

Préparatifs avant une mise en culture de bactéries

Avant de commencer les manipulations, il faut s'assurer d'avoir un kit complet. Le kit Del Agua comprend :

- Un dispositif de filtration complet c'est-à-dire :
 - Un disque de bronze
 - 2 joints en silicone
 - Une pompe type presseur
 - Un contenant, ainsi que son fermoir avec son anneau en caoutchouc
 - Un cylindre avec 2 graduations (50 et 100ml) avec son système de fermoir
 - Des disques de filtration (45 microns)
- Les équipements pour la culture de bactéries tels que :
 - Des boîtes de pétri (minimum 16) avec le disque métallique
 - Des tampons pour recevoir la solution nutritive
 - Une boîte de Lauryl sulfate en poudre 38.1g pour 500ml (solution nutritive)
 - Des récipients de 50ml pour conserver la solution nutritive
 - Des pipettes à usages uniques
 - Une pince
- Les équipements nécessaires pour le dispositif de chauffage :
 - Le dispositif de chauffage avec ses pinces et son chargeur
 - Un couvercle fermé pour la chauffe des boîtes de pétri
 - Un couvercle ouvert pour la calibration
 - Un thermomètre pour vérifier la calibration (entre 43,5 et 44,5°C)
- Les équipements pour s'assurer contre les contaminations extérieures :
 - Une bouteille de méthanol (ou alcool 95°)
 - Une cocotte minute
 - De l'eau de javel
 - Du sopalin
 - Des gants plastiques à usage unique
 - Des sachets avec zip

Avant toutes manipulations il faut s'assurer de la stérilisation de certains éléments à l'aide d'une cocotte minute. Il faudra compter 15 minutes de stérilisation dès le premier sifflement de la cocotte. Ces éléments sont :

- L'ensemble des boîtes de pétri avec le cadre métallique
- Le récipient avec la solution nutritive sans serrer le bouchon
- Les bords pour le prélèvement des échantillons

Pour la stérilisation du bloc de filtration il faut assembler toutes les pièces, verser une petite quantité de méthanol dans le contenant (une dizaine de gouttes), enflammer le liquide et attendre quelques secondes avec de le couvrir avec le fermoir à l'envers. C'est le gaz créé par la combustion du méthanol qui sert à stériliser le dispositif. **A défaut de méthanol, le livret du kit del agua propose de bouillir l'ensemble du matériel dans de l'eau pendant minimum 15 minutes.**

Adaptation pour les programmes en Haïti – Samory Pierre – Juin 2017 Page 1 sur 7



Réseau PRATIQUES

Partages d'expériences et de méthodes pour améliorer les pratiques de développement
<http://www.interaide.org/pratiques>

Protocole d'utilisation du Kit Del Agua pour analyses bactériologiques de l'eau

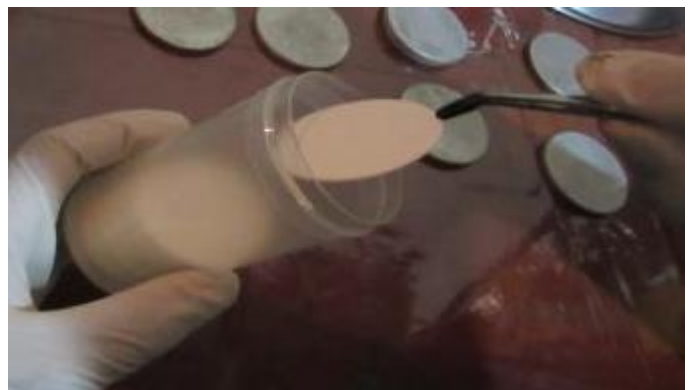
Une fois le matériel stérilisé, il convient de le stocker dans des sachets hermétiques afin de le **protéger de toutes contaminations éventuelles**. Il faut aussi aménager une surface de travail assez grande pour avoir tous les éléments à portée de main durant les manipulations. **Le prélèvement de l'eau à tester doit ce faire au maximum une heure avant l'analyse**, sans quoi les résultats de coliformes risquent d'être biaisés.

Remarque :

Une stérilisation trop fréquente des matériaux plastiques du dispositif de filtration à l'aide de l'eau bouillante ou par une cocotte, entraîne un vieillissement prématuré de ces derniers et peut même déformer le système de fermoir du cylindre gradué. C'est pour cela qu'un **nettoyage minutieux avec de l'alcool 95°** a été adopté par la suite.

Manipulations expérimentales

- **Etape 1 : Préparation des boîtes de pétri**



Stérilisation de la pince avec une bougie avant le prélèvement d'un tampon pour le mettre dans la boîte de pétri.



