

---

# MICROPLAQUE MUG/EC

---

## DENOMBREMENT DES *ESCHERICHIA COLI* DANS LES EAUX

### 1 DOMAINE D'UTILISATION

---

La microplaque MUG/EC permet de pratiquer la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* dans les eaux, suivant la méthode NF EN ISO 9308-3.

L'emploi de microplaques, dont les puits contiennent un milieu spécifique adapté, a été développé pour une utilisation dans l'analyse de plusieurs types d'eaux, notamment les eaux de baignade en mer et en eau douce, les eaux de surface et les eaux résiduaires. La méthode est applicable à toutes les eaux, y compris celles qui sont riches en matières en suspension. Pour le dénombrement d'*Escherichia coli*, la technique en microplaques avec utilisation de MUG a été reconnue comme étant plus spécifique, plus précise, plus juste et plus rapide que les méthodes utilisées antérieurement. Elle représente une évolution importante par rapport aux techniques habituelles pour *Escherichia coli* qui, parmi les microorganismes indicateurs de contamination fécale, présente un intérêt tout particulier.

### 2 HISTORIQUE

---

Buehler *et al.*, en 1949, furent les premiers à relever la présence d'une  $\beta$ -D-glucuronidase chez *Escherichia coli*. Ultérieurement, Kilian et Bülow (en 1976) mirent en évidence que cette activité enzymatique caractérisait les seuls genres *Escherichia*, *Shigella* et *Salmonella*. En 1982, à partir de ces observations, Feng et Hartman ont développé des procédures pour la détection spécifique d'*Escherichia coli* dans les eaux et les produits alimentaires. Par la suite, Trepeta et Edberg ont incorporé du MUG dans un milieu de culture pour détecter la présence de  $\beta$ -glucuronidase. La plupart des études ont montré que 94 à 97% des *Escherichia coli* d'origine humaine ou de l'environnement possédaient cette activité. Cette enzyme a pu être également détectée chez les *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia*, mais sa présence ne concerne qu'un nombre réduit de souches dans chacune des espèces citées. La technique en microplaques ainsi que la méthode statistique d'exploitation des résultats ont été utilisées et validées par Hernandez en 1988, avec l'aide de 5 laboratoires partenaires, pour une étude comparative entre les méthodes habituellement pratiquées et la nouvelle méthode miniaturisée fluorogénique, sur les eaux de mer des côtes françaises. Le taux de recouvrement a été trouvé égal ou supérieur aux autres méthodes en tube ou par filtration sur membrane. La méthode a montré une plus grande spécificité que la méthode par filtration sur membrane. La  $\beta$ -D-glucuronidase peut donc être considérée comme un indicateur valable pour la détection d'*Escherichia coli* dans les eaux.

### 3 PRINCIPES

---

Chaque microplaque comporte 96 puits (12 rangées de 8 puits).

Le substrat de l'activité enzymatique bactérienne recherchée est constitué par du MUG (4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide). Ce dernier est incorporé dans un milieu de culture dérivé du milieu A1 mentionné dans l'American Public Health Association pour la détermination de la présence de coliformes fécaux dans les eaux. Le milieu de culture est déshydraté et fixé au fond des puits de la microplaque. La réhydratation du milieu se réalise lorsque l'eau à analyser est introduite dans les puits. *Escherichia coli* (éventuellement présent dans l'inoculum) hydrolyse le MUG en 4-méthylumbelliférone et en son glucuronide correspondant. La production de 4-méthylumbelliférone, composé à fluorescence bleue, peut être observée à l'aide d'une lampe UV proche du visible, à 366 nm. La lecture étant effectuée, le nombre de puits fluorescents est compté pour chaque dilution. A partir du nombre caractéristique obtenu, une analyse statistique fondée sur la loi de Poisson, permet de dénombrer *Escherichia coli* dans l'eau analysée. Il est important de noter que certains *Escherichia coli* ne possèdent pas de  $\beta$ -D-glucuronidase, en particulier le sérotype entérohémorragique O157:H7.

La composition du milieu, à teneur élevée en peptone et en salicine, permet une excellente récupération.

Le Triton X favorise la dispersion des microorganismes et du fluorogène dans les puits de la microplaque.

