


 <b>ACADÉMIE DE BORDEAUX</b>	<b>ACTIVITES TECHNOLOGIQUES AU LABORATOIRE DE BIOTECHNOLOGIES STL Biotechnologies</b> 	 <b>ACADÉMIE DE POITIERS</b>
<b>Recherche et dénombrement d'<i>Escherichia coli</i> dans les eaux de baignade selon la norme ISO 9308-3</b>		

### **CONTEXTE :**

La France accueille les Jeux Olympiques et Paralympiques (JOP) d'été 2024. Paris a fait le choix d'organiser certaines épreuves de natation en eau libre dans la Seine, capitale avec environ 2 millions d'habitants. Pour assurer la sécurité sanitaire des nageurs, la qualité microbiologique de l'eau doit satisfaire la réglementation relative à la qualité microbiologique des eaux de baignade, dont un extrait concernant *E. coli* est fourni ci-dessous :

Paramètre	Excellente qualité	Bonne qualité	Qualité suffisante	Méthode de référence pour l'analyse
Escherichia coli (UFC/100 mL)	500*	1000*	900**	ISO 9308-3

\* Évaluation au 95<sup>e</sup> percentile : 95% des analyses inférieures

\*\* Evaluation au 90<sup>e</sup> percentile : 90% des analyses inférieures

Source : [https://baignades.sante.gouv.fr/baignades/editorial/fr/contrôle/methode\\_calcul.html](https://baignades.sante.gouv.fr/baignades/editorial/fr/contrôle/methode_calcul.html)

Pour atteindre une qualité sanitaire compatible avec les épreuves des JOP, des aménagements et infrastructures ont été mis en place (voir le dossier documentaire).

Des analyses de l'eau prélevées sur les sites olympiques sont effectuées conformément à la norme ISO9308-3.

Pourrions-nous, dans nos villes respectives des académies de Bordeaux et Poitiers, accueillir ces épreuves de natation en eau libre ? Les eaux de baignade de nos fleuves, rivières et cours d'eau (Garonne, Sèvre niortaise, Clain, Charente...) respectent-elles les critères de qualité microbiologique ?

L'activité technologique propose de tester un seul de ces critères de qualité des eaux de baignades : recherche et dénombrement d'*E. coli*. En parallèle, un contrôle qualité du réactif utilisé sera réalisé avec une souche de *E. coli* référencée.

### **COMPETENCES CIBLEES PAR CETTE ACTIVITE TECHNOLOGIQUE**

#### **En classe de première sur la thématique de l'environnement**

#### **Travailler ensemble au laboratoire de biotechnologies**

A- S'initier à la recherche expérimentale et à la démarche de projet en biotechnologies

Mise en œuvre d'un projet au laboratoire de biotechnologies

- Mettre en œuvre une procédure expérimentale.
- Exploiter les résultats.
- Rendre compte par un travail écrit ou oral
- Valorisation du travail au sein du lycée.

B – Prévenir les risques au laboratoire de biotechnologies

- Lexique associé à la prévention des risques : mettre en relation les mesures de prévention proposées et l'analyse des risques
- Démarche d'analyse des risques : distinguer le risque pour le manipulateur et le risque pour le produit

#### **Acquérir les fondamentaux technologiques et scientifiques des biotechnologies**

2 – Cultiver des micro-organismes

- Travail en milieu aseptique au laboratoire de microbiologie
  - o Organiser le poste de travail.
  - o Manipuler en conditions d'asepsie avec des milieux stériles.
- Conditions nutritionnelles et milieux de culture
  - o Ensemencer un milieu de culture liquide
  - o Définir température et durée d'incubation.

#### 4 – Réaliser un dénombrement de micro-organismes présents dans un produit biologique

Pour faire le parallèle entre milieu solide au programme et milieu liquide

- Préparer une suspension à partir d'un produit ou d'un échantillon
- Déterminer par le calcul les dilutions à réaliser
- Ensemencer un volume exact de l'échantillon préparé
- Exploiter un résultat de dénombrement après culture (en milieu solide)

Détection d'une enzyme par son activité biologique

- Identifier le(s) substrat(s) spécifique(s) de l'enzyme recherchée.

