

Fondation Nationale de la Santé

MANUEL PRATIQUE D'ANALYSE DE L'EAU

4^{ème} édition



Fondation
Nationale
de la Santé

Fondation Nationale de la Santé

**Manuel Pratique
d'Analyse de l'Eau**
4^{ème} édition

Brasilia, 2013

Copyright © 2004 Fondation nationale de la santé

Tous droits réservés. La reproduction ou la partie de ce travail, tant que la source et ce n'est pas à la vente ou à des fins commerciales.

La responsabilité de copyright textes et images de ce travail est la zone technique. Le ministère de la Santé institutionnelle peut être consulté dans son intégralité à la bibliothèque

Ministère de la Santé virtuelle de la Santé: <http://www.saude.gov.br/bvs>

Le contenu de cette œuvre et d'autres de l'Éditeur du ministère de la Santé peut être consulté sur la page: <http://www.saude.gov.br/editora>

Dessin: 4ème édition – 2013 – 2.000 copies de préparation, de distribution et d'information:

MINISTÈRE DE LA SANTÉ

Fondation Nationale de la Santé

Département de santé environnementale

Contrôle et Coordination de la qualité de l'eau

Secteur des municipalités du Sud, bloc 4, bloc N, 9e étage, aile sud

CEP: 70070-040, Brasília – DF Tél: (61) 3314-6670/6396

Page d'accueil: <http://www.funasa.gov.br>

Editeur:

Coordination de la Communication Sociale

Division de l'édition et des médias Réseau

Secteur des municipalités du Sud, bloc 4, bloc N, 2e étage, aile nord

CEP: 70070-040, Brasília – DF

Page d'accueil: <http://www.funasa.gov.br>

Imprimé au Brésil

Fiche Catalographique

Brésil. Fondation Nationale de la santé

Manuel pratique d'analyse de l'eau/National Health Foundation – 4. ed. – Brasília : FUNASA, 2013.

150 p.

ISBN

1. Analyse de l'eau. 2. Contrôle de la qualité de l'eau. 3. Consommation d'eau (santé environnementale). I. Titre. II. Série.

CDU 628

Titres par indexation:

En anglais: Practical manual on water analysis

En espagnol: Manual práctico de análisis de agua

Sommaire

Présentation	5
Examen bactériologique de l'eau	7
– Introduction	9
– Les bactéries coliformes	11
– Matériel utilisé en bactériologie	13
– Préparation du matériel en verre	14
– Préparation des milieux de culture	15
– Comment faire pour utiliser l'eau de dilution pour la détermination du NPP de coliformes	17
– Prélèvement d'échantillons d'eau pour les examens bactériologiques	18
– Procédures d'examen	21
– Les coliformes totaux	21
– Coliformes thermotolérants	26
– Comptage des bactéries hétérotrophes	28
– Coliformes totaux	29
– Coliformes thermotolérants	32
– Coliformes totaux et <i>Escherichia coli</i>	36
– Stérilisation	38
Analyses physico-chimiques de l'eau	41
– Analyses Titrimétriques	43
– Gaz carbonique libre	46
– Chlorures	48
– La dureté totale	51
– pH	54
– Analyses colorimétriques	56
– Le chlore résiduel libre	56
– Couleur	57
– Aluminium	59

- Turbidité.....	63
- Température	67
- Les Fluorures	68
- Prélèvement et conservation des échantillons pour les analyses physico-chimiques.....	74
- Essai de coagulation (<i>Jar-Test</i>).....	75
- Correction du pH de l'eau traitée	79
- Détermination de la teneur de chlore actif dans une solution de chlore (hypochlorite de sodium et hypochlorite de calcium).....	81
Préparation des Réactifs Utilisés dans les Analyses	
Constantes dans ce Manuel	83
– Réactifs pour l'alcalinité	85
– Réactifs pour CO ₂	87
– Réactifs pour l'analyse de chlorures	89
– Réactifs pour l'analyse de la dureté.....	91
– Réactifs pour l'analyse de l'aluminium.....	94
– Réactifs pour l'analyse de fluorures	96
– Règles générales pour corriger les solutions titrées	99
– Relation de matériels de laboratoire d'analyse de l'eau.....	102
– La biosécurité en laboratoire	107
Annexe A – Collecte et conservation d'échantillons pour Comptage des cellules de cyanobactéries et cyanotoxines	111
Annexe B – Détermination du <i>Giardia sp</i> et du <i>Cryptosporidium sp</i> dans l'eau par la technique de filtration, de séparation immunomagnétique et de microscopie de l'immunofluorescence	119
Bibliographie.....	143
Elaboration.....	147

Présentation

Ce manuel, rédigé de façon et en langage simple, vise à aider les personnes qui travaillent les laboratoires de contrôle de qualité des installations de traitement d'eau pour les petites et moyennes entreprises, à développer leurs activités quotidiennes.

L'idée est venue de la nécessité de disposer d'un instrument dans le laboratoire de recherche qui pourrait accompagner les pas des techniciens à chaque instant et dans n'importe où.

Dans ce manuel sont décrites les procédures les plus courantes qui sont réalisées en routine dans le laboratoire d'une station de traitement de l'eau (ETA). Toutes les techniques utilisées dans ce manuel répondent à l'article 22 du Décret n° 2.914/2011 du Ministère de la Santé, qui est en accord avec les standards nationaux et internationaux les plus récents, telles que I) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, d'autorité parmi les institutions *American Public Health Association (APHA)*, *American Water Works Association (AWWA)* et *Water Environment Federation (WEF)*; II) *United States Environmental Protection Agency (EPA)*, III), standards publiées par *l'International Standardization Organization (ISO)*; ainsi que des méthodologies proposées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS). Chaque procédure abordée ici nécessitant une connaissance plus approfondie, doit faire l'objet d'une consultation des principaux manuels traitant du sujet.

La première partie de l'ouvrage aborde les examens bactériologiques comprenant la recherche de coliformes totaux et thermo-tolérants, dont l'*Escherichia coli* ainsi que le comptage standard des bactéries hétérotrophes, jusqu'à la préparation du matériel utilisé, passant par la réalisation d'essais

jusqu'à l'obtention de résultats. Dans la deuxième partie sont décrites les techniques d'analyses physico-chimique ainsi que les tests de routine d'un ETA et enfin la préparation de tous les réactifs utilisés. Ont également été incluses quelques procédures de biosécurité en laboratoire, ainsi que la liste des équipements et matériels de laboratoire.

L'annexe I présente les techniques de collecte et de conservation des échantillons pour le comptage des cellules de cyanobactéries et cyanotoxines. Dans l'Annexe II est décrite la technique de détermination du *Giardia* et du *Cryptosporidium* sp dans l'eau par la technique de filtration, de séparation immuno-magnétique et de microscopie immuno-fluorescence.

Nous pensons que les paramètres décrits ici sont suffisants pour surveiller le contrôle de la qualité de l'eau distribuée pour la consommation humaine.

L'examen de l'eau destinée à la consommation humaine est d'une importance capitale, car elle mesure l'absence ou non de micro-organismes ou de produits chimiques présents dans l'eau, ce qui peut être nocif pour la santé des gens.

Examen bactériologique de l'eau

Coliformes totaux

Coliformes thermo-tolérants

Bactéries hétérotrophiques



Introduction

La détection et la quantification de tous les micro-organismes présents dans l'eau et potentiellement pathogènes prend du temps, les coûts sont élevés et les résultats obtenus ne sont pas toujours positifs ou ne permettent pas de confirmer la présence de micro-organismes.

L'objectif de l'examen microbiologique de l'eau est de fournir des informations quant à la potabilité, c'est à dire sans risque d'ingestion de micro-organismes qui causent des maladies, provenant généralement d'une contamination par des matières fécales humaines ou d'autres animaux à sang chaud. Soulignons que les micro-organismes présents dans les eaux naturelles sont pour la plupart inoffensifs pour la santé humaine. Mais dans la contamination par les eaux usées certains micro-organismes qui sont présents et peuvent être nocifs pour la santé humaine.

Ces micro-organismes pathogènes incluent notamment les virus, les bactéries, les protozoaires et les helminthes.

Dans ce tableau sont listées quelques maladies véhiculées par l'eau et ses agents

Maladies	Agents pathogènes
D'Origine bactérienne la Typhoïde et la paratyphoïde La dysenterie bacillaire le choléra la Gastro-entérite aiguë et la diarrhée	<i>Salmonelle typhique</i> <i>Salmonelle parathyphique A et B</i> <i>Shigella sp</i> <i>Vibrio cholerae</i> <i>Escherichia coli Entérotoxique</i> <i>Campylobacter</i> <i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Salmonelle</i> <i>Shigella sp</i>
D'Origine virale L'hépatite A et E La polio La Gastro-entérite aiguë et chronique	Virus de l'hépatite A et E Virus de la poliomyélite Virus Norwalk Rotavirus Enterovirus Adenovirus
D'Origine parasitaire dysenterie ambiennne parasite gastro-entérite	<i>Entamoeba histolytica</i> <i>Giardia lamblia</i> <i>Cryptosporidium</i>

Source: Opas, 1999

L'eau potable ne doit pas contenir de micro-organismes pathogènes et doit être libre de bactéries indicatrices de contamination fécale. Comme les indicateurs de contamination fécale, les bactéries du groupe coliformes sont choisies comme bactéries de référence. Le principal représentant de ce groupe de bactéries est appelé *Escherichia coli*.

La raison du choix de ce groupe de bactéries comme indicateur de contamination de l'eau est due aux facteurs suivants:

- a. On les trouve dans les excréments des animaux à sang chaud, y compris les humains;
- b. elles sont facilement détectables et quantifiables par des techniques simples et économiquement viables, sur n'importe quel type d'eau;
- c. Sa concentration dans l'eau contaminée a une relation directe avec le degré de contamination fécale de cette dernière;
- d. elle a la durée de survie la plus importante chez les bactéries pathogènes intestinales, car elles sont moins exigeantes sur le plan nutritionnel et sont incapables de se multiplier dans le milieu aquatique ou se multiplient moins que les bactéries entériques;
- e. Elles sont plus résistantes aux désinfectants et aux agents tensioactifs que les bactéries pathogènes.

Le décret n° 2.914/2011 du Ministère de la Santé (décret de potabilité) établit la nécessité d'être vérifié dans l'eau potable, pour assurer sa potabilité, l'absence de coliformes totaux et d'*Escherichia coli* d'après le comptage des bactéries hétérotrophes.

Le même décret prévoit que le comptage des bactéries hétérotrophes devra être effectué comme l'un des paramètres permettant d'évaluer l'intégrité du système de distribution (réservoir et réseau) devant être effectué dans 20% des échantillons mensuels de coliformes totaux dans les réseaux de distribution, recommandant qu'il ne devra pas dépasser 500 unités formatrices de colonies pour 1 ml d'échantillon (500 ufc/ml).

Afin de respecter le standard de qualité microbiologique de la potabilité, l'absence de coliformes totaux dans 100 ml d'échantillon à la sortie du traitement est obligatoire. Toutefois, conformément à l'annexe I du décret n° 2.914/2011 MS, on admet la présence de coliformes totaux dans seulement 1 échantillon mensuel pour des systèmes ou des solutions collectives qui approvisionnent moins de 20.000 habitants et dans 5% des échantillons mensuels des solutions collectives ou des systèmes qui approvisionnent plus de 20.000 habitants. Il est à noter que dans les deux cas la présence d'*Escherichia coli* dans l'eau potable n'est pas permise.

Les bactéries coliformes

Concepts:

- **les Coliformes totaux (bactéries coliformes)** – bacilles gram-négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, non sporulés, oxydase-négatifs, capables de développer en présence de sels biliaires ou d'agents tensio-actifs qui fermentent le lactose en produisant de l'acide, du gaz et de l'aldéhyde à $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 24-48 heures, et qui peuvent présenter une activité enzyme β – galactosité. La majorité des bactéries coliformes appartiennent au genre *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella* et *Enterobacter*, bien que plusieurs autres genres et espèces appartiennent également au groupe;

- **coliformes fécaux (thermo-tolérants)** – sous-groupe de bactéries coliformes qui fermentent le lactose à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ sous 24 heures, dont le principal représentant est la bactérie *Escherichia*, d'origine exclusivement fécale;
- ***Escherichia coli*** – bactérie du groupe coliforme qui fermente la lactose et le mannitol, produisant de l'acide et du gaz à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures, produit de l'indole à partir de tryptophane, oxydase négative, n'hydrolyse pas l'urée et présente les enzymes β galactosidase et la glucuronidase, et est considéré comme l'indicateur le plus précis de la contamination fécale récente et de présence éventuelle de micro-organismes pathogènes.

L'origine fécale de *E. coli* est incontestable et sa nature omniprésente peu probable, ce qui valide son rôle précis d'organisme indicateur de contamination tant dans les eaux naturelles que traitées.

Le comptage standard des bactéries est très important pendant le processus de traitement de l'eau, car il permet d'évaluer l'efficacité des différentes étapes de traitement.

Il est également important de connaître la densité des bactéries car une augmentation considérable de la population bactérienne peut nuire à la détection des organismes coliformes. Bien que la plupart de ces bactéries ne soit pas pathogènes, elles peuvent présenter des risques pour la santé, ainsi pour que la qualité de l'eau, provoquant des odeurs et saveurs désagréables.

Matériel utilisé en bactériologie

- a) autoclave;
- b) incubateur biologique;
- c) incubateur de stérilisation et de séchage;
- d) balance;
- e) distillateur;
- f) bain-marie;
- g) compteur de colonies;
- h) anse de platine avec câble;
- i) tube Durhan;
- j) tube à essai;
- k) milieux de culture;
- l) coton;
- m) flacons de collecte;
- n) pipettes graduées;
- o) pipeteur;
- p) papier aluminium;
- q) lampe à alcool ou bec Bunsen;
- r) boîtes de Pétri;
- s) pincettes en acier inoxydable;
- t) filtres à membrane;
- u) porte-filtres en verre ou en acier inoxydable;
- v) lampe à ultra-violet.