Protocole d'utilisation du Kit Del Agua pour analyses bactériologiques de l'eau



Imbiber le milieu de culture avec la solution nutritive jusqu'à saturation à l'aide d'une pipette. **Ne pas laisser de bulles d'air.**

- **Etape 2 : Filtration des échantillons**

Pour tester la neutralité de la solution nutritive dans le décompte des colonies, il faut au préalable faire un blanc de solution et déposant juste un filtre sur un milieu de culture sans aucune filtration au préalable. Durant la lecture des résultats, ce test ne devra jamais contenir de colonie afin de valider le bon conditionnement de la solution nutritive. Un blanc avec de l'eau potable non chlorée devra lui aussi être réalisé pour tester la stérilisation du dispositif de filtration. A défaut d'une eau non chlorée, une eau quelconque non turbide peut être aussi utilisée en la faisant bouillir durant 10 minutes et en la laissant se refroidir dans un bocal stérilisé.

Le processus de filtration est expliqué dans les illustrations suivantes.



Protocole d'utilisation du Kit Del Agua pour analyses bactériologiques de l'eau



Placer au préalable le dispositif de filtration sur une assiette afin d'éviter de contaminer les boîtes de pétri avec des éclaboussures. Passer la pince sous une bougie avant de sortir le filtre de son emballage (disque blanc) puis la placer sur le disque en bronze.



Remettre le cylindre sur le dispositif en s'assurant de ne pas abimer le filtre en serrant. Il faut s'assurer qu'il n'y a aucune fuite avant de procéder à la filtration. Pour démarrer cette étape il suffit d'appuyer sur la pompe jusqu'à remarquer une baisse du liquide dans le cylindre. Attention, **ne pas forcer ce processus** en appliquant trop de vide dans le dispositif sous peine d'endommager les bactéries.



Protocole d'utilisation du Kit Del Agua pour analyses bactériologiques de l'eau



Prélever délicatement le filtre avec une pince stérile avant de le déposer sur le milieu de culture tout en évitant de créer des bulles d'air entre ces deux couches. Refermer la boîte de pétri et inscrire le nom de l'échantillon testé. On peut tester **jusqu'à 4 solutions** avant de devoir vider le contenant.



Protocole d'utilisation du Kit Del Agua pour analyses bactériologiques de l'eau

- **Etape 3 : Mise en incubation**

Après l'étape de filtration finie il faut compter au minimum 30 minutes depuis la dernière filtration afin de laisser les bactéries récupérer du stress causé par cette étape. Pendant ce laps de temps il faut allumer le kit del agua pour qu'il débute son processus de chauffage.



Une fois l'incubateur chauffé à environ 44°C, c'est à dire quand le voyant de chauffe s'éteint, on peut mettre l'ensemble des 16 boîtes de pétri liées par le cadre métallique dans le kit. Il est important de bien mettre 16 boîtes de pétri même si on en utilise moins car le kit est étudié afin garantir une chauffe uniforme pour 16 boîtes.

- **Etape 4 : Lecture des résultats**

Après 18 h d'incubation il faut éteindre l'incubateur et procéder au comptage des colonies. Ne pas trop attendre car les colonies peuvent grossir et ou changer de couleur ce qui rend la lecture plus difficile.



Protocole d'utilisation du Kit Del Agua pour analyses bactériologiques de l'eau

Pour le comptage des coliformes fécaux, il faut uniquement prendre les colonies jaunes avec un diamètre supérieur à 1 millimètre. Il faut aussi bien regarder si plusieurs colonies sont collées afin de comptabiliser chacune d'elles.

Après la lecture des résultats, il est déconseillé de conserver les colonies afin de limiter les risques de contaminations. Pour détruire les colonies, une incinération ou verser une solution concentrée de chlore peut suffire. Il faut ensuite nettoyer et sécher l'ensemble des boîtes de pétri et du dispositif de filtration afin d'éviter la corrosion du matériel.

AVIS IMPORTANT

Les fiches et récits d'expériences « Pratiques » sont diffusés dans le cadre du réseau d'échanges d'idées et de méthodes entre les ONG signataires de la « charte Inter Aide ».

Il est important de souligner que ces fiches ne sont pas normatives et ne prétendent en aucun cas « dire ce qu'il faudrait faire »; elles se contentent de présenter des expériences qui ont donné des résultats intéressants dans le contexte où elles ont été menées.

*Les auteurs de « Pratiques » ne voient aucun inconvénient, au contraire, à ce que ces fiches soient reproduites **à la condition expresse que les informations qu'elles contiennent, soient données intégralement y compris cet avis.** Si elles sont citées, la source (Réseau Pratiques) et les auteurs doivent être mentionnés intégralement.*