L'incubation à 44 °C a été étudiée afin d'inhiber la croissance de la majorité des microorganismes contaminants.

## 4 FORMULE-TYPE

Chaque puits de microplaque est rempli avec 100 µL de milieu dont la formule-type peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone .....	40,0 g
- Salicine.....	1,0 g
- Triton X 100.....	1,0 g
- MUG .....	0,1 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 6,9 ± 0,2.

## 5 MODE D'EMPLOI

Afin de procéder à l'analyse des échantillons provenant d'eaux chlorées, bromées ou ozonées, il est nécessaire d'ajouter stérilement du thiosulfate de sodium en excès dans le récipient collecteur, de façon à neutraliser les oxydants, pour obtenir une totale récupération des microorganismes à détecter.

### Préparation et choix des dilutions

- Homogénéiser parfaitement l'échantillon afin d'obtenir une répartition bien homogène des microorganismes.
- Pour les eaux de baignade, les autres eaux de surface et les eaux résiduaires (dont la salinité est inférieure à 30 g/kg), utiliser des tubes contenant 18 mL de sel marin synthétique avec ou sans bleu de bromophénol (BR003 ou BM088) et effectuer une première dilution au dixième de l'échantillon d'eau.
- Pour les eaux de mer dont la salinité est supérieure à 30 g/kg, utiliser de l'eau distillée stérile (BM115) pour la première dilution.
- Effectuer les dilutions successives suivantes à l'aide du sel marin synthétique. Le nombre de dilutions à ensemercer est fonction de la nature et du niveau de contamination de l'échantillon.
- Les dilutions et plages de mesures sont indiquées dans le tableau ci-après :

Nature de l'échantillon	Nombre de dilutions	Nombre de puits / dilution	Plages de mesures (microorganismes / 100 mL)
Eaux de baignade	2	64 puits au 1/2 32 puits au 1/20	1,5 x 10 <sup>1</sup> à 3,5 x 10 <sup>4</sup>
Autres eaux de surface	4	24 puits au 1/2 24 puits au 1/20 24 puits au 1/200 24 puits au 1/2000	4,0 x 10 <sup>1</sup> à 3,2 x 10 <sup>6</sup>
Eaux résiduaires et stations d'épuration	6	16 puits au 1/2 jusqu'à 16 puits au 1/200 000	6,0 x 10 <sup>1</sup> à 6,7 x 10 <sup>8</sup>

### Ensemencement

- Transférer la première dilution dans un récipient stérile approprié.
- A l'aide d'une pipette multicanaux munie de 8 embouts stériles, répartir 200 µL dans chacun des puits de la microplaque.
- Opérer de manière identique avec chacune des dilutions suivantes (1/20, 1/200, 1/2000, etc.) en utilisant un nouveau récipient et une nouvelle rangée de 8 cônes stériles.
- Le remplissage des puits doit être effectué soigneusement afin d'éviter les risques de contaminations croisées.
- Recouvrir chaque microplaque avec l'adhésif stérile fourni dans le coffret. Ce dispositif permet de limiter la déshydratation du milieu ensemené dans les puits et de protéger le système des contaminations extérieures pendant la période d'incubation.

✓ **Répartition :**  
200 µL par puits

✓ **Incubation:**  
36 à 72 h à 44 °C

### Incubation

- Incuber les microplaques à 44,0 ± 1,0 °C pendant 36 heures au minimum et jusqu'à un maximum de 72 heures.

## 6 LECTURE

Les puits présentant une fluorescence bleue sous UV à 366 nm sont considérés comme positifs. La lecture peut être effectuée au-delà de la période d'incubation minimale, puisque la fluorescence ne diminue pas au cours du temps. Le type de microplaque opaque BT001 a été spécialement développé pour la lecture visuelle et le comptage manuel.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

Déterminer le nombre caractéristique à partir du nombre de puits positifs pour chacune des dilutions choisies. Dans la mesure du possible, le nombre caractéristique doit se terminer par 0.

Se reporter aux annexes de la norme NF EN ISO 9308-3.

### NOTE :

Un fichier Excel peut être fourni sur demande pour la détermination du NPP et des intervalles de confiance.