**En classe de terminale :**

#### **Partie T : développer les fondamentaux Technologiques expérimentaux des biotechnologies**

- T2 – Cultiver des micro-organismes, suivre ou limiter leur croissance
  - o T2.1 Analyse d'un produit polymicrobien – culture sélective du micro-organisme recherché : Identifier les étapes d'une procédure de recherche de micro-organisme d'intérêt à partir d'un produit polymicrobien.
- T3 – Caractériser pour identifier des micro-organismes
  - o T3.2 Exploration du métabolisme microbien utile à l'identification : Faire le lien entre l'utilisation de macromolécules comme substrats et la présence d'une enzyme microbienne
- T4 – Réaliser un dénombrement de micro-organismes présents dans un produit biologique
  - o T4.2 Réaliser un dénombrement après culture en milieu (solide) : Choisir une méthode de dénombrement en milieu (solide) adaptée au contexte, Choisir un milieu et des conditions de culture adaptés aux micro-organismes à dénombrer.

#### **Partie L : travailler ensemble au Laboratoire de biotechnologies**

- L1 – Pratiquer une démarche de projet pour répondre à un enjeu des biotechnologies
- L1.1 Enjeux des activités en biotechnologies : Expliquer le lien entre l'objectif des activités et le questionnement technologique dans le contexte d'un exemple donné.
- L3.6 Exprimer et critiquer le résultat de mesure : S'interroger sur la cohérence d'un résultat de mesure dans un contexte donné.

### **Recherche et dénombrement d'*Escherichia coli* dans les eaux de baignade en selon la norme ISO 9308-3**

La recherche et la numération d'*E. coli* est effectuée par la méthode miniaturisée du NPP, Nombre le Plus Probable. Le NPP est une estimation statistique de la densité des micro-organismes dans l'échantillon.

Cette méthode miniaturisée et normalisée selon les exigences de la norme ISO 9308-3 est spécifique, précise et rapide. Elle est adaptée aux eaux riches en matières en suspension et est non indiquée pour une eau dont la charge est inférieure à 15 UFC pour 100 mL pour laquelle une méthode de filtration sur membrane est préconisée.

Des dilutions au 1/2 et au 1/20 de l'échantillon d'eau de baignade à analyser sont ensemencées dans

- un milieu de culture sélectif, LST (Lauryl Sulfate Tryptose) dont un extrait de la fiche fournisseur est fourni dans le **document 1**,
- additionné de MUG, 4-méthylumbelliféryl-β-D-glucuronide, substrat chromogène dont un extrait de la fiche fournisseur est fourni dans le **document 2**.

Le milieu LST, dont un extrait de la fiche commerciale est fourni au **document 1**, est un milieu d'enrichissement sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux et les

produits alimentaires. Le laurylsulfate de sodium, détergent anionique, est l'agent permettant de sélectionner les coliformes. Dans ce milieu riche, les coliformes se développent rapidement.

Le MUG, substrat chromogène, est hydrolysé par la  $\beta$ -D-glucuronidase exprimée par *Escherichia coli* en méthyl-umbelliférone, produit fluorescent bleu visible sous rayonnement UV (366 nm).

### Procédure opératoire

#### 1- Ensemencement

Un volume identique (200  $\mu$ L) des deux dilutions testées de l'échantillon d'eau à analyser est ensemencée dans les 96 puits d'une microplaque contenant le milieu LST-MUG de la façon suivante :

- 64 puits pour la dilution  $\frac{1}{2}$
- 32 puits pour la dilution  $\frac{1}{20}$ .

#### 2- Conditions de culture

La microplaque est incubée à 44 °C au minimum 36 heures et au maximum 72heures. Ceci permet d'inhiber la croissance de la majorité des microorganismes contaminants et par conséquent de sélectionner les coliformes thermotolérants.