Préparation du matériel en verre

Tubes à essai

- a) placer le tube de Durham en position inversée à l'intérieur du tube à essai;
- b) boucher le tube à essai avec un tampon d'ouate.

Flacons de collecte

- a) mettre deux gouttes (0,1 ml) de thiosulfate de sodium à 10% dans le flacon;
- b) placer une bande de papier aluminium entre le goulot et le bouchon de la bouteille;
- c) envelopper le goulot et le bouchon dans du papier aluminium.

Pipettes

- a) mettre une petite boule de coton dans la buse de la pipette;
- b) l'envelopper dans du papier aluminium ou du papier kraft.

Boîtes de Pétri en verre

- a) les envelopper dans du papier d'aluminium ou du papier kraft.

Remarque: les flacons de collecte, les pipettes et les boîtes de Petri doivent être stérilisés et avant d'être préparés ils doivent être propres et secs (voir la stérilisation p 38.).

Milieux de culture

- a) Bouillon lactosé;
- b) Bouillon lactosé bilié au vert brillant à 2%;

- c) Bouillon EC;
- d) *Plate Count Agar*.

Préparation des milieux de culture

Bouillon lactosé à concentration double

- a) peser 26 grammes de milieu de culture et les dissoudre dans 1.000 ml d'eau distillée;
- b) répartir dans des tubes à essai (10 ml dans chaque tube), fermer les tubes;
- c) stériliser à 121°C (1 Kg/cm² de pression) en autoclave durant 15 minutes;
- d) laisser refroidir;
- e) garder au réfrigérateur (valable pendant une semaine).

Bouillon lactosé à concentration simple

- a) peser 13 grammes de milieu de culture déshydraté et les dissoudre dans 1.000 ml d'eau distillée;
- b) distribuer dans des tubes à essai (10 ml dans chaque tube), fermer les tubes;
- c) stériliser à 121°C (1 Kg/cm² de pression) en autoclave durant 15 minutes;
- d) laisser refroidir;
- e) conserver au réfrigérateur (valable pendant une semaine).

Bouillon lactosé bilié vert brillant à 2%

- a) peser 40 grammes de milieu de culture déshydraté et les dissoudre dans 1.000 ml d'eau distillée;

- b) répartir dans des tubes à essai (10 ml dans chaque tube), fermer les tubes;
- c) stériliser à 121°C (1 Kg/cm² de pression) en autoclave pendant 15 minutes;
- d) laisser refroidir;
- e) conserver au réfrigérateur (valable pendant une semaine).

Milieu EC

- a) peser 37,0 grammes de milieu déshydraté et les dissoudre dans 1000 ml d'eau distillée;
- b) répartir dans des tubes à essai dont le tube Durhan inversé, 10 ml dans chaque tube, fermer les tubes;
- c) stériliser à 121°C (1Kg/cm² de pression) en autoclave pendant 15 minutes;
- d) conserver au réfrigérateur (valable pendant 96 heures).

Plate Count Agar

- a) peser 20,5 grammes de milieu de culture déshydraté et les dissoudre dans 1000 ml d'eau distillée froide;
- b) laisser reposer pendant 5 minutes;
- c) chauffer en remuant fréquemment avec un bâton de verre jusqu'à la dissolution complète du milieu (ne pas porter à ébullition);
- d) si nécessaire, ajuster le pH à 7,0 avec de l'hydroxyde de sodium en solution normale (NaOH 1N);
- e) répartir dans des tubes à essai à bouchon à vis (12 ml dans chaque tube);
- f) stériliser à 121°C (1 Kg/cm² de pression) en autoclave pendant 15 minutes.

Remarques:

1. Ce milieu se solidifie après refroidissement. Fondre dans un bain-marie avant usage.
2. Dû à la variété des milieux de culture existant sur le marché, toujours suivre les instructions du fabricant qui sont imprimées sur l'étiquette du flacon.

Eau de dilution

Solution 1

- peser 34 grammes de phosphate de potassium monobasique (KH_2PO_4) et dissoudre dans 500 ml d'eau distillée, ajuster le pH à 7,2 avec une solution d'hydroxyde de sodium de solution 1N et diluer 1 litre avec de l'eau distillée. On a besoin normalement de 175 ml de NaOH 1N pour augmenter le pH.

Solution 2

- peser 81,1 grammes de chlorure de magnésium hexahydraté ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) et dissoudre dans 1 litre d'eau distillée

Solution 3

- mélanger 1,25 ml de la **solution 1** et 5 ml de la **solution 2** avec 1 litre d'eau distillée. Répartir dans des tubes à essai dans des quantités, qui, après l'autoclavage assurent un volume de $9 \pm 0,2$ ml.
- stériliser en autoclave à 121°C ($1\text{Kg}/\text{cm}^2$ de pression) pendant 15 minutes.

Comment faire pour utiliser l'eau de dilution pour la détermination du NPP de coliformes

- a) prendre 1 tube à essai contenant $9 \pm 0,2$ ml d'eau de dilution stérilisé;
- b) ajouter 1 ml d'échantillon d'eau à être examinée;

- c) bien mélanger. Quand la dilution est de 1:10;
- d) prélever de la dilution en haut, avec une pipette stérilisée, 1 ml et l'inoculer dans le tube contenant le bouillon lactosé à concentration simple (dilution 1:100).

Prélèvement d'échantillons d'eau pour les examens bactériologiques

Le prélèvement des échantillons est l'une des étapes les plus importantes pour l'évaluation de la qualité de l'eau. Il est donc essentiel que l'échantillonnage soit effectué avec prudence et de la technique afin d'éviter toutes les sources possibles de contamination.

Les échantillons doivent être prélevés dans des flacons en verre blanc, à haut évasé, avec un bouchon en verre rodé, d'une capacité de 125 ml, stérilisés au préalable ou dans des sacs plastiques stériles, jetables; contenant une pastille de thiosulfate de sodium.

Les flacons pour la collecte d'eaux chlorées doivent recevoir, avant d'être stérilisés, 0,1 mL (2 gouttes) de thiosulfate de sodium à 10%.

Procédure pour les prélèvements dans les maisons

- a) se laver les mains avec de l'eau et du savon;
- b) nettoyer le robinet avec un morceau de coton imbibé d'alcool à 70% et/ou avec de l'hypochlorite de sodium à 100mg/L;
- c) ouvrir le robinet et laisser couler l'eau pendant 1 ou 2 minutes;
- d) collecter l'échantillon d'eau;

- e) remplir environ au $\frac{3}{4}$ du volume;
- f) fermer le flacon et l'identifier en marquant l'adresse, l'heure, le nom du collecteur, etc.;
- g) marquer le flacon avec le numéro d'échantillon correspondant au point de collecte;
- h) remplir la fiche d'identification de l'échantillon d'eau;
- i) mettre le flacon contenant l'échantillon dans une caisse d'isopor avec de la glace;
- j) sceller, identifier et envoyer la caisse au laboratoire.

Le temps entre la collecte et l'examen de l'échantillon ne doit pas excéder 24 heures.

Note: En plus des maisons, les échantillons peuvent être collectés dans les hôpitaux, les écoles, les robinets publics, ainsi que tous les points considérés comme vulnérables. En cas d'utilisation d'hypochlorite de sodium pour la désinfection du robinet, il doit être retiré complètement avant la collecte d'eau.

Les différentes phases



Source: OMS, 1998 (adapté)

Autres endroits de collecte

Dans les stations de traitement, les échantillons peuvent être collectés dans la captation, à l'arrivée de l'eau brute avant le canal de Parshall, dans les carafes, à la sortie des filtres et des réservoirs d'eau traitée.

Procédures d'examen

Les coliformes totaux

Méthode des tubes multiples (TM)

Matériel nécessaire:

- a) tube à essai
- b) étagère pour tube à essai
- c) Tube Durhan
- d) pipette graduée de 10 ml
- e) pipette graduée de 1 ml
- f) bec Bunsen ou une lampe à alcool
- g) bouillon lactosé à double concentration
- h) bouillon lactosé à simple concentration.
- i) bouillon lactosé bilié vert brillant à 2%.
- j) eau de dilution
- k) anse de platine avec câble Kolle
- l) incubateur biologique

Exécution du test

Test présomptif

- a) prendre une batterie contenant 15 tubes à essai répartis de 5 en 5;
- b) inoculer avec une pipette stérilisée dans les 5 premiers tubes (ceux qui contiennent le bouillon lactosé

à concentration double) 10 ml d'échantillon d'eau à être examinée dans chaque tube. (Dilution 1:1);

- c) dans les 10 tubes restant (ceux qui contiennent le bouillon lactosé à concentration simple), inoculer dans les 5 premiers 1 ml d'échantillon (dilution 1:10) et dans les 5 derniers tubes, inoculer 0,1 ml d'échantillon dans chaque tube. (Dilution 1:100). Voir page 15;
- d) mélanger;
- e) incuber à $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ pendant 24/48 heures;
- f) si, après 24/48 heures, il y a formation de gaz dans le tube de Durham, cela signifie que le test présomptif a été positif. Dans ce cas, effectuer un test de confirmation. Si aucune formation de gaz n'a eu lieu au cours de l'incubation, l'examen se termine à ce stade et le résultat du test est négatif.

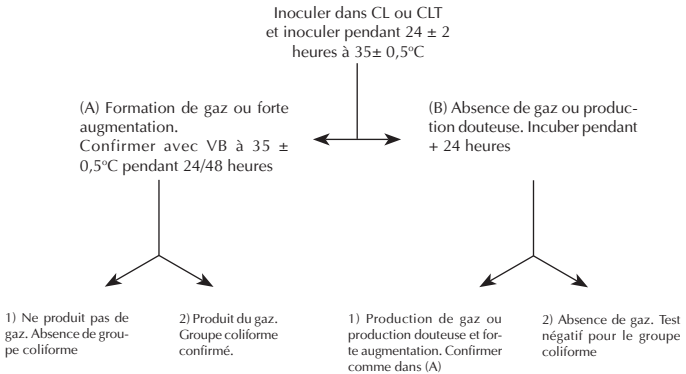
Observation: à la place du bouillon lactosé on peut utiliser du bouillon tryptose lauryl.

Test de confirmation

- a) prendre les tubes du test présomptif qui ont été positifs (qui ont formé du gaz) dans trois à 3 dilutions 1:1, 1:10 et 1:100;
- b) prendre un nombre égal de tubes contenant le milieu de culture bilié vert brillant à 2%;
- c) avec une anse de platine, précédemment flambée puis refroidie, retirer de chaque tube positif une partie de l'échantillon positif et inoculer dans le tube correspondant contenant le milieu vert brillant. Cette procédure est appelée «repiquage»;
- d) identifier les tubes;
- e) incuber pendant 24/48 heures à $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$;

- f) si à la fin de la période d'incubation de l'heure 24/48 on observe la formation de gaz dans le tube à essai Durham, le test est considéré comme positif. S'il n'y a pas de formation de gaz, le test est considéré comme négatif.

Phases du test



Note: CL = bouillon lactosé
CLT = bouillon tryptose lauryl
VB = bouillon bilié vert brillant à 2%

Expression des résultats

- a) Les résultats sont exprimés en NMP (nombre plus Probable)/100 ml d'échantillon.
- b) pour déterminer la NMP, on vérifie la combinaison formée par le nombre de tubes positifs qui présentent les dilutions 1:1, 1:10 et 1:100 dans le test de confirmation.

Exemple:

- a) Dans 5 tubes de dilution 1:01, on a obtenu 3 tubes positifs;
- b) dans 5 tubes de dilution 1:10, on a obtenu deux tubes positifs;
- c) dans les 5 tubes de dilution 1:100, on a obtenu un tube positif;
- d) la combinaison suivante s'est formée: 3-2-1;
- e) on détermine les N.M.P en consultant le tableau 1.

Si vous ne voulez pas travailler avec 15 tubes pour déterminer la NMP, faire seulement cinq tubes pour la dilution 1:1 (10 ml de milieu de culture + 10 ml d'échantillon) et calculer le NMP en consultant le tableau 2.

Tableau 1 – N.M.P. avec un taux de confiance de 95% pour les différentes combinaisons de résultats positifs lorsque 5 tubes sont utilisés pour chaque dilution (10 ml, 1,0 ml et 0,1 ml)

Combinaison de positifs	N.M.P./100 mL	Limites	
		Inférieur	Supérieur
0-0-0	< 2	-	-
0-0-1	2	1.0	10
0-1-0	2	1.0	10
0-2-0	4	1.0	13
1-0-0	2	1.0	11
1-0-1	4	1.0	15
1-1-0	4	1.0	15
1-1-1	6	2.0	18
1-2-0	6	2.0	18
2-0-0	4	1.0	17
2-0-1	7	2.0	20
2-1-0	7	2.0	21
2-1-1	9	3.0	24
2-2-0	9	3.0	25
2-3-0	12	5.0	29
3-0-0	8	3.0	24
3-0-1	11	4.0	29
3-1-0	11	4.0	29
3-1-1	14	6.0	35
3-2-0	14	6.0	35
3-2-1	17	7.0	40
4-0-0	13	5.0	38
4-0-1	17	7.0	45
4-1-0	17	7.0	46
4-1-1	21	9.0	55
4-1-2	22	12	63
4-2-0	26	9.0	56
4-2-1	26	12	65
4-3-0	27	12	67
4-3-1	33	15	77
4-4-0	34	16	80
5-0-0	23	9	86
5-0-1	30	10	110
5-0-2	40	20	140
5-1-0	30	10	120
5-1-1	50	20	150
5-1-2	60	30	180
5-2-0	50	20	170
5-2-1	70	30	210
5-2-2	90	40	250
5-3-0	80	30	250
5-3-1	110	40	300
5-3-2	140	60	360
5-3-3	170	80	410
5-4-0	130	50	390
5-4-1	170	70	480
5-4-2	220	100	560
5-4-3	280	120	690
5-4-4	350	160	820

Combinaison de positifs	N.M.P./100 mL	Limites	
		Inférieur	Supérieur
5-5-0	240	100	940
5-5-1	300	100	1300
5-5-2	500	200	2000
5-5-3	900	300	2900
5-5-4	1600	600	5300
5-5-5	1600	-	-

Source: APHA, 1985

Tableau 2 – N.M.P. dans une confiance limitée à 95% pour des résultats positifs lorsque 5 tubes de 10 ml sont examinés

Combinaison de positifs	N.M.P./100 mL	Limites	
		Inférieur	Supérieur
0	< 2,2	0	6,0
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16,0	3,3	52,9
5	>16,0	8,0	Infinito

Source: APHA, 1985

Coliformes thermotolérants

Méthode des tubes multiples (TM)

Matériel nécessaire:

- tubes à essai avec le milieu CE;
- un bec Bunsen ou une lampe à alcool;
- une anse de platine;
- un bain-marie.

