Analyse des eaux résiduaires en vue de leur recyclage en agriculture

Manuel des techniques de laboratoire en parasitologie et bactériologie

Rachel M. Ayres & D. Duncan Mara
Department of Civil Engineering
University of Leeds
Leeds, Angleterre

Organisation mondiale de la Santé
Genève
1997

Catalogage à la source : Bibliothèque de l'OMS

Ayres, Rachel M.

Analyse des eaux résiduaires en vue de leur recyclage en agriculture : manuel des techniques de laboratoire en parasitologie et bactériologie/Rachel M. Ayres & D. Duncan Mara.

1. Méthode microbiologique – manuels de laboratoire
2. Evacuation eaux usées – analyse
3. Evacuation eaux usées – manuels de laboratoire
4. Agriculture I. Mara, D. Duncan II. Titre

ISBN 92 4 254484 1 (Classification NLM : QW 25)

L'Organisation mondiale de la Santé accueille favorablement les demandes d'autorisation visant à reproduire ou à traduire ses publications, en partie ou intégralement. Les demandes à cet effet et les demandes de renseignements doivent être adressées au Bureau des Publications, Organisation mondiale de la Santé, Genève, Suisse, qui se fera un plaisir de fournir les renseignements les plus récents sur tout changement apporté au texte, les nouvelles éditions envisagées et les réimpressions ainsi que les traductions déjà disponibles.

© Organisation mondiale de la Santé, 1996

Les publications de l'Organisation mondiale de la Santé bénéficient de la protection prévue par les dispositions du protocole N° 2 de la Convention universelle pour la protection du droit d'auteur. Tous droits réservés.

Les appellations employées dans cette publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part du secrétariat de l'Organisation mondiale de la Santé aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites.

La mention de firmes et de produits commerciaux n'implique pas que ces firmes et produits commerciaux sont agréés ou recommandés par l'Organisation mondiale de la Santé, de préférence à d'autres. Sauf erreur ou omission, une majuscule initiale indique qu'il s'agit d'un nom déposé.

Les opinions exprimées dans la présente publication n'engagent que leurs auteurs.

Photocomposition à l'Ile Maurice
Impression à Singapour
95/10791 – InfoPrint/SNP-3500

Table des matières

Remerciements v

1. Introduction 1

2. Parasitologie de l'assainissement 3

2.1 Méthode de Bailenger modifiée 3

Choix de la méthode et comparaison avec d'autres 3

Avantages et inconvénients 4

Equipement et produits consommables 5

Mode opératoire détaillé illustré 5

2.2 Techniques de laboratoire de base 10

Réglage du microscope 10

Utilisation de la lame McMaster 11

Utilisation d'une centrifugeuse 12

Identification des œufs d'helminthes 16

Identification des formes larvaires ou adultes libres 16

3. Bactériologie de l'assainissement 17

3.1 Méthodes NPP 17

Equipement et produits consommables 17

Mode opératoire détaillé illustré 18

3.2 Méthode de filtration sur membrane 22

Equipement et produits consommables 22

Mode opératoire détaillé illustré 23

3.3 Techniques de laboratoire de base 26

Asepsie 26

Préparation et stérilisation du milieu 27

Préparation d'une série de dilutions décimales 27

Incubation 28

4. Programmes de surveillance régulière 29

4.1 Coliformes fécaux 29

4.2 Œufs d'helminthes 29

Heure du jour 29

Fréquence de l'échantillonnage 30
Nombre d'échantillons 30
Bibliographie 31
Pour en savoir plus 32

Remerciements

Les auteurs expriment leur vive gratitude au Professeur L. Schwartzbrod, de l'Université de Nancy (Nancy, France), qui a bien voulu revoir le texte. Ils tiennent aussi à remercier le Dr Q. Bickle, de l'Ecole d'hygiène et de médecine tropicale de Londres (Londres, Angleterre), le Dr L. Gibbons, de l'Institut international de parasitologie (St Albans, Angleterre), M. M. Guy, de l'Ecole de médecine tropicale de Liverpool (Liverpool, Angleterre), le Professeur I. Miyazaki et le Dr S. Habe, de l'Université de Kyushu (Fukuoka, Japon), le Dr F. Rochette, de Janssen Pharmaceutica (Beerse, Belgique) et le Dr D. Spratt, du CSIRO (Canberra, Australie) qui leur ont fourni des matériels parasitaires frais pour le tirage des planches et ont bien voulu les autoriser à reproduire certains éléments de textes existants.

1. Introduction

L'utilisation d'eaux résiduaires pour l'irrigation est une pratique agricole de plus en plus courante, spécialement dans les régions arides ou semi-arides. Les rendements obtenus sont plus élevés car, outre que les eaux usées apportent l'eau indispensable à la croissance végétale, elles contiennent des éléments nutritifs (principalement de l'azote et du phosphore). Toutefois, ce recyclage comporte le risque de contribuer à la transmission des maladies associées aux excreta. Vers la fin des années 80, l'OMS, la Banque mondiale et l'International Reference Centre for Waste Disposal (Centre international de référence pour l'élimination des déchets – IRCWD) ont patronné une série de travaux et de réunions d'experts sur l'étude des risques pour la santé qui découlent de cette pratique. (International Reference Centre for Waste Disposal, 1985; Shuval et al., 1986; Prost, 1988; Organisation mondiale de la Santé, 1989). La conclusion de ces experts, sur la base des données épidémiologiques, a été que les principaux risques consistaient dans la transmission :

- de nématodoses intestinales – d'une part au personnel travaillant dans les champs irrigués au moyen d'eaux résiduaires, de l'autre aux consommateurs de légumes cultivés dans ces champs – provoquées par *Ascaris lumbricoides* (ascaris, ver rond pathogène pour l'homme), *Trichuris trichiura* (trichocéphale) et *Ancylostoma duodenale* ou *Necator americanus* (ankylostomes parasites de l'homme);
- de maladies bactériennes d'origine fécale – diarrhée et dysenterie bactériennes, typhoïde et choléra – aux consommateurs des légumes contaminés.

Pour prévenir la transmission de ces maladies, il a été recommandé (Organisation mondiale de la Santé, 1989) :

- que seules des eaux résiduaires traitées soient utilisées pour l'irrigation; et
- que les eaux résiduaires satisfassent après leur traitement aux normes de qualité microbiologique recommandées au Tableau 1.

On trouvera dans le présent manuel de laboratoire la description des examens à pratiquer sur des échantillons d'eaux résiduaires traitées pour s'assurer que celles-ci satisfont aux critères recommandés au Tableau 1. Le choix de ces méthodes a été motivé par leur simplicité et leurs besoins extrêmement réduits en équipement; elles sont à la portée des techniciens de laboratoire, même sans qualification antérieure en microbiologie. On trouvera à la section 2 la description d'une méthode de numération des œufs de nématodes intestinaux dans un échantillon d'eaux résiduaires et, à la section 3, celle de deux méthodes de numération des coliformes fécaux. Ces techniques parasitologiques et bactériologiques sont toutes deux conçues principalement en vue de l'analyse d'échantillons qui répondent sensiblement aux critères de qualité du Tableau 1, à savoir environ un œuf de nématode intestinal par litre et 1000 coliformes fécaux par 100 ml; elles peuvent néanmoins être facilement adaptées à la numération de germes beaucoup plus nombreux. Enfin, la section 4 contient des recommandations concernant les programmes de surveillance systématique.

Tableau 1.

Normes de qualité microbiologique recommandées pour les eaux résiduaires traitées en vue de leur recyclage pour l'irrigation [a]

Catégorie	Conditions de recyclage	Groupe exposé	Nématodes intestinaux[b] (nombre moyen arithmétique d'œufs par litre[c])	Coliformes fécaux (nombre moyen géométrique par 100 ml[c])	Traitement en principe nécessaire pour donner aux eaux résiduaires la qualité microbiologique requise
A	Irrigation de plantes destinées normalement à être consommées non cuites, arrosage de terrains de sport ou de parcs publics	Personnel, consommateurs, grand public	≤ 1	≤1000[d]	Utilisation d'une série de bassins de stabilisation spécialement conçus à cet effet (ou traitement équivalent)
B	Irrigation de cultures céréalières, de cultures industrielles, de cultures fourragères, de pâturages et arrosage d'arbres[e]	Personnel	≤1	Aucune norme recommandée	Séjour pendant 8-10 jours dans des bassins de stabilisation, ou traitement équivalent, en vue d'en éliminer les helminthes et les coliformes fécaux
C	Irrigation localisée [f] de cultures de la catégorie B si l'exposition du personnel et du grand public est exclue	Aucun	Sans objet	Sans objet	Traitement préliminaire exigé compte tenu de la technique d'irrigation utilisée, mais consistant au minimum dans une sédimentation primaire

Source : D'après Organisation mondiale de la Santé (1989).

[a] Dans certains cas, il faut tenir compte des facteurs épidémiologiques, socio-culturels et environnementaux locaux et, éventuellement, modifier les normes recommandées en conséquence.

[b] Parasites des genres *Ascaris* et *Trichuris* et ankylostomes.

[c] Pendant la période d'irrigation.

[d] Une norme plus rigoureuse (≤ 200 coliformes fécaux par 100 ml) doit s'appliquer aux pelouses qui sont ouvertes au grand public, comme celles des hôtels, et comportent de ce fait un risque de contact direct.

[e] Dans le cas des arbres fruitiers l'irrigation doit être terminée deux semaines avant la cueillette, et aucun fruit ne doit être ramassé par terre. L'irrigation par aspersion est à prohiber.

[f] Egalement appelée irrigation au goutte-à-goutte.

2. Parasitologie de l'assainissement

2.1 Méthode de Bailenger modifiée

Choix de la méthode et comparaison avec d'autres

Grâce aux progrès de la parasitologie médicale, on dispose aujourd'hui de toute une gamme de techniques pour compter les œufs et les larves d'helminthes intestinaux dans des échantillons de selles et, moyennant l'adaptation des principes de base, pour compter les œufs d'helminthes dans les boues et dans le compost. En revanche, la numération des œufs et des larves d'helminthes intestinaux dans les eaux résiduaires est beaucoup moins aisée. On trouve dans ces eaux un grand nombre d'espèces parasites de l'homme ou des animaux, ainsi que des formes libres, qui diffèrent par leur taille, leur densité et leurs propriétés surfaciques et ont une concentration beaucoup plus faible que dans les selles, les boues ou le compost.

La littérature technique contient la description de nombreuses méthodes de numération des œufs d'helminthes dans les eaux résiduaires. Chacune a ses avantages et ses inconvénients : certaines comportent un taux de récupération élevé mais sont d'exécution très longue; un grand nombre d'autres ne sont pas reproductibles fautes de précisions suffisantes, et leur taux de récupération n'est pas indiqué; d'autres encore nécessitent des produits chimiques d'un coût excessif ou ne conviennent pas, pour d'autres raisons, à des laboratoires mal équipés; d'autres, enfin, permettent seulement la récupération d'une gamme limitée d'espèces. Il est clair qu'il n'existe aucune méthode qui soit utilisable partout, permette la récupération de tous les œufs d'helminthes d'importance médicale et comporte un taux de récupération connu.

Toutes les méthodes connues assurent la séparation des parasites par l'une ou l'autre des deux grandes méthodes suivantes : leur flottation dans une solution de densité relativement élevée, qui assure leur séparation des autres débris, et leur sédimentation dans un tampon non miscible tandis que les matières grasses ou autres restent dans une solution interphasique (en principe de l'éther ou de l'acétate d'éthyle). Les deux méthodes font appel à la centrifugation. La possibilité de concentrer une espèce parasitaire déterminée tient sans doute à deux facteurs principaux : l'équilibre hydrophile-lipophile du parasite et sa densité relative par rapport au réactif servant à la concentration (Bailenger, 1979). En pratique, cela signifie que le pH ou la présence de métaux lourds ou d'alcools dans les réactifs utilisés peuvent modifier les propriétés surfaciques du parasite, dans une mesure variable selon les espèces; cela explique qu'aucune méthode n'assure une concentration identique pour toutes les espèces.