## 7 CONTROLE QUALITE

Fluorescence après incubation pendant 48 heures à  $44 \pm 1$  °C :

Analyse	Résultat / Croissance
Bruit de fond : distribution DSM stérile	Absence de puits positifs. Bruit de fond moyen < 25 % du seuil de positivité
Niveau moyen de fluorescence avec <i>Escherichia coli</i> WDCM 00179	Fluorescence supérieure au double du seuil de positivité (variation < 10 %)
Fertilité, Microorganismes	Croissance / Taux de récupération
<i>Escherichia coli</i> WDCM 00179	66 à 150 % la valeur cible

## 8 CONSERVATION

**Microplaques : 2-8 °C.**

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

## 9 PRESENTATION

**Microplaques blanches, opaques :**

Carton de 25 microplaques + 25 adhésifs transparents stériles ..... BT00108

## 10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Buehler, H.J., Katzman, P.A., and Doisey, E.A.. 1949. Bacterial glucuronidase. Federation Proceedings, **8** : 189.

Cochran, W.G.. 1950. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". Biometrics, **6** : 105-116.

de Man, J.C.. 1975. The probability of most probable numbers. European Journal of Applied Microbiology, **1** : 76-78.

Kilian, M., and Bülow, P.. 1976. Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica Section B, **84** : 245-251.

Feng, P.C.S., and Hartman, P.A.. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. Applied Environmental Microbiology, **43** :1320-1329.

Hurlley, M.A., and Roscoe, M.E.. 1983. Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. Journal of Applied Bacteriology, **55** : 159-164.

Trepeta, R.W., and Edberg, S.C.. 1984. Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, **19** : 172-174.

Hernandez, J.F., Guibert, J.M., Delattre, J.M., Oger, C., Charrière, C., Hugues, B., Serceau, R., and Sinigre, F.. 1991. Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *E.coli* and enterococci in marine water. *Water Science and Technology*, **24** : 137-141.

NF EN ISO 9308-3. Mars 1999. Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux de surface et résiduaires. Partie 3 : Méthode miniaturisée (nombre le plus probable) pour ensemencement en milieu liquide.

## 11 AUTRES INFORMATIONS

---

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : MICROPLAQUES MUG EC\_FR\_V8.

Date création : 02-2005

Date de révision : 12-2019

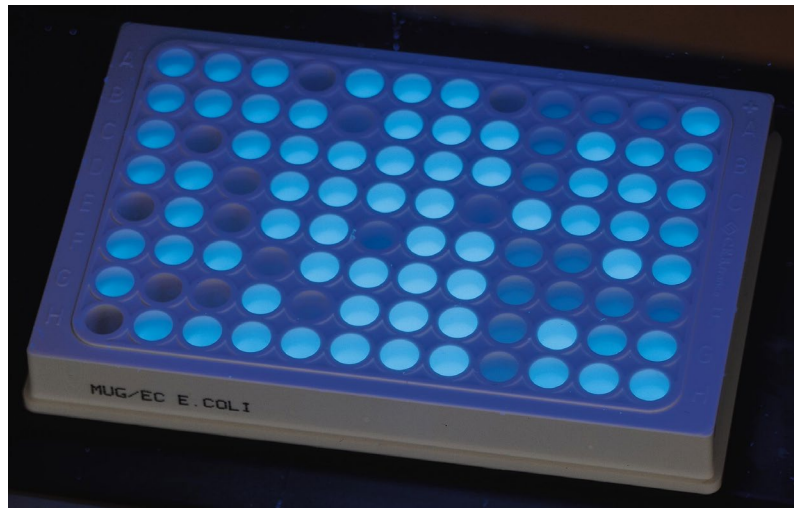
Motif de révision : Rectification norme.

### Microplaque MUG/EC

Détection et dénombrement d'*Escherichia coli* dans les eaux, suivant la méthode NF EN ISO 9308-3.

#### Lecture :

Croissance obtenue après 36 heures d'incubation à 44 °C.



Caractéristiques : Les puits présentant une fluorescence bleue sous UV à 366 nm sont considérés comme positifs (présence des *Escherichia coli* dans l'eau).