Exécution du test

- a) prendre tous les tubes du test présomptif qui ont été positifs (formation de gaz) et tous les tubes négatifs dans lesquels il y a eu augmentation après 48 heures sur trois dilutions (1:1, 1:10 et 1:100);
- b) transférer, avec une anse en platine flambée puis refroidie, une partie des tubes à essai contenant le milieu EC;
- c) mélanger et laisser tous les tubes dans un bain d'eau pendant 30 minutes;
- d) incuber dans un bain-marie à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 ± 2 heures;
- e) si après 24 heures ou moins, il y a une formation de gaz, cela indique la présence de coliformes thermotolérants;
- f) calculer le N.M.P en consultant le tableau 1.

Remarque: Remarque: Ce test doit être réalisé en même temps que le test de confirmation pour les coliformes totaux.

Observation: Toujours effectuer ce test à chaque fois que des tests de confirmation pour les coliformes totaux sont effectués.

Comptage des bactéries hétérotrophes

Matériel nécessaire:

- a) une boîte de Pétri;
- b) une pipette graduée;
- c) un bec Bunsen ou une lampe à alcool;
- d) plate Count Agar (PCA);
- e) un incubateur biologique;
- f) un compteur de colonies.

Exécution du test

- a) transférer à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de l'échantillon préalablement stérilisé dans une boîte de Pétri;
- b) entrouvrir la plaque et ajouter le milieu de culture, préalablement fondu et stabilisé dans un bain-marie à 44-46°C, contenu dans un tube à essai;
- c) homogénéiser le contenu de la plaque en faisant des mouvements circulaires de façon modérée (∞), environ 10 fois de suite;
- d) lorsque le milieu de culture se solidifie, incuber la plaque en position inversée à $35 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pendant 48 ± 3 heures;
- e) à la fin de la période d'incubation, compter les colonies à l'aide d'un compteur de colonies.

Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en nombre de colonies de bactéries/ml ou unités formatrices de colonies (UFC)/ml.

Remarques:

- a) avant de commencer les essais, désinfecter la pailasse du laboratoire en utilisant une solution d'alcool éthylique à 70% ou un autre désinfectant qui ne laisse pas de résidus;
- b) Tous les échantillons doivent être examinés doivent être homogénéisés au moins 25 fois;
- c) ne pas oublier de flamber le goulot des tubes à essai contenant des milieux de culture avant de les utiliser;
- d) le thiosulfate de sodium à 10% placé dans les flacons de collecte sert à neutraliser l'action du chlore;
- e) les boîtes de Petri doivent être placées en position inversée pour éviter la condensation sur la surface de la gélose (agar);
- f) effectuer un comptage standard des bactéries hétérotrophes toujours en double.

Coliformes totaux

Méthode de la membrane filtrante (MF)

Matériel nécessaire:

- a) équipement de filtration avec un porte-filtre;
- b) boîte de Petri stérilisée de Ø 47 mm;
- c) filtres de membrane de Ø 47 mm d'une porosité de 0,45µm, avec un carton absorbant;

- d) milieu de culture (*m Endo Broth MF*);
- e) Eau de dilution stérile;
- f) pinces en acier inoxydable;
- g) verre en acier inoxydable;
- h) bec Bunsen ou une lampe à alcool;
- i) pompe à vide (seringue);
- j) incubateur biologique.

Exécution du test

- a) en utilisant une pince, mettre soigneusement un carton absorbant dans une boîte de Pétri;
- b) avec une pipette stérilisée mettre 1,8 ml de milieu de culture sur le carton absorbant et recouvrir la plaque;
- c) placer le filtre à membrane dans le porte-filtre avec la pince précédemment flambée et refroidie;
- d) agiter le flacon contenant l'échantillon au moins 25 fois;
- e) déboucher et flamber le goulot de la bouteille;
- f) verser soigneusement 100 ml d'échantillon dans le porte-filtre, en évitant que l'eau n'éclabousse les bords supérieurs;
- g) allumer la pompe à vide (seringue) et aspirer;
- h) après avoir filtré l'échantillon, laver trois fois les parois de l'entonnoir avec de l'eau de dilution stérile à hauteur de 20 ml à chaque fois en appliquant le vide;
- i) après le lavage et la filtration, enlever le vide et retirer l'entonnoir du support;

- j) retirer le porte-filtre du support et le mettre dans une boîte de Pétri, préparée au préalable, avec le côté quadrillé vers le haut à l'aide d'une pince flambée et refroidie;
- k) fermer la boîte de Pétri et l'incuber inversée à 35°C pendant 24 ± 2 heures;
- l) après la période d'incubation, examiner le filtre et effectuer le comptage des colonies.

Lecture des résultats

Les colonies de coliformes totales typiques ont une couleur rose au rouge foncé avec un éclat métallique.

Le brillant peut apparaître au centre ou à la périphérie de la colonie. Les non coliformes apparaissent en rouge-clair ou foncé sans le brillant métallique caractéristique.

Observation: Parfois, lorsque le disque est trop humide et la source de lumière très intense, les colonies de coliformes peuvent apparaître avec un brillant faussé, causant des erreurs. Cela peut être contourné en utilisant une source de lumière plus diffuse ou en séchant le filtre avant examen.

Préparation d'un milieu de culture

Matériel nécessaire:

- a) du milieu de culture déshydraté (m Endo Broth MF);
- b) de l'eau distillée;
- c) de l'alcool éthylique à 95%;
- d) flacon *Erlenmeyer* de 125 ml;
- e) un verre de montre;

f) un bec Bunsen ou une lampe à alcool.

Technique

- a) peser 4,8 grammes de milieu déshydraté;
- b) transférer dans le flacon *Erlenmeyer*;
- c) ajouter lentement 100 ml d'eau distillée contenant 2 ml d'alcool éthylique à 95%;
- d) chauffer au bain-marie ou au bec de bunsen jusqu'au début de l'ébullition (ne pas faire bouillir);
- e) laisser refroidir;
- f) répartir 1,8 ml sur chaque plaque.

Observation: 1. Ne préparer que la quantité nécessaire pour une utilisation. Ce milieu peut être acheté dans des ampoules de 2 ml, mais le coût est très élevé. Il est plus économique de le préparer au laboratoire.
2. Pour remplacer le milieu m Endo Broth MF, on peut utiliser un milieu solide (gélose Endo LES).

Coliformes thermotolérants

Méthode de la membrane filtrante (MF)

Matériel nécessaire:

- a) équipement de filtration avec porte-filtre;
- b) plaque stérile de 47 mm Ø;
- c) filtres à membrane de Ø 47 mm d'une porosité de 0,45 µm avec un carton absorbant;
- d) milieu de culture (m FC broth base);
- e) eau de dilution stérile;

- f) pinces en acier inoxydable;
- g) verre en acier inoxydable;
- h) bec bunsen ou petite lampe à alcool;
- i) pompe à vide (seringue);
- j) incubateur bactériologique ou bain-marie.

Préparation du milieu de culture

Matériel nécessaire:

- a) milieu de culture déshydraté (m FC Broth Base);
- b) eau distillée;
- c) acide rosolique à 1% en NaOH 0,2 N;
- d) flacon *Erlenmeyer* de 125 ml;
- e) verre de montre;
- f) bec bunsen ou une petite lampe à alcool.

Technique

- a) peser 3,7 grammes du milieu déshydraté;
- b) transférer dans un flacon *Erlenmeyer*;
- c) dissoudre le milieu pesé dans 100 ml d'eau distillée;
- d) ajouter 1 ml de la solution d'acide rosolique à 1%;
- e) chauffer jusqu'à ébullition;
- f) laisser refroidir;
- g) répartir 2,0 ml sur chaque plaque.

Remarque: 1. Ne préparer que la quantité nécessaire pour l'utilisation;

2. Ce milieu peut être acheté dans des ampoules de 2 ml, mais le coût est très élevé. Il est plus économique de le préparer dans le laboratoire;
3. Pour préparer l'acide rosolique 1%, dissoudre 1 gramme de l'acide dans 100 ml de NaOH 0,2 N;
4. Pour préparer le NaOH 0,2 N diluer 20 ml de la solution 1N dans 100 ml eau distillée;
5. L'acide rosolique est valable 2 semaines au moins, lorsqu'il est conservé au réfrigérateur (2 à 10°C). Jeter lorsque la couleur passe du rouge au brun foncé;
6. Ce milieu peut être rendu solide par addition de 1,2 à 1,5% de gélose avant l'ébullition.

Exécution de l'essai

- a) placer soigneusement un carton absorbant dans la boîte de Petri en utilisant une pince;
- b) avec une pipette stérile placer 2,0 ml de milieu de culture sur le carton absorbant et refermer la plaque;
- c) placer la membrane filtrante sur le porte-filtre à l'aide de la pince précédemment flambée puis refroidie;
- d) agiter le flacon contenant l'échantillon, au moins 25 fois;
- e) ouvrir et flamber le goulot de la bouteille;
- f) verser soigneusement dans 100 ml d'échantillon dans le porte-filtre, en évitant que l'eau n'éclabousse les bords supérieurs;
- g) allumer la pompe à vide (seringue) et aspirer;
- h) après avoir filtré l'échantillon, laver trois fois les parois de l'entonnoir avec de l'eau de dilution stérile par 20 ml par le vide;
- i) après le lavage et la filtration, évacuer le vide et retirer l'entonnoir du support;

- j) avec une pince flambée puis refroidie, retirer le filtre et le mettre dans la boîte de Pétri, le côté quadrillé vers le haut;
- k) fermer la boîte de Pétri et l'incuber inversée à $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ pendant 24 ± 2 heures;
- l) Une fois la période d'incubation terminée, examiner le filtre en effectuant le comptage des colonies;
- m) les colonies indicatives de coliformes fécaux (thermotolérants) apparaissent en bleu. Les non coliformes apparaissent avec une coloration claire ou rosée.

Stérilisation de l'ensemble de filtration dans le champ

- a) humidifier soigneusement l'anneau d'amiante situé à la base du support avec un demi-bouchon d'alcool méthylique (bouchon du flacon d'alcool);
- b) allumer le feu;
- c) placer la cuve en acier au-dessus de l'entonnoir presque en le bouchant;
- d) après avoir chauffé la cuve jusqu'au supportable pour la main, fermer le support;
- e) attendre environ 15 minutes, puis retirer la cuve et rincer l'entonnoir avec de l'eau de dilution stérile afin d'éliminer tout résidu toxique.

Observations:

1. La combustion incomplète du méthanol provoque la formation de formaldéhyde qui est l'agent stérilisant;
2. Le porte-filtre doit être stérile au début de chaque série de filtration et cette série ne doit pas dépasser 30 échantillons. A chaque série de filtration examiner 100 ml d'eau de dilution pour contrôler la stérilité du porte-filtre;

3. Les milieux de culture préparés pour une utilisation avec une membrane filtrante sont valables pendant 96 heures s'ils sont gardés au réfrigérateur à une température entre 2 et 10°C;
4. L'ensemble de filtration peut être également stérilisé en autoclave.

Coliformes totaux et Escherichia coli

Tests de présence/absence

Substrat méthode chromogénique

Le choix d'une méthodologie pour procéder à des examens bactériologiques est fait selon celle qui est la mieux adaptée aux conditions du laboratoire, mais elle doit adopter comme standard les méthodologies, les fréquences et l'interprétation des résultats établis et recommandés par la législation en vigueur.

Les méthodes de tubes multiples (TM) et de la membrane filtrante (MF), sont encore largement utilisées, mais entre-temps l'option de la méthode de substrat chromogénique-fluorogénique défini est communément adoptée pour sa facilité la manipulation, ainsi que pour avoir un rapport coût/bénéfice déjà prouvé.

La méthode est basée sur les activités enzymatiques spécifiques des coliformes (bêta-galactosidase) et *E. coli* (bêta-glucuronidase). Les milieux de culture contiennent des nutriments indicateurs (substrat chromogène) qui, hydrolysés par des enzymes spécifiques de coliformes et/ou *E. coli*, provoquent un changement de couleur dans le milieu. Après la période d'incubation, si la couleur jaune est observée, des coliformes totaux sont présents. Si une fluorescence bleue est observée à la lumière ultraviolette (UV) à 365 nm, le *E. coli* est présent.

Au-delà d'une plus grande précision, cette méthode a comme avantage le temps de réponse, étant donné que la détermination simultanée de coliformes totaux et E-coli est effectuée après incubation des échantillons à 35°C pendant 24 heures, sans nécessité d'effectuer d'essais confirmatifs.