Bouhoum & Schwartzbrod (1989) ont comparé toute une gamme de méthodes d'analyse coprologique dans l'intention de les adapter aux échantillons d'eaux résiduaires. De toute les solutions de flottation essayées, l'iodomercurate (Janeckso & Urbanyi, 1931) s'est révélée celle qui permettait de concentrer les œufs du plus grand nombre d'espèces d'helminthes parasitaires, mais ce réactif leur a semblé trop corrosif et coûteux pour être utilisable en routine. La méthode d'Arthur (décrite in Faust et al., 1938) où l'on utilise comme solution de flottation du saccharose saturé, déforme rapidement les œufs, tandis que la

solution de sulfate de zinc (Faust et al., 1938) concentre assez mal les œufs de *Trichuris* ou *Capillaria*. La conclusion de Bouhoum & Schwartzbrod (1989) est que la méthode de Bailenger (Bailenger, 1979), adaptée par eux aux eaux résiduaires, est dans l'ensemble la meilleure : elle n'exige que des réactifs relativement bon marché et assure une bonne concentration pour toutes les espèces habituelles dans les eaux résiduaires.

Cette méthode de Bailenger modifiée est en général efficace, simple et peu coûteuse. Elle a cependant des limitations bien connues (voir plus loin), de sorte qu'il reste nécessaire d'en poursuivre l'évaluation. Quoi qu'il en soit, de toutes les méthodes disponibles, c'est celle qui réunit l'ensemble des avantages suivants : elle assure une récupération efficace des œufs des nématodes intestinaux indiqués au Tableau 1, elle est reproductible et elle est déjà largement utilisée dans les laboratoires du monde entier. Il est à espérer que le présent manuel fera pleinement apparaître les points forts et les points faibles de la méthode, permettra la normalisation de son protocole et encouragera les travaux de recherche encore nécessaires.

Avantages et inconvénients

La méthode de Bailenger modifiée présente les avantages ci-dessous :

1. La collecte et la préparation des échantillons ne présentent aucune difficulté. La sédimentation ne nécessite pas de récipients spéciaux et le traitement des échantillons est possible avec un équipement de laboratoire réduit au minimum. Il faut disposer de quelques réactifs chimiques spéciaux, mais on les trouve en général localement et ils sont peu coûteux. Les lames de McMaster nécessaires sont d'utilisation courante dans les laboratoires de parasitologie, et l'on devrait pouvoir se les procurer sans difficulté auprès des sociétés spécialisées dans l'approvisionnement des laboratoires.

2. On sait qu'il est très fatigant de rester longtemps l'œil rivé à l'oculaire et que ce peut être une source d'erreur. Avec les lames McMaster, l'examen n'exige en général que 1-2 minutes de sorte que l'erreur imputable à l'opérateur est réduite.

3. La recherche des œufs se fait dans un sous-échantillon de chaque échantillon préalablement traité. Pour accroître l'exactitude du résultat et contrôler l'homogénisation, on peut examiner les échantillons en double et faire la moyenne des nombres d'œufs observés; il faut normalement examiner 2-3 lames McMaster pour chaque échantillon et calculer la moyenne arithmétique.

La méthode a en revanche certains inconvénients :

1. Le taux de récupération des œufs obtenu n'est pas connu, mais on sait que cette méthode d'extraction soutient favorablement la comparaison avec toutes les autres techniques (Ayres et al., 1991; Bouhoum & Schwartzbrod, 1989). Bouhoum & Schwartzbrod ont établi que la récupération des œufs était satisfaisante pour toute une série d'helminthes parasites, à savoir *Ascaris, Trichuris, Capillaria, Enterobius vermicularis, Toxocara, Taenia* et *Hymenolepis*, tandis qu'Ayres et al. ont également récupéré régulièrement des œufs d'ankylostome.

2. La méthode ne convient pas pour bon nombre des œufs operculés ou des œufs de trématodes, notamment *Clonorchis sinensis, Diphyllobothrium latum, Fasciola hepatica, Fasciolopsis buski, Paragonimus westermani, P. pulmonalis* et *Schistosoma*. Tous ces parasites ont des hôtes intermédiaires aquatiques et sont importants dans les systèmes de recyclage des eaux en aquaculture (mais non en agriculture). Les œufs de certains d'entre eux peuvent flotter dans la solution de sulfate de zinc, mais ils sédimentent de nouveau rapidement ou se déforment, ce qui en rend l'identification délicate.

3. L'éther est *hautement inflammable* et *toxique*. Rude, Peeler & Risty (1987) ont montré qu'on peut le remplacer, sans perte d'efficacité, par l'acétate d'éthyle pour l'extraction

des œufs de parasite dans les selles. L'acétate d'éthyle est beaucoup moins dangereux que l'éther, il a un point d'ébullition et d'éclair plus bas, et il est moins toxique. Il est peu probable que son utilisation diminue le rendement de la méthode avec les eaux résiduaires, qu'elles soient brutes ou traitées.

Equipement et produits consommables

Réactifs

Les réactifs nécessaires sont les suivants : solution de sulfate de zinc (33%, densité 1,18); éther (ou acétate d'éthyle); tampon acéto-acétique (pH 4,5) (15 g d'acétate de sodium trihydraté, 3,6 ml d'acide acétique glacial, complétés à 1 litre avec de l'eau distillée); solution détergente (1 ml de Triton X-100 ou de Tween 80, complété à 1 litre avec de l'eau du robinet).

Equipement

Sont nécessaires : des récipients en matière plastique pour la collecte des échantillons; une centrifugeuse réglable jusqu'à 1000 g) et des tubes à centrifuger munis d'un couvercle (de préférence de 50 ml et de 15 ml); des pipettes Pasteur tétinées; des lames McMaster pour numération (1 ou 2); un agitateur vibrant, type Vortex (non absolument essentiel); une pompe à main (siphon); une éprouvette graduée de 10 ou de 50 ml ou une pipette graduée de 10 ml.

Mode opératoire détaillé illustré

La méthode donne d'excellents résultats avec des eaux résiduaires brutes. En revanche, quand les eaux usées ont été traitées, il faut porter le volume de l'échantillon à 10 litres au moins pour obtenir un bon taux d'extraction des œufs, car ils sont alors beaucoup moins nombreux (voir Note 1, p. 10). Les diverses étapes sont les suivantes :

1. Recueillir un échantillon d'eaux résiduaires de volume connu (V litres), en général 1 litre pour des eaux brutes ou partiellement traitées et 10 litres pour des effluents ayant subi un traitement complet.
2. Laisser décanter pendant 1-2 heures, selon la dimension du récipient (voir Note 2, p. 10). Il est recommandé d'utiliser un récipient cylindrique ouvert à son sommet, car cela facilite l'élimination du surnageant et permet un rinçage soigneux (Fig. 1).

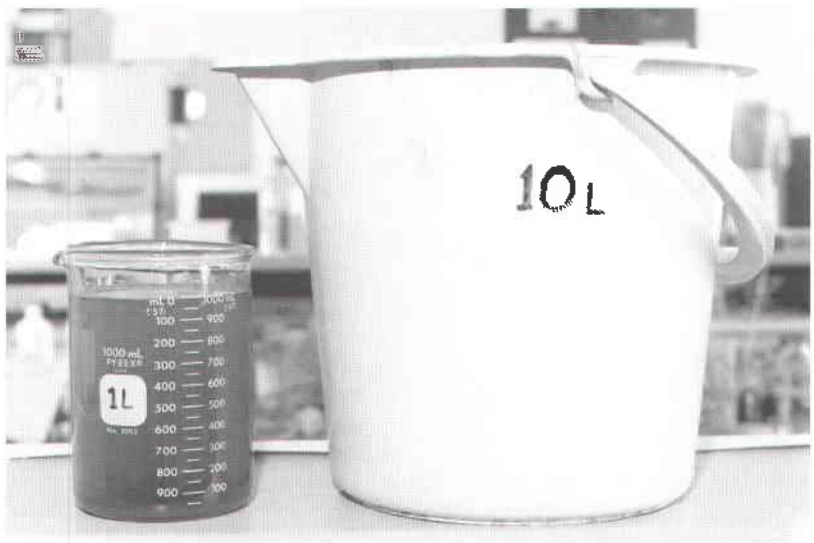

Fig. 1. Récipients cylindriques particulièrement adaptés à la sédimentation.

3. Eliminer 90% du surnageant avec une pompe aspirante ou une pompe à main (siphon) (Fig. 2).

Fig. 2.
Elimination du surnageant avec une pompe aspirante.

Fig. 3.
Rinçage des parois latérales du récipient avec une solution détergente diluée.

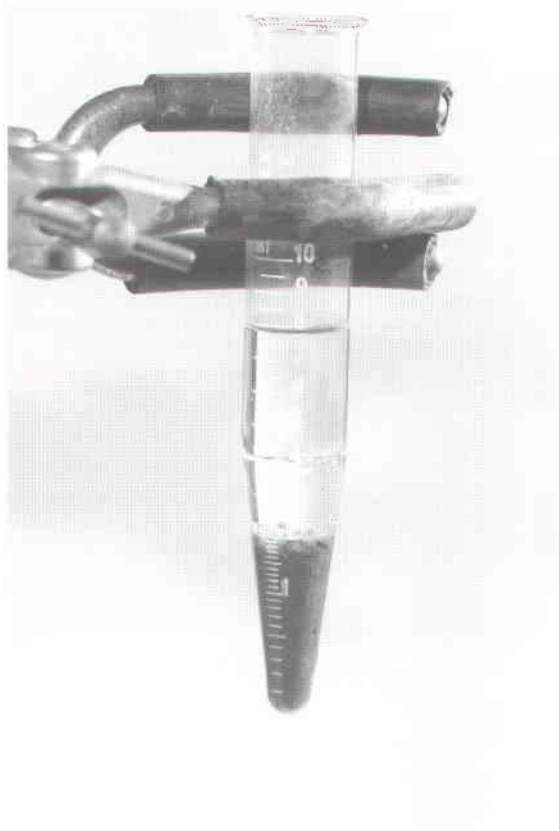

Fig. 4.
Culot de centrifugation additionné de 1 volume de tampon et de 2 volumes de solvant.

4. Transvaser soigneusement le sédiment dans un ou plusieurs tubes à centrifuger, selon le volume, et centrifuger à 1000 g pendant 15 min. Ne pas oublier de rincer soigneusement le récipient avec une solution détergente, et ajouter le produit de rinçage au sédiment précédemment recueilli (Fig. 3).
5. Eliminer le surnageant. Si l'on a utilisé à l'étape précédente plusieurs tubes à centrifuger, réunir tous les culots dans un seul tube (ne pas oublier de rincer soigneusement avec une solution détergente pour être sûr que le sédiment soit recueilli en totalité) et recentrifuger à 1000 g pendant 15 min.
6. Mettre le culot de centrifugation en suspension dans son volume de tampon acéto-acétique à pH 4,5 (autrement dit, si le volume du culot est de 2 ml, ajouter 2 ml de tampon) (voir Note 3, p. 10). Toutefois, si le culot a un volume inférieur à 2 ml, compléter à 4 ml avec le tampon afin qu'après extraction par l'acétate d'éthyle (étapes 7 et 8) il reste une quantité suffisante de tampon au-dessus du culot pour qu'on puisse éliminer la couche d'acétate d'éthyle en inclinant le tube sans risquer de remettre le culot en suspension.