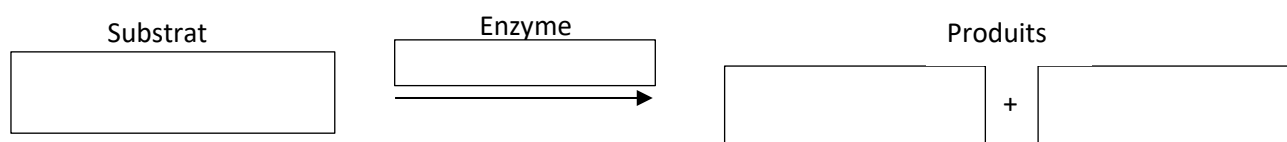
Source : sites fournisseurs idexx.fr et Biokar Diagnostics

#### 3- Résultats expérimentaux et exploitation

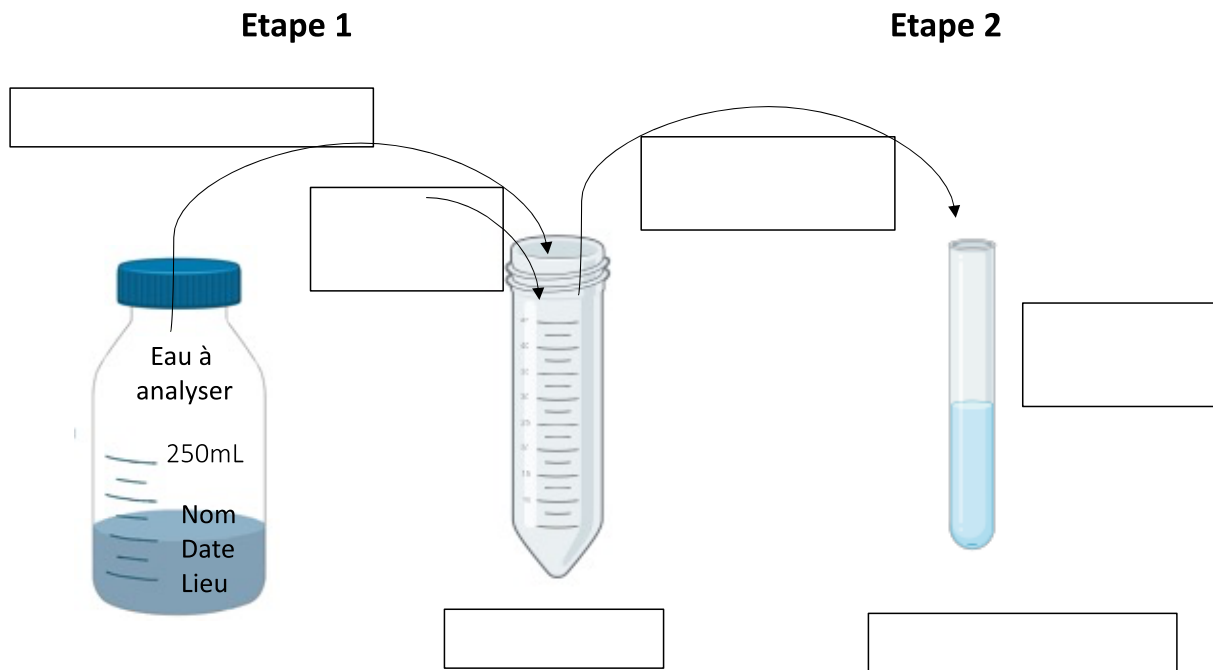
Après culture, le nombre de puits fluorescents est compté pour chaque dilution. Un abaque établi par une analyse statistique fondée sur la loi de Poisson permet, à partir de ces résultats expérimentaux de déterminer la concentration la plus probable, « NPP », en *Escherichia coli* dans l'eau analysée, exprimée en UFC/100 mL.

### 1. QUESTIONS PRELIMINAIRES

- Q1.** Identifier la condition d'incubation et argumenter qu'elle permet une étude exclusive d'*E. coli*.  
**Q2.** Compléter le document ci-dessous illustrant la réaction mise en œuvre au cours de cette recherche.



- Q3.** Ecrire les équations aux grandeurs, aux unités et aux valeurs numériques permettant de déterminer la valeur des 2 dilutions préparées en M1.  
**Q4.** Compléter l'organigramme de l'étape M1.



**Q5.** Calculer la concentration en MUG du milieu LST-MUG préparé en M2.

**Q6.** Préciser comment s'assurer de l'homogénéité de l'inoculum pour l'étape 1 puis pour l'étape 2.

**Q7.** Argumenter le fait, qu'après incubation toutes les cupules ne soient pas fluorescentes pour une même dilution comme montré dans la photo de la plaque.