Matériel nécessaire:

- a) un récipient de collecte en verre ou en plastique;
- b) du substrat chromo génique (ONPG)/fluorogène (MUG);
- c) un incubateur biologique;
- d) une lampe à ultra-violet de 365 nm.

Exécution de l'essai

- a) collecter l'échantillon (100 ml) dans un flacon stérile ou dans un sac de collection contenant du thiosulfate de sodium à 10% pour l'eau traitée;
- b) dans le flacon-même ou dans le sac ajouter le contenu d'un flacon contenant le substrat chromogène;
- c) fermer le flacon ou le sac et secouer légèrement, pas besoin de tout dissoudre, cette dissolution se produit naturellement;
- d) incuber à $35,0 \pm 0,5^\circ\text{C}$ pendant 24 heures.

Interprétation et expression des résultats

Après 24 heures d'incubation, retirer la matière de l'incubateur et observer visuellement le flacon ou le sac. S'il présente une coloration jaunâtre, le résultat confirme la présence de coliformes totaux dans l'échantillon.

A l'aide d'une lampe ultraviolette de 365 nm, observer s'il existe une fluorescence bleue dans les échantillons qui développent une coloration jaunâtre en approchant la lampe du flacon. Si l'échantillon présente une coloration jaunâtre et fluorescente à la lumière UV-365 nm cela signifie qu'il y a une présence d'*Escherichia coli* dans l'échantillon examiné.

Si l'échantillon reste transparent, le résultat est négatif, tant pour les coliformes totaux que pour l'*E. coli*.

Exprimer le résultat comme: Présence ou absence de Coliformes Totaux ou d'*Escherichia coli*.

Note: La fluorescence bleue apparaît seulement en présence de la lumière ultraviolette, en enlevant le flacon de devant la lumière il redevient jaune.

Stérilisation

Les matériels suivants doivent être stérilisés: flacons de collecte d'échantillons, pipettes, boîtes de Pétri en verre, flacons et tubes à eau de dilution ainsi que les milieux de culture.

Procédure de stérilisation

- a) préparer tout le matériel;
- b) vérifier si le niveau de l'eau dans l'autoclave est au-dessus des résistances. Compléter si nécessaire;
- c) déposer tout le matériel dans une boîte métallique et fermer l'autoclave;
- d) ouvrir les deux loquets du couvercle pour ne pas permettre à la vapeur de sortir des bords de l'appareil. Brancher l'appareil dans la prise;
- e) tourner le sélecteur de température en position "maximum";

- f) ouvrir immédiatement la valve d'échappement de vapeur;
- g) lorsque la vapeur commence à sortir de cette valve, attendre trois minutes et la fermer;
- h) à cet instant, l'aiguille de la jauge commencera à s'élever;
- i) Lorsque l'aiguille atteint la marque 1 kg/cm^2 de pression, la température doit être à 121°C . Laisser dans cette position pendant 20 minutes;
- j) si la pression continue à augmenter, tournez la touche de sélection choisir la position "milieu" de l'autoclave et continuer à regarder;
- k) Le matériel sera stérilisé en 20 mn;

Remarque: Normalement, les autoclaves ont un sélecteur de température qui a trois positions "minimum, moyenne et maximum" justement pour maintenir la pression et la température dans la bande utilisée. Il sert également à allumer et éteindre l'appareil. De nos jours il existe des autoclaves munis d'un microprocesseur qui exécute les étapes automatiquement, soit le cycle de stérilisation et de décontamination après avoir été programmé par l'utilisateur.

- l) éteindre l'appareil et attendre que le pointeur du manomètre atteigne la position "0". Cette procédure pourra être accélérée en ouvrant lentement la valve de soupape de vapeur;

Attention: Ne pas ouvrir cette valve en une seule fois!

- m) quand le pointeur du manomètre atteint la position "0" et qu'il n'y a plus de vapeur qui sort de la valve, ouvrir le couvercle de l'appareil et retirer le matériel.

Remarque: Il existe plusieurs modèles d'autoclaves sur le marché et il est important de toujours suivre les instructions du fabricant.



Analyses physico-chimiques de l'eau

Titrimétriques et Colorimétriques



Analyses Titrimétriques

L'alcalinité totale

L'alcalinité totale de l'eau est donnée par la somme des différentes formes d'alcalinité existantes, soit, par la concentration des hydroxydes, des carbonates et des bicarbonates, exprimée en termes de carbonate de calcium. On peut dire que l'alcalinité mesure la capacité de l'eau à neutraliser les acides.

La mesure de l'alcalinité est d'une importance fondamentale dans le processus de traitement de l'eau, car c'est en fonction de sa teneur que s'établit le dosage des produits chimiques utilisés.

Normalement les eaux superficielles possèdent une alcalinité naturelle en concentration suffisante pour réagir au sulfate d'aluminium dans les processus de traitement. Lorsque l'alcalinité est trop faible ou inexistante, il est nécessaire de provoquer une alcalinité artificielle en appliquant des substances alcalines, comme la chaux hydratée ou la soude (carbonate de sodium) afin d'atteindre cet objectif.

Lorsque l'alcalinité est trop élevée, on procède à l'inverse, à l'acidification de l'eau jusqu'à obtention d'une teneur en alcalinité suffisante pour réagir au sulfate d'aluminium ou à d'autres produits utilisés dans le traitement des eaux.

Méthode de détermination

Le titrage avec l'acide sulfurique

Matériel nécessaire:

- a) une pipette volumétrique de 50 ml;

- b) un flacon *Erlenmeyer* de 250 ml;
- c) une burette de 50 ml;
- d) de la phénolphtaléine;
- e) un indicateur méthylorange;
- f) un Indicateur mélange vert de bromocrésol/rouge de méthyle;
- g) une solution d'acide sulfurique 0,02 N;
- h) une solution de thiosulfate de sodium 0,1 N.

Technique

- a) prendre 50 ml d'échantillon et les mettre dans un flacon *Erlenmeyer*;
- b) ajouter 3 gouttes de solution d'indicateur vert de bromocrésol/rouge de méthyle;
- c) Titrer la solution avec 0,02 N d'acide sulfurique jusqu'à ce que la couleur vire au bleu-vert rose;
- d) noter le volume total de H_2SO_4 utilisé (V) ml.

Calcul:

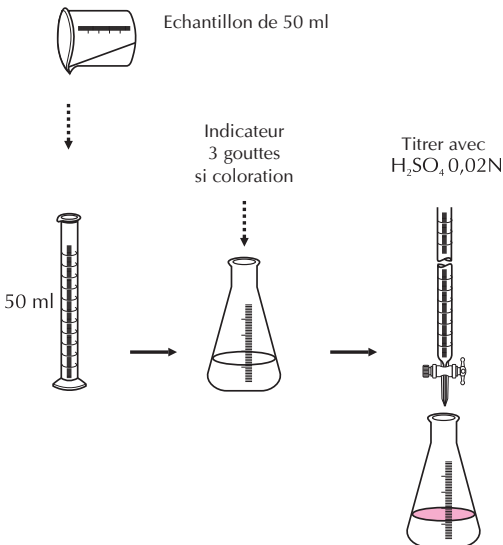
Alcalinité totale en mg/L de $CaCO_3 = V \times 20$

Notes:

1. utiliser 0,05 ml (1 goutte) solution de thiosulfate de sodium N 0,1 si l'échantillon présente du chlore résiduel libre;
2. Utiliser cette technique en cas d'absence d'alcalinité à la phénolphtaléine;
3. S'il y a de l'alcalinité phénolphtaléine, ajouter, avant de mélanger l'indicateur vert de bromocrésol de méthyle/rouge 3 gouttes de phénolphtaléine et titrer avec H_2SO_4

- 0,02 N jusqu'à ce que la couleur rose formée disparaisse. Continuer ensuite avec l'étape b) de la technique;
4. L'alcalinité à la phénolphtaléine ne peut se produire que si le pH l'échantillon est supérieur à 8,2;
 5. A défaut d'obtenir un mélange indicateur vert de bromocrésol/rouge de méthyle, utiliser un indicateur de méthylorange. Dans ce cas, le point tournant dans l'étape 3 de la technique sera de jaune à orange;
 6. Le tournant lors de l'utilisation du vert de bromocrésol/rouge de méthyle comme indicateur est plus clair que lors de l'utilisation méthylorange;
 7. La formule ci-dessus est à utiliser lors de l'utilisation d'un échantillon de 50 ml. En cas d'utilisation de 100 ml d'échantillon, le volume (V) sera multiplié par 10;
 8. Fc – facteur de correction de la solution du réactif de titrage.

Fluxogramme de l'analyse



Gaz carbonique libre

Le gaz carbonique libre existant dans des eaux superficielles est normalement moins concentré que 10 mg/l, alors que dans les eaux souterraines il peut être plus concentré.

Le gaz carbonique contenu dans l'eau peut contribuer significativement à la corrosion des structures métalliques et des matériaux à base de ciment (tubes de fibrociment) d'un système d'approvisionnement en l'eau et c'est pour cela que sa teneur doit être connue et contrôlée.

Méthode de détermination

Titration avec de l'hydroxyde de sodium

Matériel nécessaire:

- a) une burette de 50 ml;
- b) un flacon *Erlenmeyer* de 250 ml;
- c) une pipette volumétrique de 100 ml;
- d) un bouchon en caoutchouc;
- e) de l'hydroxyde de sodium à 0,02N;
- f) phénolphthaléine.

Technique

- a) placer 100 ml d'échantillon (sans agiter) dans un flacon *Erlenmeyer*;
- b) ajouter 10 gouttes de phénolphthaléine, si la solution se colore, elle ne contient pas de CO₂, et si elle ne se colore pas, continuer;

- c) titrer avec une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) 0,02 N goutte à goutte jusqu'à l'apparition d'une légère coloration rose pendant au moins 30 secondes;
- d) noter le volume (ml) de NaOH utilisé (V).

Calcul

$$V \times 10 \times Fc = \text{mg/L de CO}_2 \text{ libre}$$

où:

Fc = facteur de correction.

Pour calculer les émissions totales de CO₂, appliquer la formule suivante:

$$\text{mg/l CO}_2 \text{ 0,44 Total} = A + (2B + C)$$

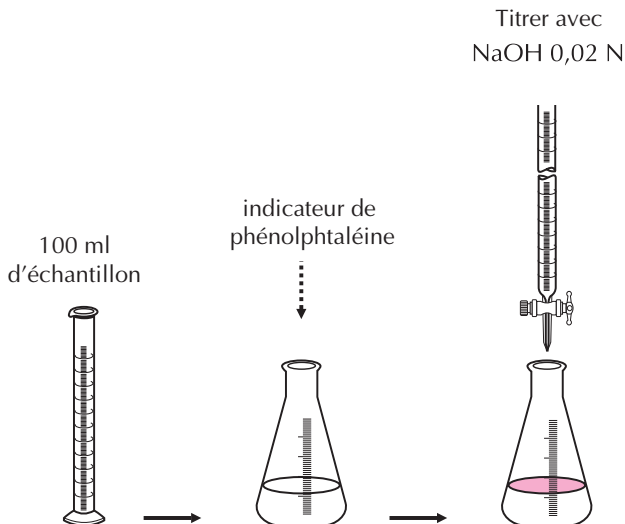
où:

A = mg/L sans CO₂

B = alcalinité due à la cuisson

C = alcalinité due au carbonate.

Fluxogramme de l'analyse de CO₂



Chlorures

En général, les chlorures sont présents dans eaux à l'état brut et transformés à des concentrations allant de petites traces jusqu'à plusieurs centaines de mg/l. Ils sont présents sous la forme de chlorures de sodium, de calcium et de magnésium. La mer a une forte concentration de chlorure qui est d'environ de 26.000 mg/l. De fortes concentrations de chlorures peuvent restreindre l'utilisation de l'eau en raison de la saveur qu'ils donnent et l'effet laxatif qu'ils peuvent causer. Le décret n° 2.914/2011 du Ministère de la Santé brésilien établit le niveau de 250 mg/l comme maximum autorisé pour l'eau potable. Les méthodes conventionnelles de traitement des eaux n'éliminent pas les chlorures. Leur élimination peut se faire par désalinisation (osmose inverse) ou par électrodialyse, (échange d'ions).

Méthode de détermination

Titration avec du Nitrate d'argent

Matériel nécessaire:

- a) une burette de 50 ml;
- b) un bécher de 250 ml;
- c) un flacon *Erlenmeyer* de 250 ml;
- d) un mesureur de pH;
- e) un bécher de 100 ml;
- f) de la solution titrée de nitrate d'argent 0,0141N;
- g) de la solution de chromate de potassium indicateur K_2CrO_4 ;
- h) hydroxyde de sodium 1N;
- i) acide sulfurique 1N;
- j) Chlorure de sodium 0,0141 N.

Technique

- a) placer 100 ml d'échantillon dans le flacon *Erlenmeyer*;
- b) ajuster le pH entre 7 et 10, en cas de besoin avec NaOH ou H_2SO_4 ;
- c) ajouter 1 ml de la solution indicatrice de K_2CrO_4 ;
- d) titrer la solution avec du nitrate d'argent 0,0141N jusqu'à ce que la solution vire au jaune rougeâtre qui est le point de fin de titrage;
- e) effectuer un essai en blanc de la même façon que pour l'échantillon.