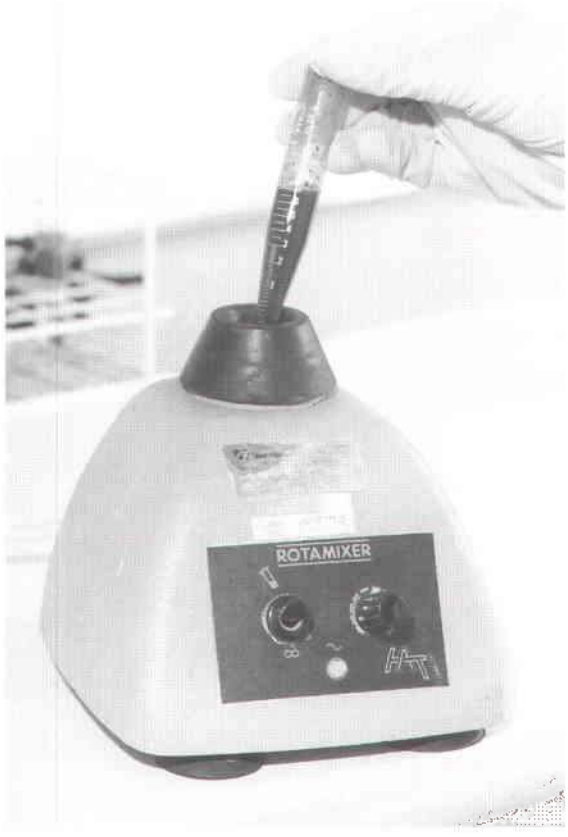

Fig. 5a.
L'homogénéisation de l'échantillon peut se faire à l'aide d'un agitateur vibrant, type Vortex.

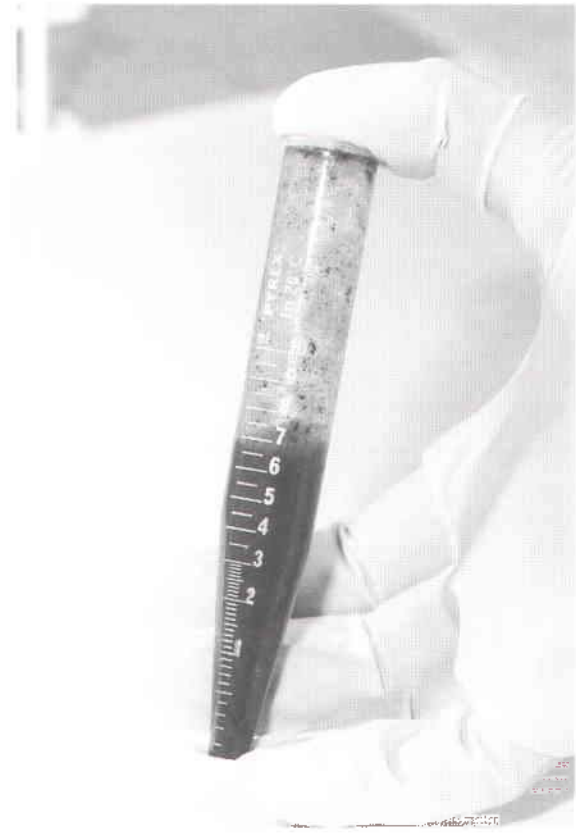

Fig. 5b.
On peut aussi homogénéiser l'échantillon à la main.

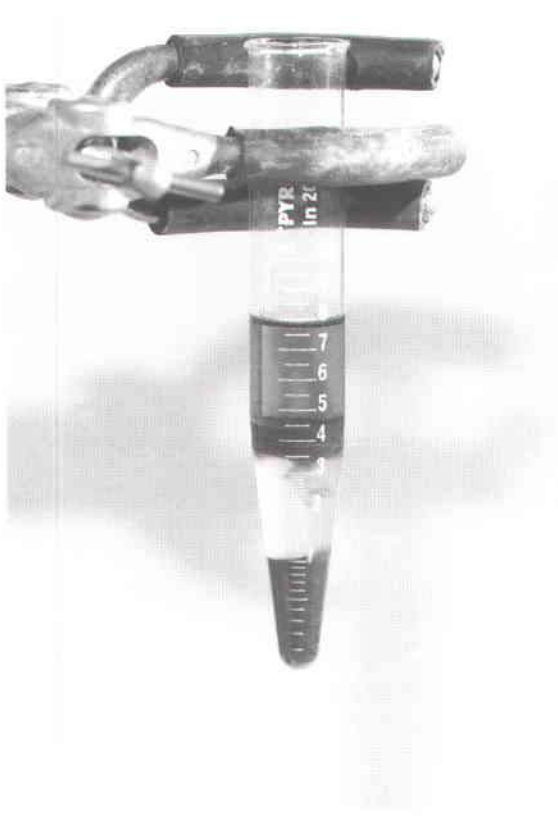

Fig. 6.
Séparation de l'échantillon en trois phases distinctes, après centrifugation.

Fig. 7.
Après rejet du surnageant, seul subsiste le culot de centrifugation.

7. Ajouter deux volumes d'acétate d'éthyle ou d'éther (soit 4 ml dans l'exemple ci-dessus) (Fig. 4) et mélanger soigneusement la solution au moyen d'un agitateur vibrant type Vortex. On peut aussi agiter, ce qui est parfaitement admissible à défaut d'un agitateur mécanique (Fig. 5).
8. Centrifuger à 1000 *g* pendant 15 min. L'échantillon comporte alors trois phases distinctes. Tous les débris lourds de nature non graisseuse, notamment les œufs et larves d'helminthes et les protozaires, sont rassemblés dans la couche inférieure. Au-dessus se trouve le tampon, qui doit être clair. Les matières grasses et autres ont migré dans l'acétate d'éthyle ou l'éther et forment un bouchon épais de couleur foncée au sommet de l'échantillon (Fig. 6).

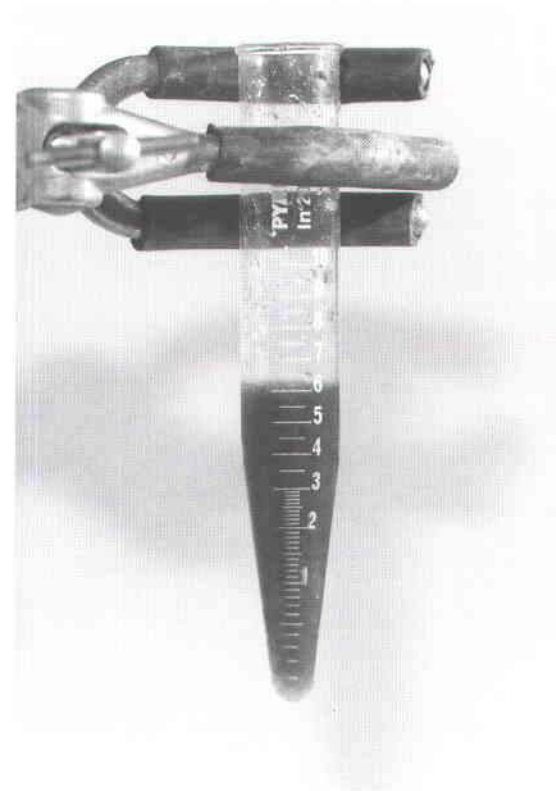

Fig. 8.
Le culot, de 1 ml dans cet exemple, est remis en suspension dans 5 fois son volume de solution de sulfate de zinc.

9. Noter le volume du culot de centrifugation contenant les œufs, puis éliminer le reste du surnageant en une seule fois en inclinant le tube avec précaution (Fig. 7). Il faut parfois commencer par détacher le bouchon graisseux de la paroi du tube à centrifuger avec une aiguille fine.
10. Remettre le culot en suspension dans 5 fois son volume de solution de sulfate de zinc (par exemple, pour un culot de 1 ml, ajouter 5 ml de $ZnSO_4$). Noter le volume du produit final (*X* ml) (Fig. 8). Mélanger soigneusement, de préférence à l'aide d'un agitateur vibrant, type Vortex. A noter qu'il faut au moins 1,5 ml pour remplir une lame McMaster à deux cellules.
11. Prélever rapidement une fraction avec une pipette Pasteur et la déposer sur une lame McMaster en vue de l'examen final (Fig. 9) (voir p. 9).
12. Laisser reposer la lame McMaster remplie sur une surface plane pendant 5 min avant de l'examiner. Cela laisse le temps à tous les œufs de venir flotter à la surface.
13. Placer la lame McMaster sur la platine d'un microscope et l'examiner au grossissement 10x ou 40x. Compter tous les œufs visibles à l'intérieur du micromètre dans chacune des cellules de la lame McMaster (Fig. 10). Pour plus de précision, répéter la numération dans deux lames, ou de préférence trois, et noter le nombre moyen trouvé.
14. Calculer le nombre d'œufs par litre à l'aide de la formule ci-dessous :

$$N = AX/PV$$

où :

N = nombre d'œufs par litre d'échantillon
A = nombre d'œufs comptés sur la lame McMaster ou moyenne des nombres trouvés dans deux ou trois lames
X = volume du produit final (ml)
P = Contenance de la lame McMaster (0,3 ml)
V = volume de l'échantillon initial (litres).

Ne pas oublier que, si l'on utilise une lame McMaster à une seule cellule, P = 0,15 ml (Fig. 11).

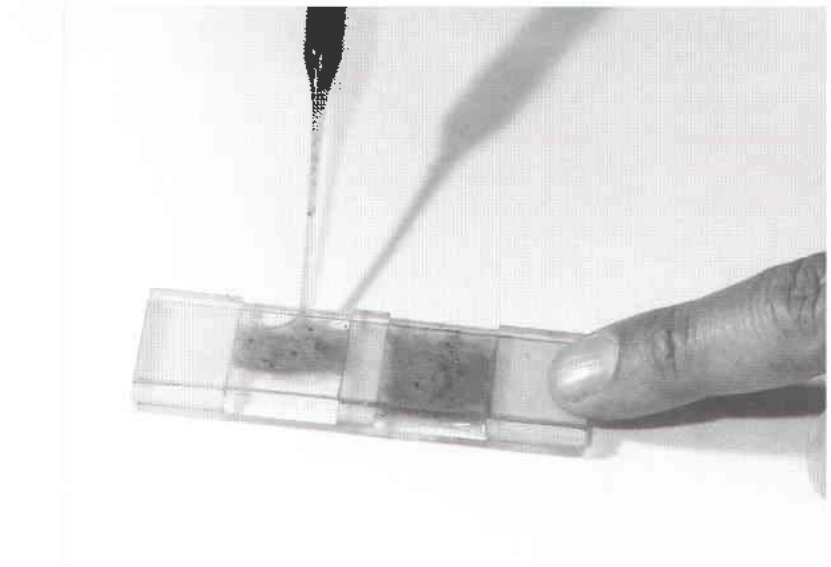

Fig. 9.
Remplissage d'une lame McMaster, en évitant la formation du bulles d'air.