## 2- REALISATION PRATIQUE

### Liste de matériels et réactifs pour une microplaque par binôme :

- Eau de baignade
- 1 microplaque 96 puits (+ 1 pour le groupe)
- 10 mL de milieu LST (Lauryl Sulfate Tryptose)
- 150  $\mu\text{L}$  de supplément MUG à  $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
- 1 Tube de 9 mL eau stérile
- 1 pipette stérile de 10 mL
- 1 pipette stérile de 1 mL
- 1 mL de suspension d'*E.coli* ajustée à  $10^3 \text{ bactéries} \cdot \text{mL}^{-1}$
- Barreau aimanté stérile + agitateur magnétique
- Matériel courant de laboratoire

La manipulation se déroule en condition d'asepsie.

### M1. Préparation des dilutions de l'eau de baignade au $\frac{1}{2}$ et au $\frac{1}{20}$ :

- Préparer les dilutions de l'eau de baignade selon la procédure établie en Q4 et Q6 en s'assurant d'obtenir une répartition homogène des micro-organismes

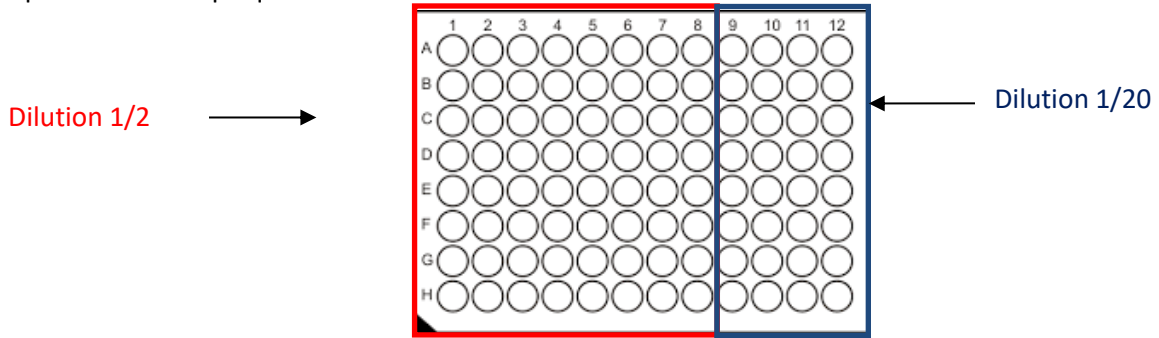
### M2. Préparation du milieu LST-MUG

- Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de supplément MUG à 10 mL de bouillon LST.

### M3. Préparation de la microplaque à 96 puits

- Annoter la microplaque selon le plan de dépôt donné : 64 puits (8x8) sont notés dilution  $\frac{1}{2}$  et 32 puits (8x4) sont notés dilution  $\frac{1}{20}$

Plan de dépôt sur la microplaque :



- Répartir 100 µL de milieu de culture LTS-MUG précédemment préparé dans les 96 puits de la microplaque.

**M4. Ensemencement de la microplaque avec les dilutions (en prenant soin de respecter les consignes vues en Q6) puis incubation**

- Introduire 200 µL d'eau de baignade diluée au  $\frac{1}{2}$  dans les puits des colonnes 1 à 8 la microplaque notés dilution  $\frac{1}{2}$ .
- Changer de cône
- Introduire 200 µL d'eau de baignade diluée au  $\frac{1}{20^{\text{ème}}}$  dans les puits des colonnes 9 à 12 de la microplaque notés dilution 1/20.
- Recouvrir d'une bande adhésive stérile puis incuber la microplaque à 44 °C pendant 36 à 72 h.

**M5. Réalisation d'un contrôle du milieu préparé**

- Réaliser la même procédure que l'eau de baignade (M1 à M4) à partir de la suspension calibrée d'*E. coli*

### 3- LECTURE ET EXPLOITATION DES RESULTATS

Q8. Réaliser la lecture des résultats du binôme et du contrôle.

- Observer la plaque sous lampe UV avec des lunettes de protection, prendre une photo de chaque plaque
- Compter le nombre de puits positifs (fluorescence bleue observée sous lampe UV) pour chaque dilution testée.

