffret de 20 boîtes BM15308

Milieu de base déshydraté COMPASS® cc Agar

Flacon de 500 g BK210HA

Supplément sélectif pour COMPASS® cc Agar (qsp 500 mL) :

Coffret de 10 flacons BS08408

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

MANAFI, M., KNEIFEL, W., and BASCOMB, S.. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiological Reviews*, **55** : 335-348.

NF EN ISO 9308-1 : 2000 (indice 90-414). « Qualité de l'eau : Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes – Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane ».

NF EN ISO 8199 : 2018. Qualité de l'eau - Exigences et lignes directrices générales pour les examens microbiologiques sur milieu de culture

12 AUTRES INFORMATIONS

COMPASS® est une marque de SOLABIA S.A.S..

Code document : COMPASS CC_V8(fr).

Date de création : 03-2010

Date de révision : 06-2024

Motif de la révision : Correction contrôle qualité.

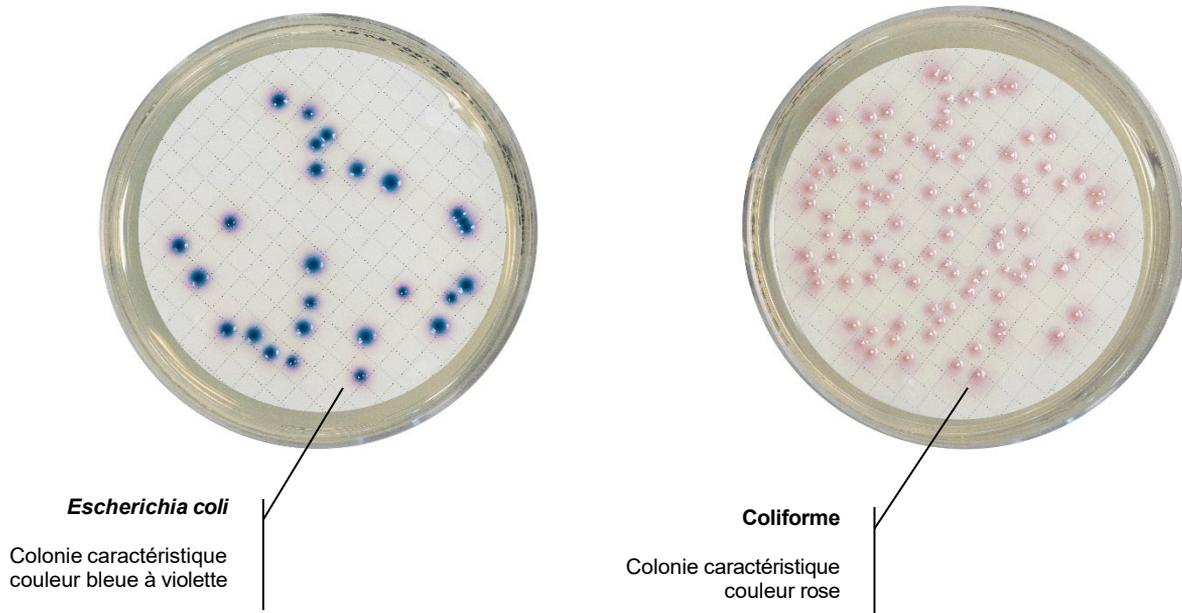
COMPASS® cc Agar

Méthode validée pour le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux de consommation humaine en 24 ± 3 heures.

Méthodologie :

- Filtrer stérilement sur membrane un volume déterminé de l'échantillon à tester.
- A la surface des boîtes déposer la membrane en veillant à ce que le contact soit parfait.
- Incuber à (36 ± 2)°C pendant (24 ± 3) heures.

Lecture et dénombrement :



Microorganismes	Phénotype typique	Coloration des colonies
<i>Escherichia coli</i>	GUD + / β-gal +	bleue violette
Coliformes non <i>Escherichia coli</i>	GUD - / β-gal +	rose
Autres bactéries à Gram négatif	GUD - / β-gal -	blanche

Le dénombrement des *E. coli* s'obtient en faisant la somme des **colonies bleues à violettes**.

Le dénombrement des coliformes totaux s'obtient en faisant la somme des **colonies roses** et des **colonies bleues à violettes**.

Code produit :

BM15308 : Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 55 mm) - Coffret de 20 boîtes