Calcul:

$$\text{mg/L Cl} = \frac{(A - B) \times N \times 35.45}{\text{mL d'échantillon}}$$

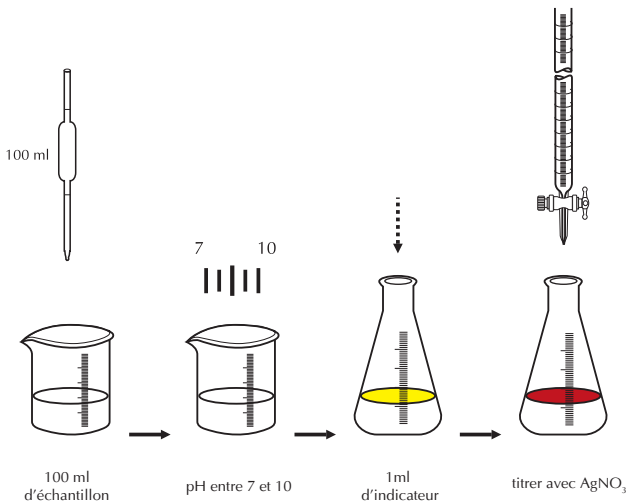
où:

A = ml de solution titrée utilisée dans l'échantillon;

B = ml de solution titrée en blanc;

N = normalité de la solution titrée;

Fluxogramme de l'analyse de chlorures



La dureté totale

Dureté totale est calculée comme la somme des concentrations des ions calcium et magnésium dans l'eau, exprimés en carbonate de calcium.

La dureté d'une eau peut être temporaire ou permanente.

La dureté temporaire, appelée aussi la dureté carbonate est causée par la présence de calcium et de bicarbonates de magnésium. Ce type de dureté résiste à l'action des savons et provoque des incrustations. Elle est appelée temporaire car les bicarbonates, par l'action de la chaleur, se décomposent en gaz carbonique, eau et carbonates insolubles qui se précipitent.

La dureté permanente, également appelée de dureté de non-carbonates est due à la présence de sulfates, chlorures et nitrates de calcium et de magnésium, elle résiste également à l'action des savons, mais ne produit pas de d'incrustations car ses sels sont très solubles dans l'eau. Ne se décompose pas sous l'action de la chaleur.

Le décret MS n° 2.914/2011 établit la teneur en dureté totale de 500 mg/L de CaCO_3 comme valeur maximale autorisée pour l'eau potable.

Méthode de détermination

Titration avec EDTA

Matériel nécessaire:

- a) burette de 50 ml;
- b) pipette volumétrique de 25 ml;

- c) ballon volumétrique de 50 ml;
- d) bécher de 100 ml;
- e) flacon *Erlenmeyer* de 250 ml;
- f) de la solution standard de EDTA 0,01 M;
- g) solution tampon;
- h) indicateur noir ériochrome T;
- i) inhibiteur – cyanure de sodium P.A en poudre;
- j) inhibiteur II – sulfure de sodium.

Technique

- a) prendre 25 ml d'échantillon et le diluer avec 50 ml d'eau distillée dans un ballon volumétrique;
- b) placer dans un bécher de 100 ml et ajouter 1 à 2 ml de la solution tampon pour augmenter le pH à $10 \pm 0,1$;
- c) placer dans un flacon *Erlenmeyer* de 250 ml et ajouter environ 0,05 grammes de l'Indicateur noir ériochrome T;
- d) titriser avec l'EDTA 0,01M en remuant continuellement jusqu'à disparition de la couleur pourpre jaunâtre et l'apparition de la couleur bleue (fin du titrage);
- e) noter le volume d'EDTA utilisé (ml);
- f) faire un essai blanc avec de l'eau distillée;
- g) soustraire le volume d'EDTA utilisé dans le titrage du blanc du volume d'EDTA utilisé dans le titrage de l'échantillon. La différence est le volume qui sera appliqué au calcul.

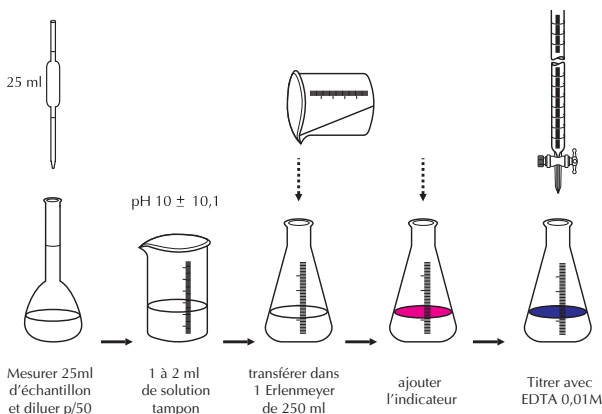
Calcul

$$\text{Dureté Totale en mg/L CaCO}_3 = \frac{\text{ml de EDTA} \times 1000 \times F_c}{\text{ml d'échantillon}}$$

Remarques:

1. L'absence d'un point de virage défini, indique généralement le besoin d'ajouter un inhibiteur ou que l'indicateur est détérioré;
2. Il n'y a pas besoin de plus de 5 minutes pour un titrage mesuré après l'ajout de la solution tampon;
3. Au cas où la dureté de l'eau serait très basse, utiliser un échantillon plus grand, de 50 à 250 ml en ajoutant proportionnellement une quantité plus importante de solution tampon de l'inhibiteur et de l'indicateur.
4. S'il est nécessaire d'utiliser un inhibiteur, ajouter 20 gouttes de l'inhibiteur II;
5. F_c = Facteur de correction de l'EDTA si différent de 1.

Fluxogramme de l'analyse



pH

Le terme pH est la concentration d'ions hydrogène dans une solution. Dans l'eau, ce facteur est d'une importance exceptionnelle, en particulier dans les procédés de traitement. Dans les laboratoires de routine des usines de traitement, il est mesuré et ajusté si nécessaire pour améliorer la coagulation/floculation ainsi que pour contrôler la désinfection de l'eau, la valeur du pH allant de 0 à 14. En dessous de 7 l'eau est considérée comme acide et au-dessus de 7 comme alcaline. L'eau au pH de 7 est neutre.

Le décret n° 2.914/2011 du Ministère de la Santé recommande que le pH de l'Eau soit maintenu dans la gamme de 6,0 à 9,5 dans le système de distribution.

Il existe plusieurs dispositifs sur le marché de la détermination du pH. Ils sont appelés potentiomètres ou colorimètres. Dans ce manuel est décrit le fonctionnement de base d'un potentiomètre, bien que les instructions du fabricant peuvent varier et qu'elles doivent donc être respectées.

Matériel nécessaire:

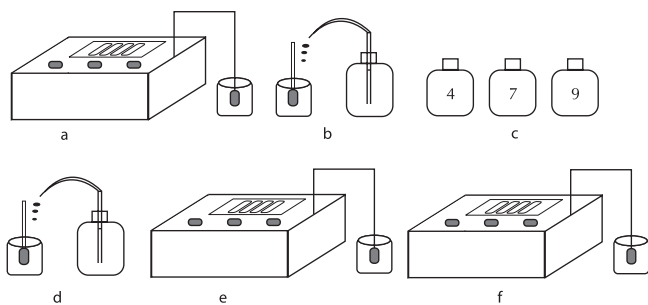
- a) potentiomètre
- b) cuves;
- c) flacon laveur;
- d) papier absorbant;
- e) solutions tampons de pH connues;

Technique

- a) allumer l'appareil et attendre qu'il se stabilise;

- b) laver les électrodes avec de l'eau distillée et les sécher avec du papier absorbant;
- c) calibrer l'appareil avec des solutions standard (pH 4 – 7 ou 10);
- d) laver de nouveau les électrodes avec de l'eau distillée et les sécher;
- e) introduire les électrodes dans l'échantillon à être examiné et en faire la lecture;
- f) laver de nouveau et les laisser immergés dans l'eau distillée;
- g) éteindre l'appareil.

Fluxogramme du test



Analyses colorimétriques

Le chlore résiduel libre

Le chlore est un produit chimique utilisé pour la désinfection de l'eau. Il est important de le mesurer, car cela sert à contrôler le dosage qui est appliqué ainsi que son évolution durant le traitement.

Le décret n° 2.914/2011 du Ministère de la Santé rend obligatoire le maintien d'un minimum de 0,2 mg/l de chlore résiduel libre ou de 2 mg/l de chlore résiduel combiné tout au long de l'extension du système de distribution (réservoir et réseau). Il recommande également que la réutilisation maximale du chlore libre à n'importe quel point dans le système d'alimentation soit de 2 mg/l. Les principaux produits utilisés sont: l'hypochlorite de calcium, le chlorure de chaux, l'hypochlorite de sodium et le chlore gazeux.

Méthode de détermination

Comparaison visuelle

Matériel nécessaire:

- a) comparateur colorimétrique;
- b) cuves de verre ou d'acrylique;
- c) DPD pour chlore libre en capsules.

Technique

- a) remplir la cuve avec de l'eau d'échantillon jusqu'au niveau de 5,0 ml;
- b) la placer du côté gauche de l'ouverture de l'appareil;
- c) remplir une autre cuve jusqu'au niveau de 5,0 ml avec l'échantillon qui va être testé;
- d) ajouter une capsule du réactif DPD dans le second échantillon et mélanger;
- e) placer une cuve avec l'échantillon dans le compartiment droit de l'appareil;
- f) faire une lecture de la teneur en chlore avant 1 minute.

Note: Au moment d'effectuer la lecture, positionner le comparateur (équipement) contre une source de lumière comme par exemple une fenêtre, le ciel, ou une lampe. Tourner le disque jusqu'à obtenir la même tonalité dans les deux tubes.

Résultat

Le résultat est exprimé en mg/l de Chlore Résiduel Libre.

Observation: Il existe sur le marché différents types de comparateurs colorimétriques pour mesurer le chlore résiduel, autant que pour l'utilisation de orthotolidine et le DPD. En cas de doute, consulter, comme toujours, les instructions du fabricant. L'utilisation de l'orthotolidine est à éviter étant donné qu'il s'agit d'une substance cancérigène et qu'elle n'est plus recommandée par les Standard Methods.

Couleur

La couleur de l'eau provient de matières organiques, comme par exemple les substances humiques, les tanins mais également les métaux comme le fer et le manganèse ainsi que les

résidus industriels fortement colorés. La couleur, dans les systèmes publics d'approvisionnement d'eau, est esthétiquement indésirable. Il est important de la mesurer, étant donné qu'une couleur élevée provoque son rejet par le consommateur et l'amène à chercher d'autres sources de suppression parfois beaucoup moins sûres.

Le décret MS n° 2.914/2011 établit pour la couleur apparente une valeur maximale permise de 15 (quinze) uH comme standard organoleptique pour la consommation humaine.

Méthode de détermination

Méthode de Comparaison visuelle

Matériel nécessaire:

- a) tubes de Nessler longs de 50 ml;
- b) support en bois;
- c) solution-standard de chloroplatinate de potassium (500 unités de couleur).

Technique

- a) préparer les standards de couleur dans la bande de 5 à 50 unités de couleur, mesurant 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0 et 7,0 ml de la solution standard (500 unités de couleur) et les placer dans des tubes de Nessler de 50 ml;
- b) diluer avec de l'eau distillée jusqu'à la marque de 50 ml;
- c) mesurer 50 ml de l'échantillon dans un autre tube de Nessler et comparer avec les standards.

Résultat

Le résultat est l'exprimé en unités de couleur ou unité Hazen (uH).

Remarques:

1. la comparaison devra être faite en regardant les tubes verticalement contre un fond blanc;
2. Protéger les standards de l'évaporation et de la poussière;
3. lorsque la couleur de l'échantillon est plus élevée que 70 unités, diluer jusqu'à obtenir un résultat à l'intérieur de la bande couverte par les standards. Dans ce cas, le résultat doit être multiplié par le facteur de dilution;
4. uH est l'unité de l'échelle de Hazen (platine-cobalte, mgPt- Co/l).

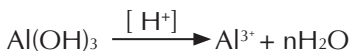
Aluminium

Le test de l'aluminium est indiqué pour les stations de traitement où le sulfate d'aluminium est utilisé comme coagulant.

Un dosage incorrect de ce coagulant se note à la quantité significative d'aluminium qui persiste dans l'eau traitée.

L'hydroxyde d'aluminium – $\text{Al}(\text{OH})_3$ – formé dans la réaction est amphotère. Sa ionisation s'effectue par le pH acide ou basique, selon les équations:

En pH acide:



En pH basique:



Dans les deux formes il peut se solubiliser et traverser les décanteurs et les filtres. La solubilisation arrive avec la correction du pH.

Lorsque le pH optimal de floculation n'est pas correct, la teneur en aluminium de l'eau traitée augmente.

Le décret n° 2.914/2011 du Ministère de la Santé établit que la norme organoleptique pour la consommation humaine est de 0,2 mg/l.

Méthode de détermination

La détermination de l'aluminium peut être faite grâce aux méthodes d'absorption atomique, de l'eriochrome cyanine R en utilisant un photomètre de filtre ou un spectrophotomètre, ainsi que par la méthode de comparaison visuelle, en utilisant des tubes de Nessler.

Dans ce manuel, on décrira la méthode de comparaison visuelle, considérant que la plupart des laboratoires des services d'approvisionnement en eau ne possèdent pas toujours des équipements comme un spectrophotomètre ou d'absorption atomique.

Méthode de Comparaison Visuelle

Matériel nécessaire

- a) un tube de Nessler de forme haute de 50 ml;
- b) une pipette graduée de 1 ml;
- c) une pipette graduée de 5 ml;
- d) une pipette graduée de 10 ml;
- e) un support pour les tubes de Nessler.

Réactifs

- a) acide sulfurique 0,02N;
- b) réactif tampon d'acétate de sodium;
- c) ériochrome Cyanine -R- (colorant);
- d) solution de travail du colorant.