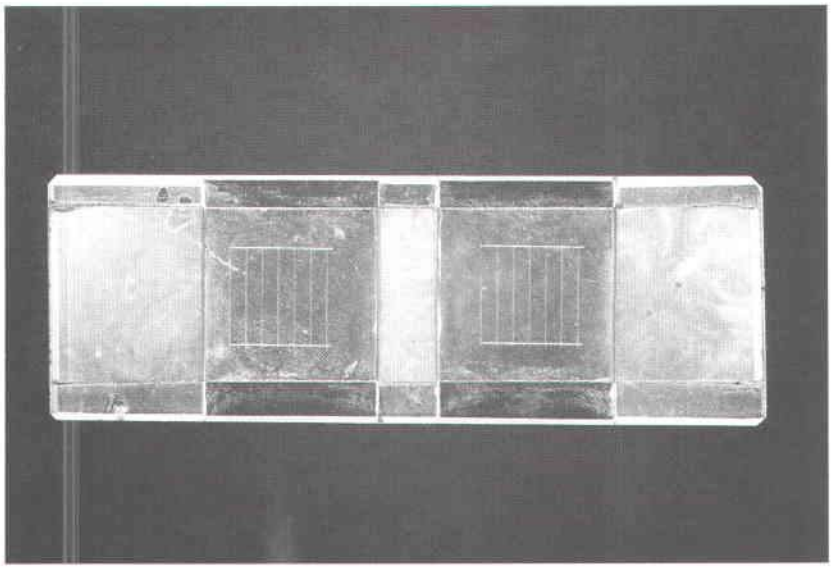

Fig. 10.
Lame McMaster de l'ancien modèle : un volume de 0,15 ml est emprisonné sous chaque micromètre.

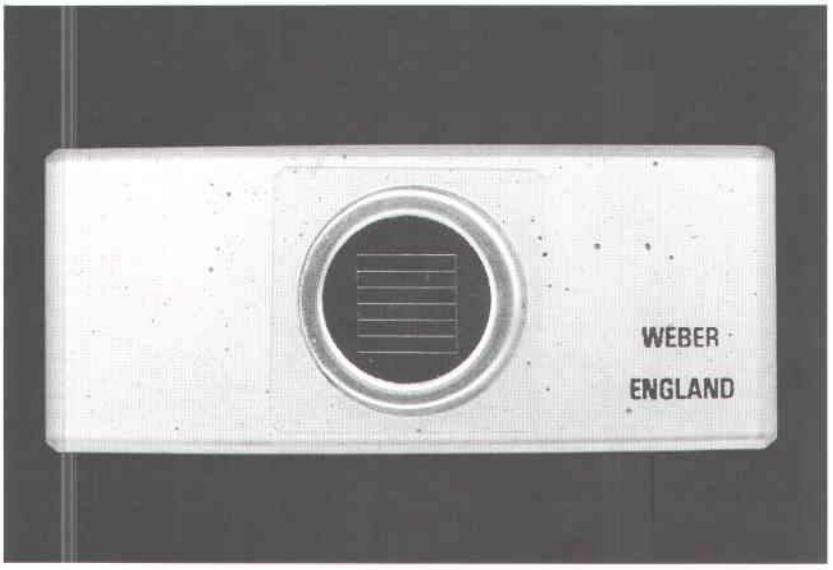

Fig. 11.
Lame McMaster du nouveau modèle : un volume de 0,15 ml est emprisonné sous l'unique micromètre.

Note 1 : taille de l'échantillon

On admet que les œufs ont au stade final du traitement une distribution uniforme dans l'échantillon, ce qui justifie l'utilisation de règles de trois pour passer du nombre d'œufs compté au nombre d'œufs par litre. En fait, quand on procède à la numération des œufs uniquement dans un échantillon, la teneur ainsi calculée risque d'être fortement surestimée. En outre, quand l'échantillon initial est de petite taille, il est peu probable, vu qu'on procède ensuite à un sous-échantillonnage, qu'on puisse déceler la présence d'œufs s'ils sont très peu nombreux. Le nombre d'échantillons positifs obtenu à partir d'eaux résiduaires traitées est nettement accru si l'on porte la taille de l'échantillon initial à 10 litres (Ayres et al., 1991).

Note 2 : durée de sédimentation

On peut utiliser la loi de Stokes pour calculer la vitesse de sédimentation des œufs de nématodes dans l'eau. A 20 °C, cette vitesse est la suivante pour les trois types d'œufs les plus fréquents :

Ascaris lumbricoides	20 mm/min
Trichuris trichiura	16 mm/min
ankylostomes	6 mm/min

Pour être certain de recueillir tous les œufs, il est recommandé de laisser décanter pendant au moins le double de la durée de sédimentation théorique pour la longueur du récipient utilisé.

Note 3 : tampon acéto-acétique

On sait, à la suite des travaux approfondis de Bailenger (1979), que l'extraction des helminthes contenus dans des échantillons de selles ne dépend pas uniquement de mécanismes de sédimentation ou de flottation, fonction de la densité, mais que l'équilibre hydrophile-lipophile des œufs de parasites par rapport au milieu d'extraction joue aussi un rôle très important. En ajustant le pH, on peut modifier cet équilibre de façon à obtenir une concentration d'œufs optimale. On s'est aperçu que le tampon acéto-acétique à pH 4,5 était à cet égard celui qui convenait le mieux pour toute une série d'helminthes.

2.2 Techniques de laboratoire de base

Réglage du microscope

Equipements

Les dispositifs ci-dessous sont nécessaires :

Micromètre étalon à poser sur la platine : lame pour microscope portant une échelle gravée de 1 mm, subdivisée en 100 parties égales (dont chacune mesure donc 10 µm).

Micromètre à insérer dans l'oculaire : disque spécial portant une échelle gravée, à insérer dans l'oculaire. Les subdivisions ne sont pas identiques pour tous les disques (mais dépendent du fabricant).

Etalonnage du micromètre à insérer dans l'oculaire

Chacun des microscopes et des oculaires utilisés doivent faire l'objet d'un étalonnage, comme suit :

1. Poser le micromètre étalon sur la platine et mettre au point sur la platine en utilisant l'objectif à sec de plus faible grossissement, par exemple 4× ou 10×.
2. Insérer le disque micromètre dans l'oculaire et le faire tourner jusqu'à obtenir la superposition des deux graduations.

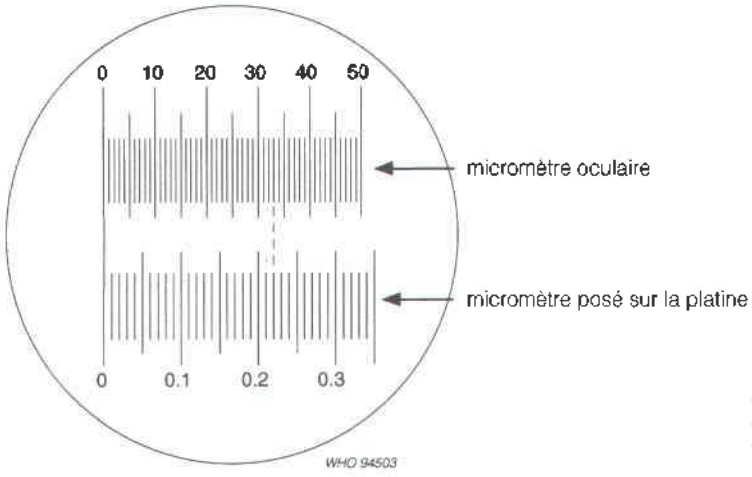

Fig. 12.
Représentation d'une partie d'un micromètre oculaire se superposant au micromètre posé sur la platine, en vue de l'étalonnage du microscope.

3. Déplacer la platine mécanique de façon à faire coïncider le zéro des deux graduations.
4. Sans déplacer le micromètre étalon, posé sur la platine, rechercher un autre endroit vers la droite où deux autres traits sont exactement superposés (Fig. 12).
5. Compter le nombre de subdivisions comprises, sur le micromètre oculaire, entre le zéro et le deuxième point de superposition.
6. Recommencer l'opération en utilisant successivement chacun des objectifs, par exemple de grossissements 4x, 10x, 40x, 100x. Noter que plus le grossissement est élevé, plus les traits du micromètre étalon paraissent épais. Il faut choisir un trait du micromètre oculaire qui se superpose exactement avec l'axe (ou avec l'extrémité droite ou gauche) d'un trait du micromètre étalon.
7. Calculer la longueur exacte de chaque subdivision de la graduation du micromètre oculaire, pour chacun des objectifs, comme suit (en se guidant sur l'exemple de la Fig. 12) :
   — avec l'objectif 10x : on constate que 33 subdivisions du micromètre oculaire correspondent exactement à 22 subdivisions du micromètre étalon. Pour l'objectif considéré, chaque subdivision du micromètre oculaire correspond donc à 22 x 10/33 = 6,7 µm.
   — avec l'objectif 40x : à supposer, par exemple, que 37 subdivisions du micromètre oculaire correspondent exactement à 6 subdivisions du micromètre étalon, chaque subdivision du micromètre oculaire correspond donc, pour l'objectif considéré, à 6 x 10/37 = 1,6 µm.

Utilisation de la lame McMaster

La lame de numération McMaster est une lame spéciale pour microscope qui permet de compter les œufs ou les larves d'helminthes contenus dans un volume connu de solution de flottation. La plupart des fournisseurs d'équipements de laboratoire proposent aujourd'hui deux modèles. Dans le plus ancien, le plus utilisé (Fig. 10), la lame est divisée en deux cellules dont chacune comporte sur sa face supérieure, un quadrillage gravé à l'eau forte. Le volume précis emprisonné sous chaque quadrillage est de 0,15 ml. Dans le nouveau modèle (Fig. 11), la lame ne comporte qu'une seule cellule, mais le volume emprisonné sous le quadrillage est encore de 0,15 ml.

Le principe de la lame McMaster est que les œufs placés dans la solution de flottation viennent en surface, au contact immédiat du verre supérieur, tandis que les débris plus lourds décantent. Quand la mise au point est faite sur le quadrillage, les œufs sont nets,

contrairement aux débris. En explorant systématiquement le champ vers le haut et vers le bas, on peut compter le nombre exact d'œufs en suspension dans le volume de 0,15 ml.

Pour remplir une lame McMaster à deux cellules, procéder comme suit :

1. Mélanger soigneusement la suspension de flottation définitive, de préférence avec un agitateur vibrant type Vortex, pour obtenir un mélange homogène. Remplir rapidement une pipette Pasteur et vider doucement la solution dans l'une des cellules de la lame. Remplir complètement la cellule sans se soucier du fait que la numération n'est effectuée que dans la partie située sous le quadrillage. Il faut opérer rapidement et en douceur pour que les œufs ne commencent pas à venir à la surface dans le tube à essais ou dans la pipette. Veiller à ce qu'il n'y ait pas de bulles d'air sous le quadrillage.
2. Remplir l'autre cellule de la lame McMaster après avoir de nouveau homogénéisé la solution.
3. Laisser reposer quelques minutes avant la numération, le temps que tous les œufs viennent flotter à la surface tandis que les débris décantent.
4. Compter le nombre d'œufs sous chacun des quadrillages. Quand les œufs sont très nombreux et que certains se trouvent traversés par les traits extrêmes, l'usage est de compter ceux qui sont traversés par deux d'entre eux (par exemple le trait supérieur et le trait gauche) et de ne pas tenir compte de ceux qui sont partagés par les deux autres (dans l'exemple, le trait inférieur et le trait droit). On obtient ainsi une bonne estimation du nombre d'œufs contenus dans 0,3 ml.
5. Procéder à au moins deux (de préférence trois) numérations si l'on dispose d'une quantité suffisante de solution de flottation, et faire la moyenne des deux (ou trois) résultats trouvés. Calculer le nombre d'œufs contenus dans l'échantillon initial en utilisant la formule de la page 8 (ne pas oublier que P = 0,15 si l'on se sert des nouvelles lames de numération à une seule cellule).

Les lames de numération McMaster sont généralement en verre et peuvent être commandées auprès des gros fournisseurs d'équipement scientifique. Certaines sociétés fabriquent aujourd'hui des lames en matière plastique meilleur marché (et moins fragiles). Si l'on se sert de ce type de lame, il faut prendre soin de ne pas les rayer.