Q9. Présenter les résultats bruts sous forme de tableau

Suspension calibrée <i>E. coli</i>	Nombre de puits totaux testés	Nombre de puits positifs
Dilution 1/2	64	
Dilution 1/20	32	

Eau testée	Nombre de puits totaux testés	Nombre de puits positifs
Dilution 1/2	64	
Dilution 1/20	32	

Q10. Déterminer, à l'aide du tableur fourni « Détermination NPP dans une eau de baignade 9308-3 », les valeurs du NPP en UFC *E. coli*/100 mL pour la suspension calibrée et l'échantillon d'eau testée.

Lire les consignes d'utilisation du premier onglet.

Q11. Analyser les résultats obtenus pour le contrôle qualité du réactif « supplément MUG » avec la suspension calibrée d'*E. coli* et conclure.

Q12. Déduire le NPP en UFC *E. coli*/100 mL d'échantillon à l'aide du document 3.

Q13. Analyser les résultats obtenus pour l'échantillon d'eau testée et conclure.

### SYNTHESE

Q14. Renseigner le tableau de synthèse avec les caractéristiques du prélèvement, l'expérimentateur, les résultats des témoins et résultats de l'analyse.

Source : [extrait fiche technique LST site fournisseur Biokar Diagnostics](#)

## ENRICHISSEMENT SELECTIF DES *ESCHERICHIA COLI* ET AUTRES COLIFORMES

### 1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon laurylsulfate-Tryptose est un milieu d'enrichissement sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux et les produits alimentaires.

Le milieu a été formulé par Mallmann et Darby qui ont montré, en 1941, que parmi un grand nombre d'agents mouillants, le laurylsulfate de sodium s'avérait être le meilleur agent sélectif ne présentant pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des coliformes. Lévine a ensuite démontré que ce milieu réduisait le nombre de faux-positifs en inhibant les cultures de bactéries sporulées gazogènes.

La formule-type répond à la composition définie dans les normes NF T90-413 et NF ISO 7251.

### 2 PRINCIPES

Le laurylsulfate de sodium inhibe largement le développement de la flore secondaire contaminante.

En raison de son excellent pouvoir nutritif, ainsi que de la présence de tampons phosphates, le bouillon laurylsulfate-Tryptose permet aux coliformes de se développer rapidement et de produire un dégagement gazeux important par fermentation du lactose, même avec de faibles inoculums.

### 3 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu (simple concentration) :

- Tryptose .....	20,00 g
- Lactose .....	5,00 g
- Phosphate dipotassique .....	2,75 g
- Phosphate monopotassique .....	2,75 g
- Chlorure de sodium .....	5,00 g
- Laurylsulfate de sodium .....	0,10 g

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

Source : [extrait fiche technique MUG 50mg supplément site fournisseur Biokar diagnostics](#)

## SUPPLEMENT SELECTIF - MISE EN EVIDENCE DES *ESCHERICHIA COLI*

### 1 DOMAINE D'UTILISATION

Le supplément MUG 50 mg est destiné à être utilisé dans les milieux sélectifs pour les recherche et dénombrement des coliformes, afin de détecter simultanément *Escherichia coli* dans les prélèvements susceptibles d'en contenir : les eaux, les boissons, les produits laitiers et les autres produits alimentaires. Il peut être employé aussi bien dans les milieux liquides (bouillon laurylsulfate-Tryptose) que dans les milieux solides (gélose VRBL, gélose MacConkey, gélose VRBG).

### 2 HISTORIQUE

Feng et Hartman, en utilisant un milieu au MUG, montrèrent que l'activité  $\beta$ -glucuronidasique concernait 96% des *Escherichia coli*, 100% des *Escherichia coli* entérotoxigènes, 17% des salmonelles et 40% des shigelles, tandis que les autres germes testés se révélaient négatifs. Lorsque la production de gaz par *Escherichia coli* est inhibée par un trop grand nombre de *Proteus* présents dans les échantillons, la mise en évidence d'une fluorescence en permet la détection en moins de 15 heures.

### 3 PRINCIPES

Le supplément est un réactif lyophilisé constitué de 4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG). *Escherichia coli* possédant une  $\beta$ -D-glucuronidase 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 (366 nm).