Technique

- a) mesurer 25 ml d'échantillon ou une portion diluée pour 25 ml dans un flacon *Erlenmeyer* de 125 ml;
- b) ajouter 3 gouttes de méthylorange et titrer avec de l'acide sulfurique (H_2SO_4) 0,02N jusqu'à obtenir une légère coloration rose pâle;
- c) noter le volume utilisé d'acide et jeter l'échantillon;
- d) mesurer à nouveau 25 ml d'échantillon ou un aliquote dilué dans 25 ml et les placer dans un tube de Nessler de 50 ml;
- e) ajouter à l'échantillon le même volume d'acide sulfurique utilisé dans l'étape N° 2, en ajoutant 1 ml en trop;
- f) ajouter 1,0 ml d'acide ascorbique et mélanger;
- g) ajouter 10,0 ml du réactif tampon et mélanger;
- h) ajouter 5,0 ml de la solution de travail du colorant et mélanger;
- i) diluer immédiatement jusqu'à la marque de 50 ml avec de l'eau distillée;
- j) mélanger et laisser reposer 5 à 10 minutes, ensuite comparer la couleur développée par l'échantillon avec les standards préparés de la même manière et à la même heure.

Résultat

Le résultat est exprimé en mg/m d'aluminium.

Observation: Dans cette méthode il n'est pas nécessaire de préparer un échantillon blanc et ce n'est pas recommandé non plus pour les échantillons qui contiennent de la couleur et de la turbidité car cela peut amener des erreurs.

Préparation des standards

Matériel nécessaire

- un tube de Nessler de forme haute de 50 ml;
- une pipette graduée de 1 ml;
- une pipette graduée de 5 ml;
- une pipette graduée de 10 ml;
- un support pour les tubes de Nessler.

Réactifs:

- acide sulfurique 0,02N;
- tampon réactif d'acétate de sodium;
- ériochrome Cyanine -R- (courant);
- solution de travail colorante;
- solution-standard d'aluminium (1 ml = 5 µg Al).

Technique

Préparer les standards dans la bande de 0 à 0,5 mg/l, en pipetant 0,0 – 0,5 – 1,0 – 1,5 – 2,0 et 2,5 ml de la solution standard (1 ml = 5 µg) et en diluant 25 ml avec de l'eau distillée dans des tubes de Nessler (voir tableau plus bas).

Traiter ces standards de façon suivante:

- a) ajouter 1,0 ml d'acide sulfurique 0,02N et mélanger;
- b) ajouter 1,0 ml d'acide ascorbique et mélanger;
- c) ajouter 10 ml du réactif tampon et mélanger;
- d) ajouter 5 ml de la solution de travail courante et mélanger;
- e) augmenter le volume à 50 ml avec de l'eau distillée et mélanger;
- f) laisser reposer 5 à 10 minutes.

ml de solution-standard	$\mu\text{g Al/mL}$	Volume d'échantillon	mg/L Al
0,0	0,0	25	0,0
0,5	2,5	25	0,1
1,0	5,0	25	0,2
1,5	7,5	25	0,3
2,0	10,0	25	0,4
2,5	12,5	25	0,5

Remarques:

1. Pour le standard 0,0 mg/l, prendre 25 ml d'eau distillée et procéder de la même façon que pour les autres;
2. Préparer les standards à chaque examen d'échantillon;
3. Si le laboratoire possède un spectrophotomètre, faire une lecture des standards à 535 nm et tracer une courbe de calibration en papier semi logarithme (% de transmission par concentration). Dans ce cas, il est nécessaire de préparer tous les standards en cas d'examen d'un échantillon. Effectuer à peine un ou deux tests pour vérifier la courbe de calibration de l'appareil.

Turbidité

La turbidité de l'eau est due à la présence de matériaux solides en suspension qui réduisent sa transparence. Elle peut être également provoquée par la présence d'algues, de plancton, de matière organique et plein d'autres substances comme le

zinc, le fer, le manganèse et le sable, résultant du processus naturel d'érosion ou de rejets domestiques et industriels.

La turbidité a son importance dans le processus de traitement de l'eau. De l'eau avec une turbidité élevée, et selon sa nature, forme des flocons lourds qui décantent plus rapidement que ceux de l'eau à faible turbidité. Cela a également des inconvénients comme en cas de désinfection qui peut être plus difficile à cause de la protection qui peut être donnée aux microorganismes au contact direct avec les désinfectants. C'est un indicateur sanitaire et une norme organoleptique de l'eau de consommation humaine.

Au Brésil, la norme de potabilité a été récemment révisée et le décret MS n° 2914/2011 inclut les préoccupations internationales concernant la transmission de protozoaires via l'approvisionnement en eau. Le standard de turbidité de l'eau résultant d'une filtration rapide (traitement complet ou filtration directe) a été réduit à 0,5 uT et pour l'eau résultant d'une filtration lente à 1,0 uT. Entre temps, le traitement de la valeur maximale permise de 0,5 et 1,0 uT devra être réalisé par objectifs progressifs pendant quatre ans: dans 25% des échantillons analysés mensuellement durant la première année, et jusqu'à 95% la quatrième année (toujours avec une VMP de 1 uT dans le reste des échantillons mensuels).

Le décret n° 2.914/2011 du Ministère de la Santé établit en outre la valeur maximale permise de 1,0 uT pour l'eau souterraine post filtration ou pré-désinfection. Et dans n'importe quel point de distribution 5,0 uT comme norme organoleptique de potabilité.

Il existe des équipements spécifiques pour la détermination de la turbidité dans l'eau. Dans ce manuel, on présentera la technique de détermination de la turbidité en utilisant la méthodologie néphélométrique.

Méthode Néphélométrique

Matériel nécessaire:

- a) turbidimètre avec un néphélomètre;
- b) cellules d'échantillons de verre incolore (quartz),
- c) ballon volumétrique de 100 ml;
- d) pipette volumétrique de 5 ml;
- e) ensemble de filtration;
- f) filtres de membrane de 0,2 μm .

Réactifs:

Eau libre de turbidité:

- a) passer l'eau distillée à travers un filtre de membrane de 0,02 μm de porosité. Rincer le flacon de collecte au moins deux fois avec de l'eau filtrée et ne pas prendre en compte les premiers 200 ml;

Suspension stock de turbidité – standard primaire.

Solution I

- Dissoudre 1,0 g de sulfate d'hydrazine (NH_2). H_2SO_4 dans de l'eau distillée et diluer 100 ml dans un ballon volumétrique;

Avertissement: le sulfate d'hydrazine est cancérigène. Eviter l'inhalation, l'ingestion et le contact avec la peau.

Solution II

- dissoudre 10,0g d'hexaméthylènetétramine (CH_2) $_6\text{N}_4$ dans de l'eau distillée et diluer 100 ml dans un ballon volumétrique;

- mélanger 5,0 ml de la solution I et 5,0 ml de la solution II. Laisser reposer pendant 24 heures à $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. La turbidité de cette suspension est de 4000 UT.
- Mettre la solution stock dans un flacon de couleur ambre ou dans un autre flacon protégé de la lumière ultraviolette pour le stockage. Diluer cette suspension stock. La suspension stock reste stable pendant un an lorsqu'elle est stockée correctement;

Suspension standard de turbidité:

- a) diluer 1,0 ml de la solution stock pour 100 ml avec de l'eau libre de turbidité. La turbidité de cette suspension est de 40 UT. Préparer quotidiennement.

Standards de turbidité dilués:

- a) diluer des morceaux de la suspension standard de turbidité avec de l'eau sans turbidité selon la bande qui intéresse. Préparer quotidiennement.

Processus:

- a) calibrer le turbidimètre selon les instructions du fabricant;
- b) mesure de la turbidité inférieure à 40 uT: agiter doucement un échantillon et attendre la disparition des bulles; le placer dans la cellule de l'échantillon du turbidimètre; effectuer une lecture de la turbidité directement sur l'échelle de l'instrument ou sur la courbe de calibration appropriée.
- c) mesure de la turbidité supérieure à 40 uT: diluer un échantillon avec un ou plusieurs volumes d'eau libre de turbidité jusqu'à ce que la turbidité de l'échantillon diluée reste entre 30 et 40 UT. Effectuer une lecture et multiplier le résultat par le facteur de dilution.

Calcul:

$$uT = \frac{A \times (B + C)}{C}$$

où:

UT = UTN = Unité de Turbidité néphélobométrique;

A = Turbidité de l'échantillon dilué;

B = Volume de la dilution (ml);

C = Volume de l'échantillon pris pour la dilution.

Exemple: Une portion de 10 ml de l'échantillon a été diluée pour 50 ml avec de l'eau libre de turbidité. Lorsqu'on effectue la lecture de cet échantillon dilué, on obtient 20

$$UT = \frac{20 \times (40 + 10)}{10} \therefore UT = 100$$

Température

La température dépend de l'augmentation de la consommation d'eau, de la fluoruration, de la solubilité et de l'ionisation des substances coagulantes, du changement du pH, de la désinfection, etc.

Processus de la détermination dans l'eau

Matériel nécessaire:

- a) un thermomètre;
- b) un bécher de 250 ml.

Technique

- a) mettre un peu d'eau dans un bécher de de 250 ml;
- b) plonger le thermomètre dans l'eau;
- c) attendre jusqu'à ce que le mercure se stabilise;
- d) effectuer une lecture avec le bulbe du thermomètre encore dans l'eau.

Les Fluorures

L'adjonction de fluor dans l'eau pour la consommation humaine a pour finalité de prévenir les caries dentaires. Aujourd'hui, cette procédure est considérée comme un processus normal de traitement de l'eau et la teneur optimale de fluor est une partie essentielle de sa qualité. Pour cette raison et pour d'autres, son contrôle s'effectue obligatoirement dans la station de traitement de l'eau (ETA).

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer le fluor dans l'eau. Les trois les plus connues sont: la méthode *Spadns*, la *Scott-Sanchis* et la méthode de l'électrode spécifique par ions fluorures.

Dans ce manuel, nous ne décrivons que la méthode *Scott-Sanchis*, qui même si elle ne donne pas le degré d'exactitude le plus important, répond aux attentes et c'est la moins onéreuse. C'est une méthode de comparaison visuelle de couleur faite en tubes de Nessler.

Processus d'analyse de fluorures

Méthode *Scott-Sanchis*

Matériel nécessaire

- a) un tube de Nessler de 100 ml;

- b) un support pour tube de Nessler;
- c) un thermomètre;
- d) une pipette volumétrique de 5 ml;
- e) une pipette graduée de 10 ml.

Réactifs:

- a) solution norme de fluorures (1 ml = 10 µgF);
- b) réactif *Scott-Sanchis*;
- c) arsénite de sodium (0,5%).

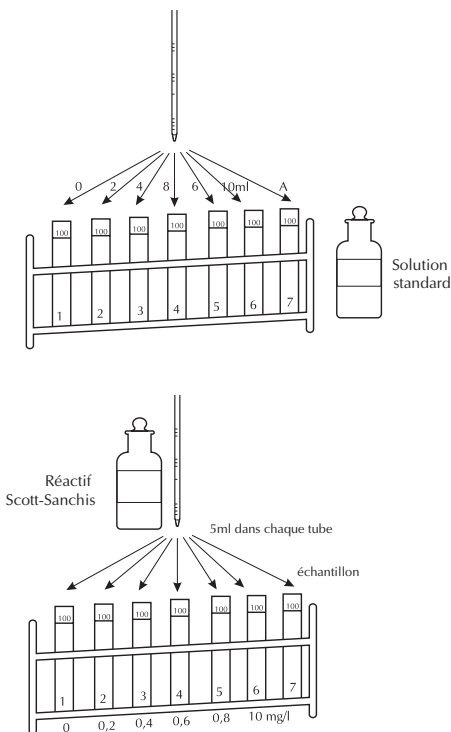
Préparation des standards et de l'échantillon:

- a) prendre 7 tubes de Nessler de 100 ml;
- b) remplir le 1er tube avec de l'eau distillée (blanc);
- c) pipeter dans le 2ème tube 2 ml de la solution norme;
- d) pipeter dans le 3ème tube 4 ml de la solution norme;
- e) pipeter dans le 4ème tube 6 ml de la solution norme;
- f) pipeter dans le 5ème tube 8 ml de la solution norme;
- g) pipeter dans le 6ème tube 10 ml de la solution norme;
- h) remplir le 7ème tube avec 100 ml d'échantillon ou un aliquote dilué à 100 ml. S'il y a du chlore dans l'échantillon, l'enlever en ajoutant 0,1ml (2 gouttes) de solution d'arsénite de sodium pour chaque mg/l de chlore;
- i) diluer les standards de 2 à 6 à 100 ml avec de l'eau distillée;
- j) ajuster la température des standards et de l'échantillon;
- k) ajouter dans chaque tube, même le blanc, (1er tube) 5 ml du réactif *Scott-Sanchis*;

- l) mélanger et laisser reposer pendant une heure;
- m) une heure après avoir ajouté le réactif *Scott-Sanchis*, comparer l'échantillon avec les standards et exprimer le résultat en mg F/L.

Exemple: Si la coloration développée par l'échantillon ressemble au standard du tube n° 5, cet échantillon aura 0,8 mg/l d'ion fluorure. Si l'échantillon développe une coloration qui se situe entre deux standards on pourra faire une interprétation des résultats. Ex.: une lecture entre 0,6 et 0,8 et exprimée par 0,7 mg/l.

Fluxogramme du test



Remarques:

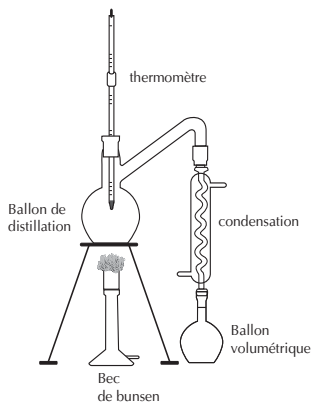
1. La concentration des standards préparés (tubes de 2 à 6 correspond respectivement à 0,2 – 0,4 – 0,6 – 0,8 – 1,0 mg/l d'ion fluorure;
2. de nombreux échantillons pourront être analysés simultanément avec les standards;
3. S'il y a des intervenants dans les échantillons en concentrations qui peuvent altérer les résultats, ces échantillons devront être distillés.