Utilisation d'une centrifugeuse

Dans la plupart des simples opérations comportant l'utilisation d'une centrifugeuse, la vitesse de celle-ci est exprimée sous forme de la force centrifuge relative (exprimée en nombre de g). Il arrive cependant que la vitesse soit exprimée en tours par minute (tr/min). La conversion entre ces deux unités se fait au moyen de la formule suivante :

$$FCR = r.\ N^2/k$$

où : FCR = force centrifuge relative (g),

r = rayon de la centrifugeuse, mesuré de l'axe de rotation au centre du bol (cm),

N = vitesse de rotation (tr/min),

k = 89 456.

La conversion en sens inverse se fait au moyen de la formule :

$$N = \sqrt{k.\ FCR/r}$$

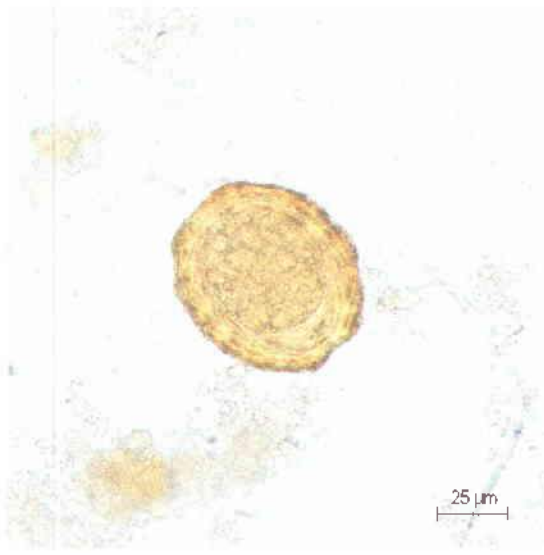

Planche I. *Ascaris lumbricoides*

Planche II. *Ascaris lumbricoides* (infécond)

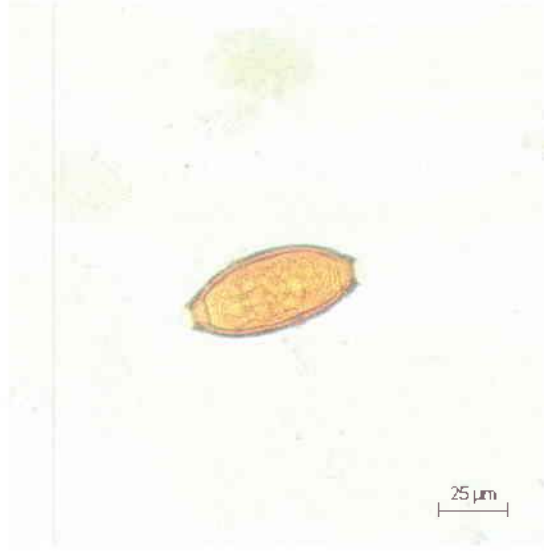

Planche III. *Trichuris trichiura*

Planche IV. Ankylostome

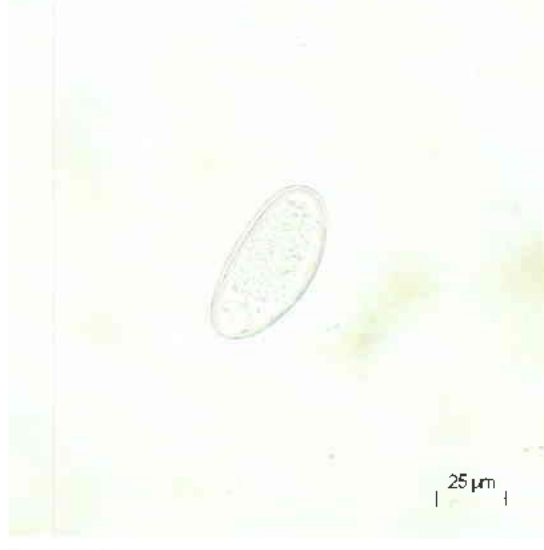

Planche V. *Enterobius vermicularis*

Planche VI. *Capillaria hepatica*

Planche VII. *Capillaria philippinensis*

Planche VIII. *Hymenolepis diminuta*

Planche IX. *Taenia sp.*

Planche X. *Hymenolepis nana*

Planche XI. *Diphyllobothrium latum*

Planche XII. *Clonorchis sinensis*

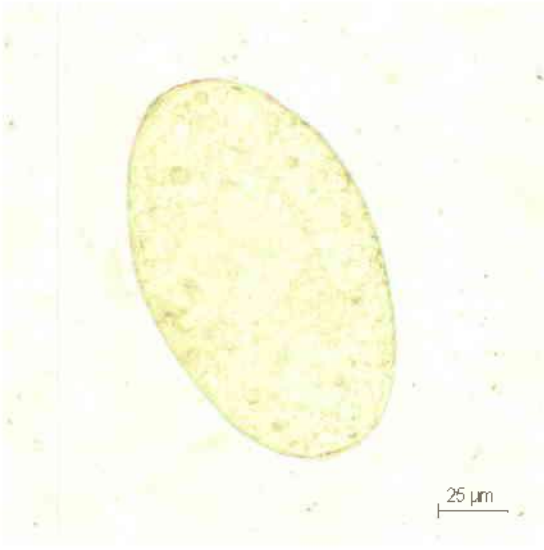

Planche XIII. *Fasciola hepatica*

Planche XIV. *Paragonimus westermani*

Planche XV . *Schistosoma haematobium*

Planche XVI . *Schistosoma japonicum*

Planche XVII . *Schistosoma mansoni*

Identification des œufs d'helminthes

Il est fréquent que les eaux résiduaires contiennent les œufs d'helminthes parasites d'animaux comme le rat, les animaux domestiques – porc, chien – et les oiseaux. S'il est inutile d'identifier exactement ces parasites, il importe de bien voir qu'ils ne sont pas d'origine humaine. Les planches I-XVII représentent les œufs d'un certain nombre d'helminthes parasites de l'homme parmi les plus fréquents dans les échantillons d'eaux résiduaires. Bien que ces œufs soient caractéristiques de chaque espèce, il ne faut pas oublier qu'ils n'ont pas tous exactement les mêmes dimensions ni la même forme. Il existe diverses publications auxquelles on peut se reporter pour l'identification (voir Pour en savoir plus, p. 32). Cependant, il est parfois pratiquement impossible de savoir si les œufs observés sont d'origine humaine ou animale : c'est le cas, par exemple, des œufs d'*Ascaris suum* (parasite du porc) et des œufs d'*A. lumbricoides* (parasite de l'homme) qui ne se distinguent pas par leur morphologie. De même, les œufs des diverses espèces de *Trichuris* ont tous sensiblement la même couleur et la même forme. Seules des mesures soigneuses permettent de distinguer les œufs du trichocéphale, *T. trichiura*, de ceux des espèces parasites d'animaux. Les planches de Thienpont, Rochette & Vanparijs sont excellentes pour la comparaison des œufs d'helminthes d'origine humaine ou animale.

On peut identifier exactement les œufs des helminthes parasites de l'homme en utilisant un microscope équipé d'un micromètre oculaire étalonné selon la méthode décrite pages 10-11.

Pour cela, on amène l'œuf, par exemple un œuf de *Trichuris trichiura*, sous l'échelle graduée du micromètre oculaire. S'il recouvre huit subdivisions et qu'on utilise, par exemple, l'objectif 10x étalonné dans l'exemple de la page , sa longueur réelle est de :

$$8 \times 6{,}7 = 53{,}6\ \mu m.$$

De façon analogue, si l'on mesure le même œuf avec l'objectif 40x étalonné du même exemple et si l'œuf recouvre 33,5 subdivisions, sa longueur réelle est de :

$$33{,}5 \times 1{,}6 = 53{,}6\ \mu m.$$

Le longueur ainsi trouvée peut être comparée, à des fins d'identification, à celle des spécimens types représentés sur les planches des pages 13-15.

Identification des formes larvaires ou adultes libres

Dans les eaux résiduaires non traitées comme dans les effluents à la sortie de n'importe quel type d'installations de traitement, on trouve fréquemment des nématodes à l'état de formes larvaires et adultes libres qu'on peut prendre à tort pour des formes parasitaires ; c'est notamment le cas des stades rhabditoïdes ou filariformes d'*Ancylostoma duodenale*, de *Necator americanus* ou de *Strongyloides stercoralis*. Ces nématodes libres se nourrissent de bactéries, d'algues ou de petites particules organiques. On en compte des centaines d'espèces dont bon nombre n'ont pas encore été décrites.

Dans les échantillons de selles, le risque d'erreurs d'identification est minime, car les formes libres y sont normalement rares. On peut reconnaître les larves rhabditoïdes des ankylostomes et celles de *Strongyloides stercoralis* d'après la morphologie comparée de leur cavité buccale. De même, un examen attentif des deux extrémités – tête et queue – permet d'identifier les larves filariformes. En revanche, dans les échantillons d'eaux résiduaires, l'identification rigoureuse de ces formes est rendue délicate par la multitude d'espèces de nématodes libres qu'on y trouve ; il est donc indispensable d'effectuer des mesures précises des caractères morphologiques intéressants. Pour cela, il faut monter et colorer les nématodes individuellement et les examiner sous fort grossissement. La plupart des méthodes d'examen des eaux résiduaires, notamment la méthode de Bailenger modifiée, ne se prêtent pas à cette procédure.

Sauf lorsqu'on peut examiner chacun des nématodes comme il est indiqué ci-dessus, il est proposé de ne pas tenir compte des formes larvaires et adultes. Même si elles contiennent des formes parasitaires, on ne connaît pas assez la survie et la viabilité de ces formes dans les eaux résiduaires pour pouvoir apprécier le risque qui en résulte pour la santé.

3. Bactériologie de l'assainissement

En général, la numération des coliformes fécaux dans les échantillons d'eaux résiduaires se fait par deux catégories de méthodes : a) les méthodes du nombre le plus probable (NPP) ; b) la méthode de filtration sur membrane. Deux méthodes NPP sont décrites à la section 3.1, tandis que la méthode de filtration sur membrane fait l'objet de la section 3.2.

3.1 Méthodes NPP

Le nombre de coliformes trouvé par cette technique constitue la meilleure estimation statistique du nombre réel de germes (d'où le nom de « méthode du nombre le plus probable » ; on l'obtient en mettant en culture un certain nombre (généralement 5) d'échantillons et (ou) de dilutions de ces échantillons. L'estimation est fondée sur le principe de la « dilution jusqu'à extinction ». Par exemple, si l'on examine une fraction de 1 ml pour chaque dilution d'une série de dilutions de 10 en 10 (voir p. 27) et que l'on observe une croissance à la dilution de 10^{-3} mais non à la dilution de 10^{-4}, la meilleure estimation du nombre de coliformes est de 10^3 bactéries par ml. En augmentant, généralement jusqu'à 5, le nombre de fractions de 1 ml examinées pour chaque dilution, on améliore cette estimation.

Dans la première des deux méthodes NPP décrites ici, on examine cinq fractions de 1 ml prélevées dans la même dilution, de sorte qu'on obtient seulement une valeur approximative du NPP de coliformes fécaux. Très simple et peu coûteuse, cette méthode convient pour l'analyse régulière d'eaux résiduaires traitées dont la teneur en coliformes fécaux est conforme au critère fixé, soit un maximum de 100 germes par 100 ml (voir Tableau 1).

Dans la seconde méthode NPP, on examine cinq fractions de 1 ml pour chacune des dilutions d'une série de trois, ce qui donne une meilleure estimation du nombre de coliformes fécaux. Moyennant la modification des dilutions examinées (voir méthode B, étape 10, p. 21), cette méthode peut être adaptée à l'analyse d'eaux résiduaires ayant une teneur quelconque en coliformes fécaux.