Tableau des intervenants

Substances intervenantes	Méthode <i>Scott-anchis</i>	Type d'erreur
Alcalinité (CaCO_3)	400 mg/L	-
Aluminium (Al^{3+})	0,25 mg/L	--
Chlorure (Cl^-)	2000 mg/L	-
Fer (Fe^{3+})	2,0 mg/L	+
Hexamétaphosphate (NaPO_3) ₆	1,0 mg/L	+
Phosphate (PO_4^{-3})	5,0 mg/L	+
Sulfate (SO_4^{-2})	300 mg/L	+

Source: Adapté de Mayer, 1971

Equipements pour la distillation:



Effectuer premièrement une distillation préliminaire pour enlever toute contamination de fluorure et ajuster la réaction acide/eau pour les distillations ultérieures de la façon suivante:

- placer 400 ml d'eau distillée dans le ballon de distillation;
- ajouter lentement en agitant 200 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4);
- ajouter quelques perles de verre;
- connecter le ballon au condensateur et commencer la distillation;
- Lorsque la température atteint $180^\circ C$, arrêter la distillation et éliminer ce qui a été distillé. L'ensemble est prêt pour la distillation de l'échantillon.

Distillation de l'échantillon

Ajouter soigneusement 300 ml d'échantillon au mélange d'acide qui est resté de la distillation préliminaire et distiller comme avant jusqu'à ce que la température atteigne 180°C. A ce moment le liquide distillé sera égal à 300 ml.

Remarques:

1. Ne pas laisser la température dépasser 180°C, afin d'éviter des traces de sulfate dans le liquide distillé.
2. Lorsque les échantillons à haut contenu en fluorures sont analysés, ajouter au ballon de distillation 5 mg de sulfate d'argent pour chaque mg de fluorure présent dans l'échantillon.
3. utiliser la solution d'acide sulfurique plusieurs fois jusqu'à ce que les contaminants des échantillons d'eau accumulés dans le flacon de distillation commencent à intervenir dans le liquide distillé. Lorsque cela arrive, ne pas tenir compte de l'acide et recommencer à nouveau.

Important: le dosage de fluor dans l'eau pour la consommation humaine est établi en fonction de la moyenne des températures maximales journalières de la localité observées pendant une période déterminée.

Prélèvement et conservation des échantillons pour les analyses physico-chimiques

Paramètres	Récipients	Volume minimum (mL)	Conservation	Temps maximum
Alcalinité	Verre ou polyéthylène	200	Réfrigérer	24h/14d
CO ₂	"	100	Analyse immédiate	-
Dureza	"	100	HNO ₃ pH < 2	6 mois
Chlorures	"	100	pas besoin	7 jours
Aluminium	"	-	HNO ₃ pH < 2	6 mois
Fluorures	Polyéthylène	300	pas besoin	28 jours
Température	-	-	Analyse immédiate	-
Turbidité	Verre ou Polyéthylène	200	Protéger de la lumière	24h
Chlore Résiduel	Verre ou polyéthylène	500	Analyse immédiate	30min/2h
pH	"	200	Analyse immédiate	-
Cor	"	500	Réfrigérer	24h

Source: Adapté de l'APHA, 1985

Remarques:

1. Les volumes décrits ici sont estimés. Dans la pratique, on doit prélever le volume nécessaire pour la réalisation des analyses, car il existe des répétitions d'analyses qui sont souvent nécessaires.
2. Lorsqu'on conserve avec de l'acide nitrique, utiliser 2 ml d'acide pour chaque litre d'échantillon.
3. Normalement, dans les stations de traitement des eaux – ETAs, les analyses doivent être effectuées immédiatement après le prélèvement. Il n'est pas d'usage de laisser les échantillon beaucoup de temps avant de les analyser.

Essai de coagulation (*Jar-Test*)

L'essai de coagulation est une procédure de routine dans les stations de traitement des eaux afin de déterminer le dosage des produits chimiques utilisés dans le traitement.

On peut dire que c'est une simulation de ce qui se passe dans l'ETA.

Afin de réaliser l'essai il est nécessaire de connaître au préalable les caractéristiques suivantes de l'eau brute: la couleur, la turbidité, l'alcalinité, le pH et la température; au-delà des paramètres hydrauliques de la station de traitement tels que la sortie, le temps de détention dans le flocculateur, la vitesse de sédimentation dans le décanteur, etc.

L'essai de coagulation n'est pas une opération très simple, car certaines variables du processus doivent être prises en compte, comme la couleur de la turbidité de l'eau brute, si l'alcalinité naturelle de l'eau est suffisante, si le pH se situe dans la bande optimale de flocculation, le type de coagulant utilisé, etc.

Dans cet exemple pratique, on ne considèrera que les paramètres suivantes: la couleur, la turbidité, le pH et l'alcalinité totale, étant donné que l'objectif principal du test est d'enlever la couleur et la turbidité de l'eau, en appliquant une quantité moindre de coagulant.

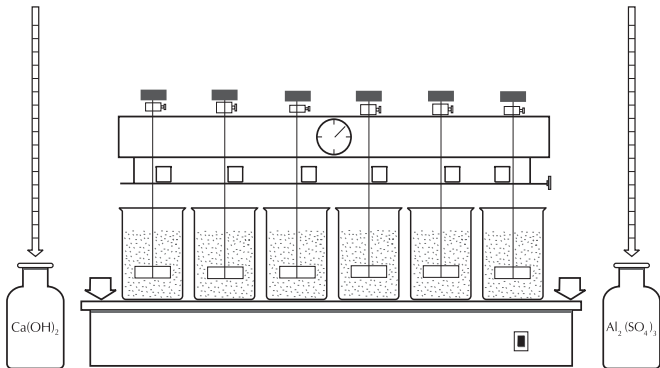
Le produit chimique utilisé est le sulfate d'aluminium, qui est le plus commun.

Etapas du test de coagulation qui doivent être observées

- effectuer l'analyse de l'échantillon brut – couleur, pH, turbidité et alcalinité totale, température;
- découvrir le pH optimal de floculation;
- vérifier le faible dosage du coagulant dans le pH optimal;
- observer la vitesse de sédimentation des flocons;
- analyser les particules surnageant en vérifiant principalement la couleur et la turbidité.

Matériel nécessaire:

- appareil de *Jar-Test* conforme à celui du dessin;
- un bécher de forme basse de 1000 ml;
- de la solution de sulfate d'aluminium à 1%;
- solution de cal à 0,5%;
- des pipettes graduées de 5 et 10 ml.



Source: Adapté de Cetesb, 1973

Procédure 1 (Considérant que l'eau brut ait une alcalinité naturelle suffisante et également un pH optimal de floculation).

- a) placer 6 béchers d'1 litre dans la plateforme de l'appareil de *Jar-Test*;
- b) les remplir avec de l'eau brute jusqu'au niveau de 1000 ml;
- c) allumer l'appareil à vitesse maximale de 100 r.p.m;
- d) ajouter simultanément dans les béchers la quantité de coagulant (sulfate d'aluminium) qui a été calculée pour chaque bécher;
- e) laisser agiter à cette vitesse pendant 2 à 3 minutes (temps de détention dans la chambre de mélange rapide);
- f) réduire la vitesse d'agitation à 50 r.p.m pendant 10 à 30 minutes (temps de détention dans les flocculateurs);
- g) laisser les échantillons décanter pendant un certain temps (ce temps correspond à la vitesse de sédimentation dans le décanteur – 10 à 30 minutes);
- h) recueillir les particules surnageant de tous les béchers et analyser les paramètres nécessaires afin de vérifier lesquels ont présenté le meilleur résultat;
- i) normalement le meilleur résultat est celui qui a présenté la plus grande réduction de couleur et de turbidité et c'est ce dosage qui devra être choisi.

Procédure 2 (Quand l'eau n'a pas d'alcalinité suffisante ou lorsqu'on ne connaît pas le pH optimal de floculation).

- a) placer 6 bechers d'1 litre dans la plateforme de l'appareil de test de *Jar-Test*;
- b) les remplir avec de l'eau brute jusqu'au niveau de 1000 ml;

- c) allumer l'appareil à la vitesse maximale de 100 r.p.m;
- d) établir différents pH dans les bechers en utilisant de l'alcali (chaux hydratée);
- e) appliquer une quantité fixe de sulfate d'aluminium dans tous les béchers et procéder selon les étapes de e) à i) de la procédure 1;
- f) mesurer le pH du flacon qui a présenté le meilleur résultat;
- g) effectuer un nouvel essai, en fixant le pH optimal trouvé dans l'étape antérieure dans tous les béchers;
- h) ajouter du sulfate d'aluminium dans chaque bécher, en variant la concentration dans les valeurs proches (inférieures et supérieures) du dosage utilisé dans e);
- i) procéder selon les étapes de e) à i) de la procédure 1.

Remarques:

1. Selon les altérations dont peut souffrir l'eau brute, conséquence des inondations, des sécheresses des changements climatiques, etc, il est recommandé de toujours effectuer de nouveaux tests pour ajuster les dosage des coagulants.
2. Si l'eau brute n'a pas d'alcalinité naturelle suffisante pour réagir au sulfate d'aluminium, utiliser de la chaux hydratée ou un autre alcali pour créer une alcalinité artificielle.
3. Si l'eau n'a pas un pH optimal de floculation, créer cette condition en utilisant des acides ou des bases (alcalis).
4. L'alcali le plus utilisé est la chaux hydratée.
5. Normalement on utilise du sulfate d'aluminium à 1% et de la chaux à 0,5% pour effectuer les essais, car cela facilite la mesure des volumes utilisés dans le processus.
6. Pour des dosages de sulfate d'aluminium de 10 – 15 – 20 – 25 – 30 et 35 mg/l d'une solution à 1% les volumes suivants sont nécessaires: respectivement 1,0 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,5 ml, 3,0 ml et 3,5 ml. Pour un dosage de chaux, on utilise la moitié de ces volumes en ml.

7. Les vitesses d'agitation, les temps d'agitation et le temps de la décantation dépendent des dimensions des unités de traitement et de la sortie de l'opération.

8. Consulter le tableau ci-dessous afin d'établir la quantité de chaux nécessaire en fonction de la consommation de sulfate d'aluminium.

Consommation de Sulfate d'aluminium mg/L $Al_2(SO_4)_3$	Alcalinité théoriquement nécessaire mg/L ($CaCO_3$)	Alcalinité naturelle désirée ($CaCO_3$)	Quantité théorique de cal mg/L *	Quantité de cal souhaitable mg/L *
10	5	7	3	4
15	7	10	4	6
20	9	14	5	8
25	12	17	7	10
30	14	20	8	12
40	18	27	10	15
50	25	34	13	19

Source: Techniques d'approvisionnement et de traitement de l'eau – vol.II/Cetesb – SP

* s'il n'y a pas d'alcalinité naturelle.

Théoriquement, chaque mg/l de sulfate d'aluminium requiert:

0,45 mg/l d'alcalinité naturelle;

0,25 mg/l de chaux (CaO);

0,33 mg/l de chaux comme $Ca(OH)_2$;

0,48 mg/l de carbonate de sodium – Na_2CO_3 (varech).

Correction du pH de l'eau traitée

La correction du pH de l'eau traitée est un procédé utilisé dans les ETAs afin de prévenir le processus de corrosion des structures métalliques du système de distribution qui est provoqué par l'acidité de l'eau, conséquence de la présence de gaz carbonique dissous.

Les eaux superficielles possèdent du gaz carbonique dissous. Ce gaz carbonique peut provenir de l'atmosphère, de

la respiration des êtres aquatiques et même de la réaction du sulfate d'aluminium quand celui-ci réagit à l'alcalinité naturelle de l'eau.

La correction du pH signifie augmenter le pH de l'eau traitée jusqu'au pH de saturation qui est le point où le processus de corrosion n'apparaît plus. Ce pH n'est pas le même pour toutes les eaux et sa détermination peut être effectuée en laboratoire.

Méthode de détermination

Essai du marbre

Matériel nécessaire:

- a) ballon volumétrique de 1000 ml;
- b) mesureur de pH;
- c) une balance;

Réactif:

Carbonate de calcium

Technique

- a) mettre 750 ml d'eau filtrée dans un ballon volumétrique de 1000 ml;
- b) déterminer le pH et l'alcalinité (l) de cette eau;
- c) ajouter 10 grammes de carbonate de calcium au ballon;
- d) agiter pendant 1/2 heure; laisser décanter et filtrer;
- e) déterminer le pH;

- f) agiter à nouveau le ballon pendant plus d'1/2 heure;
- g) laisser décanter et filtrer;
- h) déterminer à nouveau le pH.

Répéter les procédures "e", "f" et "g" jusqu'à l'obtention d'un pH constant. Le pH de saturation sera le pH constant trouvé. Déterminer dans la dernière opération l'alcalinité (II).

Conclusion

Si l'alcalinité II > alcalinité I => l'eau est corrosive.

Si l'alcalinité II = alcalinité I => l'eau n'est pas corrosive.

Si l'alcalinité II < alcalinité I => l'eau est incrustante.

Détermination de la teneur de chlore actif dans une solution de chlore (hypochlorite de sodium et hypochlorite de calcium)

Matériel nécessaire:

- a) un flacon *Erlenmeyer* de 250 ou 500 ml;
- b) une burette de 50 ml;
- c) 1 pipette volumétrique de 1; 5 et 10 ml;
- d) une balance de précision.

Réactifs:

- a) du thiosulfate de sodium 0,1N ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$);
- b) iodure de potassium (KI);
- c) acide acétique P.A;
- d) indicateur d'amide.

Technique

- a) mesurer 1,0 ml de la solution;
- b) dissoudre dans 50 ml d'eau distillée;
- c) ajouter 5,0 ml d'acide acétique concentré (glacial);
- d) ajouter 1,0 g de iodure de potassium;
- e) titrer avec une solution de thiosulfate de sodium 0,1 N;
- f) noter les ml de thiosulfate utilisés.