Equipement et produits consommables

Produits consommables

Sont nécessaires les produits chimiques énumérés ci-après pour le milieu A-1, ainsi qu'une solution de Ringer diluée au quart (qu'on trouve dans le commerce sous forme de comprimés) ou une solution de chlorure de sodium (8,5 g de NaCl par litre d'eau distillée). Il faut également disposer d'ouate non hydrophile.

Il est recommandé d'utiliser le milieu A-1 (American Public Health Association, 1995), car on peut s'en servir pour une incubation directe à 44° C. Comme on ne le trouve pas dans le commerce sous forme déshydratée, il faut le préparer (voir p. 27) conformément aux proportions ci-dessous :

lactose	5 g
tryptone	20 g
salicinoside	0,5 g
NaCl	5 g
Triton X-100	1 ml
eau distillée	1 litre

On répartit ce milieu en fractions de 5 ml dans des tubes à essais (ou des flacons à bouchon vissé) dont chacun contient un tube de Durham inversé (il s'agit d'un très petit tube à essais). Les tubes à essais sont fermés au moyen d'un tampon d'ouate non hydrophile puis stérilisés (voir p. 27). Pendant la stérilisation, l'air contenu dans le tube de Durham est chassé, de sorte que le tube se remplit entièrement de milieu.

Equipement

Il faut disposer des éléments ci-dessous :

- flacons de 100 ml à bouchon vissé
- tubes à essais (100 mm x 12 mm) ou flacons à bouchon vissé de 14 ml
- pipettes sérologiques à écoulement, de 1 ml
- bec Bunsen
- porte-tubes à essais
- incubateur ou bain-marie
- autoclave ou autocuiseur
- balance (± 0,01 g).

Mode opératoire détaillé illustré

On trouvera ci-après la description de deux méthodes NPP. La méthode A est la plus simple et convient pour l'examen régulier (voir section 4) d'eaux résiduaires traitées, lesquelles contiennent environ 1000 coliformes fécaux par 100 ml au maximum.

Plus précise, la méthode B est utilisable par la teneur de l'échantillon soit, comme ci-dessus, de 1000 coliformes fécaux par 100 ml ou qu'elle soit très supérieure.

Méthode A

1. Recueillir un échantillon d'eaux résiduaires dans un flacon stérile de 100 ml à bouchon vissé.
2. Agiter vigoureusement et prélever aseptiquement 1 ml en utilisant une pipette stérile à écoulement de 1 ml, transvaser dans un tube à essais ou un flacon à bouchon vissé *stérile* contenant 9 ml de solution de Ringer diluée au quart (ou de solution de NaCl) à 8,5 g/l) (Fig. 13). **Aspiration buccale à exclure** – utiliser une micro-pompe aspirante pour pipette.
3. Agiter vigoureusement cette dilution au dixième et, *en utilisant une nouvelle pipette stérile de 1 ml* (la *même* dans tous les cas), transvaser 1 ml de solution dans chacun d'une série de cinq tubes à essais ou flacons à bouchon vissé *stériles* contenant un tube de Durham inversé et 5 ml de milieu A-1 (Fig. 14). Munir chaque tube ou flacon d'une étiquette où l'on inscrira le code de l'échantillon, la date et la valeur de la dilution (1 : 10).
4. Mettre ces cinq tubes à essais ou flacons dans un incubateur ou un bain-marie maintenu à 44 °C (± 0,25 °C) (voir p. 27).

Fig. 13.
Addition de 1 ml d'échantillon à 9 ml de diluant, de façon à obtenir une dilution au dixième (1:10).

Fig. 14.
Addition de 1 ml de dilution à 1:10 dans un tube à essais contenant 5 ml de milieu A-1, ainsi qu'un tube de Durham inversé.

Fig. 15.
Après incubation à 44° C pendant 24 h, on observe la production de gaz dans trois des tubes. On voit au Tableau 2 que le NPP est de 910 coliformes fécaux par 100 ml d'échantillon (d'eaux résiduaires traitées).

Fig. 16.
Après incubation à 44° C pendant 24 h, cinq des tubes contenant 1 ml d'échantillon sont positifs (production de gaz), de même que deux des tubes contenant 0,1 ml (1 ml de dilution à 1:10) et deux de ceux contenant 0,01 ml (1 ml de dilution à 1:100). Pour plus de clarté les schémas placés à côté des tubes montrent ceux qui sont positifs et ceux qui sont négatifs. On voit au Tableau 3 que le NPP est de 950 coliformes fécaux par 100 ml d'échantillon (d'eaux résiduaires traitées).

5. Après incubation pendant 24 h, examiner chaque tube à essais ou flacon pour voir s'il y a eu production de gaz. (Les coliformes fécaux fermentent le lactose du milieu A-1 avec production de gaz dont une partie est emprisonnée dans le tube de Durham inversé.) Compter le nombre de tubes ou flacons positifs (c'est-à-dire contenant du gaz) (Fig. 15) et déterminer le NPP d'après le Tableau 2.

Tableau 2.

NPP de coliformes fécaux par 100 ml d'échantillon, pour une série de cinq tubes contenant chacun 0,1 ml d'échantillon[a]

Nombre de tubes positifs	NPP pour 100 ml
0	240
1	350
2	540
3	910
4	1600
5	>1800

[a] Adapté d'après Department of the Environment (1994) avec l'aimable autorisation de Her Majesty's Stationery Office.

Méthode B

1. Recueillir un échantillon d'eaux résiduaires conformément aux indications données pour la méthode A.
2. Préparer une dilution à 1:10 (comme pour la méthode A) et une dilution à 1:100 (simple dilution au dixième de la première dilution à 1:10); (voir p. 27).
3. Munir chacun des cinq tubes à essais ou flacons à bouchon vissé stériles contenant un tube de Durham inversé et 5 ml de milieu A-1 d'une étiquette où l'on inscrira le code de l'échantillon, la date et la valeur de la dilution (1:100).
4. Recommencer, en indiquant comme valeur de la dilution 1:10; recommencer une troisième fois, en indiquant comme valeur de la dilution 1:1.
5. En utilisant une nouvelle pipette stérile de 1 ml, transvaser 1 ml de dilution à 1:100 dans chacun des cinq tubes à essais ou flacons à bouchon vissé stériles dont l'étiquette porte l'indication 1:100.
6. En utilisant la même pipette (mais en veillant à ne pas la poser sur la paillasse et à ne rien toucher avec son extrémité), transvaser 1 ml de dilution à 1:10 dans chacun des cinq tubes à essais ou flacons à bouchon vissé stériles de la deuxième série, dont l'étiquette porte l'indication 1:10.
7. Toujours avec la même pipette, transvaser 1 ml de l'échantillon non dilué dans chacun des cinq tubes à essais ou flacons à bouchon vissé stériles de la troisième série, dont l'étiquette porte l'indication 1:1.
8. Installer les 15 tubes à essais dans un porte-tubes et mettre celui-ci dans un incubateur ou un bain-marie maintenu à 44 °C (± 0,25 °C).

9. Après incubation pendant 24 h, compter le nombre de tubes positifs (montrant la production de gaz) pour chaque dilution (Fig. 16), et chercher le NPP de coliformes fécaux au Tableau 3.

10. Si le nombre de coliformes fécaux est nettement supérieur à 1800 par 100 ml, prendre une quantité d'échantillon plus faible (en utilisant toujours des fractions de 1 ml, mais prélevées dans une dilution plus poussée). Si les tubes à essais contiennent 0,1 ml, 0,01 ml et 0,001 ml d'échantillon, multiplier le nombre NPP indiqué au Tableau 3 par 10. De même, si les tubes à essais contiennent 0,01 ml, 0,001 ml et 0,0001 ml d'échantillon, multiplier le NPP indiqué au Tableau 3 par 100.

Tableau 3.

NPP de coliformes fécaux pour 100 ml d'échantillon, pour trois séries de tubes contenant chacun respectivement 1 ml, 0,1 ml et 0,01 ml d'échantillon[a]

Nombre de tubes positifs			NPP
1 ml	0,1 ml	0,01 ml	pour 100 ml
0	0	0	0
0	0	0	20
0	1	0	20
1	0	0	20
1	0	1	40
1	1	0	40
1	2	0	50
2	0	0	40
2	0	1	50
2	1	0	50
2	1	1	70
2	2	0	70
2	3	0	110
3	0	0	70
3	0	1	90
3	1	0	90
3	1	1	130
3	2	0	130
3	2	1	160
3	3	0	160
4	0	0	110
4	0	1	140
4	1	0	160
4	1	1	200
4	2	0	200
4	2	1	250
4	3	0	250
4	3	1	310
4	4	0	320
4	4	1	380
5	0	0	220
5	0	1	290
5	0	2	410
5	1	0	310
5	1	1	430
5	1	2	600
5	1	3	850
5	2	0	500
5	2	1	700
5	2	2	950
5	2	3	1 200
5	3	0	750
5	3	1	1 100
5	3	2	1 400
5	3	3	1 750
5	3	4	2 100
5	4	0	1 300
5	4	1	1 700
5	4	2	2 200
5	4	3	2 800
5	4	4	3 450
5	5	0	2 400
5	5	1	3 500
5	5	2	5 400
5	5	3	9 100
5	5	4	16 000
5	5	5	>18 000

[a] Adapté d'après Department of the Environment (1994) avec l'aimable autorisation de Her Majesty's Stationery Office.

3.2 Méthode de filtration sur membrane

La filtration sur membrane permet de compter les coliformes fécaux en faisant passer à travers le filtre un volume connu d'échantillon d'eaux résiduaires (ou d'une dilution de cet échantillon). Cette membrane filtrante consiste dans un papier-filtre spécial, à pores suffisamment petits (0,45 μm) pour arrêter tous les coliformes fécaux. Elle est ensuite placée sur un tampon absorbant saturé d'un milieu de culture pour coliformes fécaux, puis mise à incuber. Pendant l'incubation, chacun des coliformes donne naissance à une colonie bactérienne de couleur jaune. Une fois l'incubation terminée, on compte les colonies et l'on en déduit le nombre de coliformes pour 100 ml.

Equipement et produits consommables

Equipement

Il faut disposer des éléments ci-dessous :

- pince à membrane filtrante
- boîtes de Petri (en verre ou en matière plastique, jetables, de 60 mm de diamètre)
- unités de filtration sur membrane (en verre ou en matière plastique)
- pipettes sérologiques à écoulement, de 5 ml ou 10 ml et de 1 ml
- micro-pompe aspirante pour pipette
- pompe à vide (pompe électrique, pompe manuelle ou trompe à vide)
- bec Bunsen
- incubateur
- autoclave ou autocuiseur
- balance (± 0,01 g)

Produits consommables

Sont nécessaires les éléments ci-dessous :

- membranes filtrantes (porosité de 0,45 μm, diamètre de 47 mm)
- tampons absorbants (47 mm de diamètre)
- bouillon au laurylsulfate pour membrane
- solution de Ringer diluée au quart
- éthanol.

On trouve du bouillon au laurylsulfate pour membrane dans le commerce, sous forme déshydratée. A défaut, on peut le préparer conformément aux proportions ci-dessous (Department of the Environment, 1994) :

peptone	40 g
extrait de levure	6 g
lactose	30 g
rouge de phénol (en solution aqueuse à 4 g/l)	50 ml
laurylsulfate de sodium	1 g
eau distillée	1 litre

(pH 7,6 avant stérilisation)

On trouve également de la solution de Ringer diluée au quart dans le commerce, sous forme de comprimés; on peut aussi se servir d'une solution de chlorure de sodium (8,5 g de NaCl par litre d'eau distillée).

Mode opératoire détaillé illustré

Le mode opératoire ci-après convient pour les échantillons d'eaux résiduaires contenant 200-2000 coliformes fécaux par 100 ml. Dans le cas d'une teneur plus élevée, se reporter à l'étape 11 ci-dessous. Il faut constamment opérer de manière aseptique (voir p. 26).

1. Recueillir un échantillon d'eaux résiduaires dans un flacon stérile de 100 ml à bouchon vissé.
2. Plonger la pince à membrane filtrante dans de l'éthanol et la passer dans la flamme du bec Bunsen. En se servant de la pince ainsi stérilisée, garnir d'un tampon absorbant stérile une série de trois boîtes de Petri stériles.
3. Avec une pipette stérile de 5 ou 10 ml, déposer aseptiquement 1,8 ml de bouillon stérile au laurylsulfate pour membrane sur chacune des trois boîtes de Petri, de façon à saturer le tampon absorbant (mais sans le submerger) (Fig. 17).
4. Plonger la pince à membrane filtrante dans de l'éthanol et la passer dans la flamme du bec Bunsen. Déposer de manière aseptique une membrane filtrante stérile sur l'unité de filtration sur membrane (Fig. 18).
5. Verser environ 20 ml de solution de Ringer stérile diluée au quart dans l'unité de filtration sur membrane (Fig. 19), puis 5 ml de l'échantillon d'eaux résiduaires en se servant d'une pipette stérile (Fig. 20).

Fig. 17
Addition de 1,8 ml de bouillon stérile au laurylsulfate pour membrane sur une boîte de Petri garnie d'un tampon absorbant stérile.

Fig. 18
Installation d'une membrane filtrante stérile sur l'unité de filtration sur membrane.

Fig. 19.
Addition d'environ 20 ml de diluant dans l'unité de filtration sur membrane.

Fig. 20.
Addition de 5 ml d'échantillon dans l'unité de filtration sur membrane.

Fig 21.
Utilisation d'une pompe à vide manuelle pour aspirer l'échantillon à travers la membrane filtrante.

6. Brancher la pompe à vide puis, lorsque tout le liquide s'est écoulé à travers la membrane filtrante, débrancher ; on peut également se servir d'une pompe à vide manuelle (Fig. 21).

7. Déposer aseptiquement la membrane filtrante sur une boîte de Petri stérile garnie d'un tampon absorbant tout juste saturé de bouillon stérile au laurylsulfate pour membrane. Le mieux est d'opérer en déroulant la membrane sur la boîte pour empêcher la formation de bulles d'air entre la membrane et le tampon (Fig. 22).

8. Recommencer deux fois les étapes 4-7.

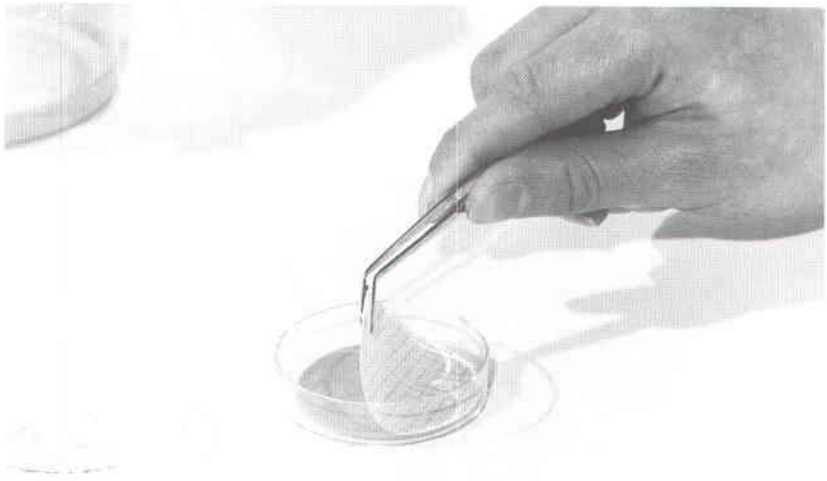

Fig. 22.
Déposer la membrane filtrante sur un tampon absorbant saturé de bouillon au laurylsulfate pour membrane, en la déroulant progressivement.

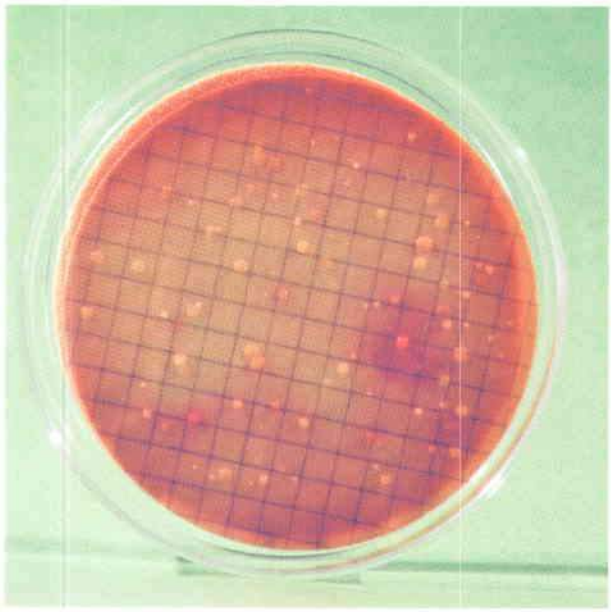

Fig. 23.
Après incubation à 44 °C pendant 24 h, compter les colonies jaunes visibles sur la membrane filtrante. Dans le cas présent, il y en a 40 ; comme c'est le nombre trouvé dans un volume de 5 ml (volume filtré), la teneur correspondante en coliformes fécaux est de 800 germes pour 100 ml.

9. Après les avoir retournées, mettre les trois boîtes de Petri dans un incubateur maintenu à 44 °C (± 0,5 °C).

10. Après incubation pendant 24 h, compter les colonies de couleur jaune visibles sur chacune des trois membranes filtrantes, quelles qu'en soient les dimensions (Fig. 23). (Les coliformes fécaux fermentent le lactose contenu dans le bouillon au laurylsulfate pour membrane en donnant naissance à un acide qui fait virer du rouge au jaune le phénol indicateur de pH. Calculer la moyenne des trois nombres observés et, comme ces colonies se rapportent à un volume de 5 ml (volume filtré), multiplier le résultat par 20 pour obtenir le nombre de coliformes fécaux par 100 ml.

11. Si le nombre de colonies dépasse la centaine sur chaque membrane filtrante, prendre une quantité d'échantillon (ou d'une de ses dilutions, voir p. 27) plus faible, car la numération devient alors délicate. C'est ainsi qu'on peut utiliser 1 ml d'échantillon tant que le nombre de coliformes fécaux ne dépasse pas 10 000 pour 100 ml, 1 ml de dilution à 1:10 s'il est plus élevé mais sans dépasser 100 000 pour 100 ml, et ainsi de suite.

3.3 Techniques de laboratoire de base

Asepsie

Il faut veiller spécialement à ne pas contaminer l'échantillon d'eaux résiduaires (ou une dilution de cet échantillon) pendant l'examen. Il est en effet indispensable d'avoir la certitude que seuls sont comptés les coliformes fécaux contenus dans l'échantillon, à l'exclusion des germes qui pourraient se trouver à la surface de la verrerie ou sur les doigts de l'opérateur. Il faut donc stériliser systématiquement avant emploi (voir plus loin) la verrerie, les milieux et les diluants (solution saline ou solution de Ringer diluée au quart), ainsi que les membranes filtrantes et les tampons absorbants. Cependant, la stérilisation ne constitue qu'un des aspects de l'asepsie ; il faut en outre respecter les procédures aseptiques habituelles, rappelées ci-dessous :

1. Se laver soigneusement les mains avant de se mettre au travail au laboratoire.
2. Opérer dans une partie du laboratoire à l'abri de la poussière et des courants d'air, et sur une paillasse propre ; frotter cette dernière avec un tampon imbibé d'éthanol juste avant le début du travail.
3. Veiller à ne pas toucher la partie supérieure des flacons contenant un milieu ou un diluant stérile ou des flacons utilisés pour recueillir l'échantillon. De même, s'abstenir de toucher l'extrémité ou la moitié inférieure des pipettes stériles.
4. Au moment de l'ouverture d'un flacon (ou d'un tube à essais) contenant un milieu stérile, un diluant stérile ou l'échantillon, passer rapidement le col ouvert dans la flamme d'un bec Bunsen en tenant le bouchon du flacon (ou le tampon d'ouate du tube à essais) dans l'autre main (ne se servir que du petit doigt en l'enroulant autour du bouchon ou du tampon). De même, lorsqu'on retire une pipette de son emballage (ou récipient) stérile, la passer rapidement dans la flamme d'un bec Bunsen et veiller à ne pas en toucher l'extrémité ni à la laisser entrer en contact avec quoi que ce soit ; en cas de contact accidentel, jeter la pipette au rebut et utiliser une autre pipette stérile.
5. Le pipettage à la bouche est rigoureusement exclu. Toujours utiliser une micro-pompe aspirante pour pipette.

S'il n'existe aucune personne qualifiée en bactériologie dans le laboratoire, mieux vaut faire appel à un technicien d'un laboratoire d'analyses médicales qui pourra faire la démonstration des procédures aseptiques.

Stérilisation

Les tubes à essais contenant le milieu NPP, les flacons contenant du diluant et du milieu pour filtration sur membrane, ainsi que les membranes filtrantes et les tampons absorbants doivent tous être stérilisés à l'autoclave ou à l'autocuiseur (voir p. 27).

Les flacons à bouchon vissé utilisés pour le recueil de l'échantillon sont stérilisés au four à 160 °C pendant 1 h. Pendant la stérilisation, le bouchon doit être légèrement dévissé (pour laisser l'air s'échapper, sinon le flacon exploserait) ; une fois la stérilisation terminée et la température du four retombée à la température ambiante, retirer les flacons, revisser les bouchons à fond et coller à la partie supérieure de chaque flacon une courte bande de ruban adhésif (portant de préférence l'indication STÉRILE).

Il faut également stériliser les pipettes au four à 160 °C pendant 1 h. Avant la stérilisation, obturer l'extrémité supérieure de chaque pipette avec un tampon d'ouate non hydrophile. Envelopper ensuite les pipettes dans une feuille d'aluminium, soit une par une, soit par groupes de cinq au maximum ; une marque doit être faite du côté des extrémités supérieures (pour éviter que l'emballage soit ouvert de l'autre côté et que les extrémités inférieures des pipettes soient contaminées).

Préparation et stérilisation du milieu

Ces opérations comportent les étapes suivantes :

1. Peser tous les produits chimiques nécessaires à la préparation du milieu (se reporter p. 17 et p. 22, respectivement, pour la composition du milieu A-1 et du bouillon au laurylsulfate pour membrane) ou le cas échéant, la quantité voulue de bouillon au laurylsulfate pour membrane déshydraté. Compléter au volume requis avec de l'eau distillée et laisser dissoudre entièrement. (Il n'est pas toujours judicieux de préparer à l'avance 1 litre de milieu, car, après stérilisation, il faut le conserver à moins de 10 °C dans l'obscurité et l'utiliser dans les trois mois.)

2. Répartir le milieu en flacons ou en tubes à essais avant stérilisation. Pour le milieu A-1, en mettre 5 ml par tube à essais ou par flacon à bouchon vissé contenant un tube de Durham inversé; dans le premier cas, les tubes doivent être obturés avec un tampon d'ouate non hydrophile. Pour le bouillon au laurylsulfate de sodium pour membrane, en mettre de petites quantités dans des flacons à bouchon vissé (6 ml suffisent pour l'examen d'un échantillon) (voir p. 23, étape 3). Préparer le diluant, soit en dissolvant un comprimé de solution de Ringer diluée au quart dans 500 ml d'eau distillée, soit en dissolvant 8,5 g de NaCl dans 1 litre d'eau distillée (ou selon les mêmes proportions pour un plus faible volume). Répartir le diluant en fractions de 9 ml dans des flacons à bouchon vissé (pour la préparation des dilutions décimales – voir ci-après) ou en fractions de 100 ml pour le diluant destiné à la filtration sur membrane (voir p. 23, étape 5).

3. Une fois achevées la répartition du milieu et celle du diluant, stériliser à l'autoclave ou à l'autocuiseur comme suit :

   - milieu A-1 et bouillon au laurylsulfate pour membrane : 115 °C, 67 kPa, pendant 10 minutes une fois terminée la montée en température et en pression;

   - solution de Ringer diluée au quart ou solution de NaCl : 121 °C, 101 kPa, pendant 15 minutes une fois terminée la montée en température et en pression.

4. Autoclaver les flacons en laissant le bouchon à moitié dévissé (pour éviter une explosion); après stérilisation et lorsque les flacons sont revenus à la température ambiante, visser les bouchons à fond. Dans l'attente de leur utilisation, conserver les flacons à l'abri de la poussière en y apposant une étiquette portant la mention « stérile ».

Préparation d'une série de dilutions décimales

Des dilutions sont utilisées aussi bien dans la méthode A que dans la méthode B de calcul du NPP (voir pp. 18, 20) et peuvent l'être dans la méthode de numération sur membrane filtrante (voir p. 25, étape 11). On procédera comme suit :

1. Avec une pipette stérile de 1 ml, transvaser de manière aseptique 1 ml d'échantillon d'eaux résiduaires dans un tube à essais ou un flacon stérile contenant 9 ml de diluant. Agiter vigoureusement. On obtient ainsi une dilution à 1:10.

2. Avec une nouvelle pipette stérile de 1 ml, transvaser 1 ml de la dilution à 1:10 dans un second tube à essais ou flacon stérile contenant 9 ml de diluant. Agiter vigoureusement. On obtient ainsi une dilution à 1:100.

3. Recommencer l'étape 2 selon les besoins, en transvasant chaque fois 1 ml de la dernière dilution dans un autre tube à essais ou flacon contenant 9 ml de diluant. On obtient ainsi une série de dilutions décimales plus poussées, à 1:1000 puis 1:10 000, etc. (Pour l'utilisation de ces échantillons extrêmement dilués, ne pas oublier que les eaux résiduaires non traitées renferment habituellement 10^7-10^9 coliformes fécaux par 100 ml).

Incubation

Les coliformes fécaux sont incubés à 44 °C (± 0,25 °C). Il est préférable d'utiliser un incubateur ventilé (sans ventilation, il est en effet difficile d'obtenir une température uniforme dans tout l'appareil, alors qu'il est très important que l'incubation se fasse à une température très proche de la température de consigne de 44 °C), encore qu'on puisse se servir d'un bain-marie pour les tubes à essais utilisés dans les méthodes NPP.

Après incubation et examen des échantillons, il faut autoclaver 15 min à 121 °C tous les tubes à essais ou flacons à bouchon vissé contenant du milieu et toutes les boîtes de Petri garnies d'une membrane filtrante et d'un tampon absorbant, avant de les mettre au rebut, de façon à les stériliser en détruisant les milliards de bactéries qui ont poussé pendant l'incubation.

4. Programmes de surveillance régulière

Le nombre de coliformes fécaux dans l'effluent à la sortie d'une installation de traitement des eaux résiduaires est beaucoup moins variable dans le temps (même sur 24 h) que celui des œufs d'helminthes. On a vu au tableau que les critères recommandés pour les coliformes fécaux et les œufs d'helminthes sont d'un ordre de grandeur très différent (1000 coliformes fécaux pour 100 ml, contre 1 œuf par litre), de sorte que les variations numériques que les programmes de surveillance régulière cherchent à mettre en évidence sont très différentes dans les deux cas. Une concentration moyenne de 2 œufs d'helminthes par litre peut appeler des mesures immédiates, alors qu'il n'en va pas de même quand le nombre de coliformes fécaux pour 100 ml atteint 1002 ou même 1020 (dans le cas de bactéries, l'ordre de grandeur importe beaucoup plus que le nombre effectif). Cet écart (1000 pour 100 ml, contre 1 par litre) et les modalités différentes de l'élimination des coliformes et des œufs dans les installations de traitement des eaux résiduaires, expliquent que les programmes de surveillance régulière ne soient pas absolument identiques dans les deux cas.

4.1 Coliformes fécaux

A la saison où l'on irrigue les champs, il faut prélever au moins une fois, et de préférence deux fois, par semaine, un échantillon unique de l'effluent final destiné à une irrigation non réglementée pour y dénombrer les coliformes fécaux. L'heure du prélèvement sera fixée sur la base de quelques études conduites sur le nycthémère, comme suit :

1. Sur une durée de 24 h, prélever un échantillon toutes les 3 h (huit échantillons au total) et compter le nombre de coliformes fécaux dans chacun d'eux, soit $N_1, N_2, \ldots, N_8$.
2. Calculer le nombre géométrique sur 24 h selon la formule :

   Nombre moyen géométrique = $N_1 \times N_2 \times \ldots \times N_8)^{1/8}$
3. Repérer, parmi les nombres obtenus aux différentes heures, celui qui se rapproche le plus de la moyenne et choisir l'heure correspondante (généralement entre 8 et 10 heures du matin) pour le prélèvement régulier d'échantillons. Comme on procède à l'échantillonnage pendant toute la période d'irrigation, on calculera la moyenne géométrique mobile au moyen de la formule ci-dessous :

   Moyenne géométrique mobile = $(N_1 \times N_2 \times \ldots \times N_n)^{1/n}$

   C'est cette valeur qui ne doit pas dépasser 1000.

4.2 Œufs d'helminthes

Heure du jour

La concentration des œufs des helminthes parasites de l'homme dans les eaux résiduaires est extrêmement variable sur 24 h. Quand la surveillance s'exerce sur des eaux non traitées, il est donc important de prélever soit une série d'échantillons sur 24 h, soit un seul échantillon mais à condition qu'il soit représentatif grâce à l'application de la méthode décrite

sous 4.1. Dans le cas des œufs d'helminthes, mieux vaut utiliser la moyenne arithmétique que la moyenne géométrique : moyenne arithmétique mobile : $(N_1 + N_1 + \ldots + N_n)/n$

Les variations journalières du nombre d'œufs d'helminthes sont moins importantes dans l'effluent à la sortie d'une installation de traitement (surtout s'il s'agit d'un bassin de stabilisation).

Fréquence de l'échantillonnage

Elle dépend des objectifs du système de surveillance et de la technique de traitement des eaux résiduaires. Dans n'importe quelle installation, il faut procéder à une étude sur le nycthémère (24 h) et à des échantillonnages fréquents (une ou deux fois par semaine) pendant plusieurs semaines à la période initiale.

Dans les bassins de stabilisation, l'élimination des œufs d'helminthes se fait à vitesse relativement constante, malgré les surcharges et les variations de débit périodiques ; cet échantillonnage préliminaire devrait donc donner une bonne idée de la qualité de l'effluent à long terme. Dans les installations de traitement classiques, l'élimination des œufs se fait en général à un rythme beaucoup plus inégal, de sorte que la surveillance doit être renforcée de façon à couvrir une large gamme de conditions de marche.

Après cet échantillonnage préliminaire, la fréquence de l'échantillonnage dépend de la façon dont l'effluent est utilisé, pour une irrigation réglementée ou non. Si les eaux résiduaires sont traitées dans des bassins de stabilisation et utilisées pour une irrigation non réglementée (catégorie A du Tableau 1), un ou deux échantillons par mois suffisent, car la durée de séjour dans le bassin nécessaire pour atteindre la norme concernant les coliformes est nettement supérieure à celle qui permet d'atteindre la norme relative aux œufs. En revanche, avec une autre technique de traitement ou si les eaux résiduaires sont destinées à une irrigation réglementée (catégorie B, Tableau 1), il faut prélever au moins un échantillon par semaine. La surveillance doit s'exercer régulièrement pendant toute la période d'utilisation de l'effluent pour l'irrigation.

Nombre d'échantillons

Si l'on veut connaître les variations dans le temps du nombre d'œufs par litre, il faut prélever chaque fois plusieurs échantillons. Un minimum de trois échantillons semble souhaitable. Le nombre exact dépend de la plus faible différence vraie qu'on souhaite mettre en évidence et du niveau de signification désiré, ce que décrivent la plupart des manuels de statistiques (voir par exemple, Sokal & Rohlf, 1981).

Bibliographie

American Public Health Association (1995) *Standard methods for the examination of water and wasterwater*, 19e éd., Washington, DC.

Ayres R.M. et al. (1991) Comparison of techniques for the enumeration of human parasitic helminth eggs in treated wastewater. *Environmental technology*, **12** : 617-623.

Bailenger J. (1979) Mechanisms of parasitological concentration in coprology and their practical consequences. *Journal of American medical technology*, **41** : 65-71.

Bouhoum K., Schwartzbrod J. (1989) Quantification of helminth eggs in wastewater. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin*, **188** : 322-330.

Department of the Environment (1994) *The microbiology of water 1994 – Part I. Drinking water*. Londres, Her Majesty's Stationery Office.

Faust E.C. et al. (1938) A critical study of clinical laboratory technics for the diagnosis of protozoan cysts and helminth eggs in feces. *American journal of tropical medicine and hygiene*, **18** : 169-183.

International Reference Centre for Waste Disposal (1985) Health aspects of wastewater and excreta use in agriculture and aquaculture : the Engelberg report. *IRCWD news*, No. 23, pp. 11-18.

Janeckso A., Urbanyi L. (1931) Méthode d'enrichissement coprologique. *Revue générale de médecine vétérinaire*, **41** : 496-497.

Organisation mondiale de la Santé (1989) *L'utilisation des eaux usées en agriculture et en aquiculture : recommandations à visées sanitaires*. Genève (OMS, Série de Rapports techniques, N° 778).

Prost A. (1988) Revision of the 1973 WHO guidelines : a WHO Scientific Group proposes revised health guidelines for the use of wastewater. *IRCWD News*, No. 24/25, p. 11.

Rude R.A., Peeler J.T., Risty N.G. (1987) Comparison of diethyl ether and ethyl acetate as extracting agents for recovery of *Ascaris* spp. and *Trichuris* spp. eggs. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **70** : 1000-1002.

Shuval H.I. et al. P. (1986) *Wastewater irrigation in developing countries : health effects and technical solutions*. Washington, DC, Banque mondiale (Technical Paper No. 51).

Sokal R.R., Rohlf F.J. (1981) *Biometry*. New York, W.H. Freeman and Co.

Thienpont E., Rochette F., Vanparijs O.F.J. (1986) *Diagnosing helminthiasis by coprological examination* (document non publié, disponible sur demande auprès de la Janssen Research Foundation, Turnhoutsebaan 30, 2340 Beerse, Belgique).

Pour en savoir plus

Recyclage des eaux résiduaires

Mara D.D., Cairncross S. (1991) *Guide pour l'utilisation sans risques des eaux résiduaires et des excreta en agriculture et aquaculture : mesures pour la protection de la santé publique.* Genève, Organisation mondiale de la Santé.

Parasitologie et bactériologie de l'assainissement

Berk S.G., Gunderson J.H. (1993) *Wastewater organisms : a color atlas.* Boca Raton, FL, Lewis Publishers.

Cheeseborough M. (1987) *Medical laboratory manual for tropical countries*, Vols I and II. Sevenoaks, Butterworth.

Jeffry H.C., Leach R.M. (1975) *Atlas of medical parasitology and protozoology.* Edingbourg, Churchill Livingstone.

Organisation mondiale de la Santé (1995) *Planches pour le diagnostic des parasites intestinaux*, Genève.

Peters W., Giles H.M. (1989) *A colour atlas of tropical medicine and parasitology*. Londres, Wolfe Publishing.