Calcul

$$\% \text{ de chlore} = \frac{(A-B) \times N \times 35,45}{P \times 10}$$

où:

A = ml de thiosulfate utilisé dans le titrage de l'échantillon;

B = ml de thiosulfate utilisé en blanc;

N = Normalité du thiosulfate;

P = Poids ou volume du produit.

Observation: Selon la concentration de la solution à être analysée; utiliser un poids ou un volume qui n'ait pas besoin de plus que la capacité de la burette utilisée concernant le thiosulfate de sodium 0,1 N. Effectuer un test en blanc avec de l'eau distillée.

**Préparation des Réactifs
Utilisés dans les Analyses
Constantes dans ce Manuel**



Réactifs pour l'alcalinité

Solution d'acide sulfurique 0,02 N

Pour préparer cette solution, on prépare premièrement une solution 0,1N de la façon suivante:

- a) transférer lentement, avec une pipette, 2,8 ml d'acide sulfurique concentré (96% $d=1,84$) dans un ballon volumétrique de 1000 ml contenant près de 500 ml d'eau distillée;
- b) compléter le volume jusqu'à la marque, avec de l'eau distillée et agiter;
- b) de cette solution, mesurer 200 ml avec une pipette volumétrique et les transférer vers un ballon volumétrique de 1000 ml, en complétant le volume avec de l'eau distillée. Cette solution est approximativement de 0,02 N.

Solution de carbonate de sodium 0,02 N

Pour préparer la solution de carbonate de sodium 0,02 N sécher 1,5 à 2,0 grammes de Na_2CO_3 gris norme primaire à 250°C pendant quatre heures. Refroidir dans un dessiccateur. Ensuite, peser 1.060 grammes, les dissoudre dans 250 ml d'eau distillée et compléter le volume pour obtenir 1000 ml avec de l'eau distillée dans le ballon volumétrique.

Standardisation de la solution

Placer 50 ml d'une solution de carbonate de sodium 0,02 N dans un flacon *Erlenmeyer* de 250 ml et ajouter 4 gouttes d'indicateur méthylorange. Titrer avec H_2SO_4 0,02N jusqu'à ce que l'indicateur ait une légère coloration jaunâtre. Noter le volume d'acide utilisé.

Pour calculer la normalité correcte, utiliser la formule suivante:

$$N = \frac{N' \times V'}{V}$$

où:

N = normalité du H_2SO_4 désirée;

V = volume d'acide utilisé dans le titrage;

N' = normalité du carbonate de sodium;

V' = volume du carbonate de sodium utilisé.

1 ml de H_2SO_4 0,02 N = 1,0 mg de CaCO_3

Solution de thiosulfate de sodium 0,1 N

Peser exactement 25,0 grammes de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, les dissoudre dans un peu d'eau distillée et compléter le volume pour 1000 ml en ballon volumétrique.

Indicateur méthylorange

Peser 0,100 grammes de méthylorange et les dissoudre dans 200 ml d'eau distillée.

Phénolphtaléine

- dissoudre 1 gramme de phénolphtaléine dans un peu d'eau distillée et diluer à 200 ml.
- ajouter des gouttes de NaOH 0,02 N jusqu'à l'apparition d'une légère coloration rose.

Mélange indicateur de vert de bromocrésol/rouge de méthyle

Peser 20 mg de rouge de méthyle, 100 mg de vert de bromocrésol et les dissoudre dans 100 ml d'eau distillée ou d'alcool éthylique à 95%.

Réactifs pour CO₂

Hydroxyde de sodium 0,02 N

- pour préparer cette solution, on prépare premièrement une solution 0,1N de la façon suivante;
- peser rapidement 4,2 grammes d'hydroxyde de sodium sur des lentilles, les mettre ensuite dans un bécher de 500 ml et les dissoudre dans de l'eau distillée libre de gaz carbonique;
- transférer cette solution vers un ballon volumétrique d'1 litre et compléter le volume jusqu'à la marque. Cette solution est approximativement 0,1 Normal.

Standardiser avec une solution d'acide sulfurique 0,1 normal de la façon suivante:

- verser 100 ml d'eau distillée dans un flacon *Erlenmeyer* de 250 ml;
- mesurer avec une pipette volumétrique ou une burette 10 ml de la solution de NaOH 0,1 Normal et la verser dans le flacon *Erlenmeyer* précité;
- ajouter 3 à 4 gouttes de l'indicateur de méthylorange;
- titrer avec une solution d'acide sulfurique 0,1 Normal;
- noter les ml de H₂SO₄ utilisés qui doivent être égaux ou proches de 10.

Si le volume de H_2SO_4 0,1 N utilisé dans le titrage est supérieur ou inférieur à 10 ml, calculer le Facteur de correction (Fc) de la solution de NaOH en utilisant la formule suivante:

$$\text{Fc (NaOH)} = \frac{\text{mL H}_2\text{SO}_4 \times \text{Fc (H}_2\text{SO}_4)}{\text{mL de NaOH}}$$

Noter le Fc sur le bouchon du flacon.

Préparation de la solution d'hydroxyde de sodium N/50:

- verser 200 ml de la solution stock de NaOH 0,1 N dans un ballon volumétrique d'1 litre et compléter avec de l'eau distillée. Cette nouvelle solution est approximativement N/50 (0,02 N).

Standardisation de la solution de NaOH 0,02 N:

- verser 100 ml d'eau distillée dans un flacon *Erlenmeyer* de 250 ml;
- mesurer avec une pipette volumétrique ou une burette 10 ml de la solution de NaOH 0,02 N et la verser dans le flacon *Erlenmeyer* précité;
- ajouter 3 à 4 gouttes de l'Indicateur de méthylorange;
- titrer avec la solution d'acide sulfurique 0,02 N jusqu'à ce que l'indicateur vire;
- noter le volume de H_2SO_4 utilisé qui doit être aux alentours de 10 ml.

Calcul du facteur de correction du NaOH

$$\text{Fc (NaOH) 0,02N} = \frac{\text{mL de H}_2\text{SO}_4 \text{ de 0,02 N} \times \text{Fc (H}_2\text{SO}_4)}{\text{mL de NaOH}}$$

Remarques:

1. Il n'est pas facile de visualiser lorsque l'indicateur vire. Effectuer un test blanc avec 100 ml d'eau distillée pour comparer la couleur au moment où l'indicateur vire;
2. En ajoutant l'indicateur, la solution devient jaunâtre et à la fin du titrage la solution reste légèrement jaunâtre;
3. L'eau libre de CO₂ peut être obtenue en bouillant de l'eau distillée pendant 15 minutes et en la refroidissant rapidement à température ambiante.

Phénolphthaléine

- a) dissoudre 1 gramme de phénolphthaléine dans un peu d'eau distillée et diluer à 200 ml;
- b) ajouter quelques gouttes de NaOH 0,02N jusqu'à l'apparition d'une légère coloration rose.

Réactifs pour l'analyse de chlorures

Solution-standard de Nitrate d'argent 0,0141 N

- a) peser 2,395 grammes de AgNO₃ et les dissoudre dans un peu d'eau distillée. Compléter pour obtenir un litre en ballon volumétrique;
- b) standardiser contre une solution de chlorure de sodium 0,0141N; 1,00 ml = 500 µg Cl⁻;
- c) conserver la solution dans un flacon sombre.

Chlorure de sodium 0,0141 N

- a) dissoudre 824,1 mg de chlorure de sodium sec à 140°C dans une eau libre de chlorures et diluer pour obtenir 1000 ml. 1,00 ml = 500 µg Cl⁻.

Standardisation de la solution de nitrate d'argent 0,0141 N

- utiliser 100 ml d'échantillon (NaCl 0,0141 N) ou une portion diluée à 100 ml;
- ajuster le pH entre 7 et 10 avec NaOH ou H₂SO₄ 1 N;
- ajouter 1 ml de K₂CrO₄ (chromate de potassium);
- titrer avec une solution de nitrate d'argent 0,0141 N jusqu'à l'apparition d'un jaune rougeâtre;
- noter le volume de nitrate d'argent utilisé dans le titrage;
- calculer le facteur de correction du AgNO₃ 0,0141 N en utilisant la formule suivante:

$$F_c = \frac{100}{V_p}$$

où:

F_c = Facteur de correction.

V_p = Volume de AgNO₃ utilisé dans le titrage.

Solution indicatrice de chromate de potassium (K₂CrO₄)

- peser 50 grammes de K₂CrO₄ et les dissoudre dans un peu d'eau distillée;
- ajouter de la solution d'AgNO₃ 0,0141 N jusqu'à la formation d'un précipité rouge;
- laisser reposer pendant 12 heures;
- filtrer et compléter le volume pour obtenir 1000 ml avec de l'eau distillée.

Hydroxyde de sodium (NaOH) 1N

- a) peser 40 grammes d'hydroxyde de sodium, les dissoudre dans un peu d'eau distillée et diluer dans 1 litre;
- b) conserver dans un flacon en polyéthylène ou verre pirex.

Acide sulfurique (H₂SO₄) 1N

- a) verser environ 500 ml d'eau distillée dans un bécher de 1000 ml;
- b) verser ensuite lentement 28 ml d'acide sulfurique concentré dans le bécher précité en remuant en permanence;
- c) laisser refroidir;
- d) verser dans un ballon volumétrique de 1000 ml et compléter le volume avec de l'eau distillée, en homogénéisant;
- e) stocker en flacons de polyéthylène ou en verre pirex.

Remarques:

1. remuer avec un bâton en verre;
2. ne jamais ajouter d'eau dans l'acide, mais de l'acide dans l'eau.

Réactifs pour l'analyse de la dureté

Solution standard d'EDTA 0,01 M

- a) peser 3,723 grammes de EDTA (sel disodique de l'acide éthylène diamine tétra acétique), le dissoudre dans de l'eau distillée et le diluer dans 1000 ml;
- b) standardiser contre une solution standard de carbonate de calcium;
- c) conserver cette solution dans un flacon de polyéthylène.

Solution standard de calcium

- peser 1,0 gramme de carbonate de calcium anhydre (CaCO_3) standard primaire et le verser dans un flacon *Erlenmeyer* de 250 ml;
- ajouter peu à peu, à l'aide d'un entonnoir du HCl 1:1 jusqu'à dissolution complète du CaCO_3 ;
- ajouter 200 ml d'eau distillée et bouillir pendant quelques minutes pour éliminer le CO_2 ;
- refroidir et ajouter quelques gouttes de rouge de méthyle, ajuster pour obtenir une couleur orange intermédiaire en ajoutant du NH_4OH 3N ou du HCl 1:1;
- verser ce mélange dans un ballon volumétrique de 1000 ml et compléter le volume avec de l'eau distillée (1 ml de cette solution = 1,0 mg de CaCO_3).

Standardisation de la solution d'EDTA 0,01 M

- mesurer 25 ml de la solution-standard de calcium et diluer pour 50 ml avec de l'eau distillée en flacon *Erlenmeyer* de 125 ml;
- ajouter 1 à 2 ml de la solution tampon para obtenir un pH d'environ $10 \pm 0,1$;
- ajouter 0,05 grammes d'indicateur ériochrome noir T;
- titrer avec de l'EDTA 0,01 M goutte à goutte jusqu'à la disparition de la dernière coloration violacée et l'apparition de la couleur bleue indiquant le point final du titrage.

Calcul:

$$F_c = \frac{25}{V_p}$$

où:

F_c = Facteur de Correction;

V_p = Volume d'EDTA utilisé dans le titrage.

Solution tampon pour la dureté

- a) peser 16,9 grammes de chlorure d'ammoniac (NH₄Cl) et les dissoudre dans 143 ml d'hydroxyde d'ammoniac concentré (NH₄OH);
- b) ajouter 1,25 grammes de sel de magnésium d'EDTA et diluer à 250 ml avec de l'eau distillée.

Observation: Si vous ne disposez pas de sel de magnésium d'EDTA, dissoudre 1,179 grammes de sel sodique d'EDTA et 780 mg de MgSO₄.7H₂O ou 644 mg de MgCl₂.6H₂O dans 50 ml d'eau distillée et ajouter le tout à la solution de l'étape a) en complétant le volume pour 250 ml avec de l'eau distillée.

Indicateur noir ériochrome T

- a) peser 0,5 grammes de noir ériochrome T sur un verre de montre;
- b) peser 100 grammes de chlorure de sodium P. A. dans un bécher;
- c) verser les deux réactifs dans un mortier et mouler le mélange jusqu'à ce qu'il se transforme en poudre;
- d) stocker dans des flacons à ouverture large, bien fermés.

Inhibiteur I – cyanure de sodium P.A.

Utiliser 250 mg dans la solution à titrer.

Inhibiteur II – sulfure de sodium

- peser 5 grammes de sulfure de sodium ($\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$) ou 3,7 grammes de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$;
- dissoudre dans 100 ml d'eau distillée;
- conserver dans un flacon de verre bien fermé afin d'éviter sa détérioration par le contact avec l'air.

Solution standard de couleur

- peser 1,246 grammes de chloroplatinate de potassium (K_2PtCl_6) et 1,0 gramme de chlorure cobalté cristallisé ($\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$);
- dissoudre dans de l'eau distillée;
- ajouter 100 ml d'acide chlorhydrique concentré et diluer pour 1000 ml avec de l'eau distillée. (cette solution équivaut à 500 unités de couleur).

Réactifs pour l'analyse de l'aluminium

Acide sulfurique (H_2SO_4) 0,02N

- préparer de la même façon que pour l'alcalinité totale.

Acide ascorbique

- peser 0,1g d'acide ascorbique, le dissoudre dans un peu d'eau distillée et compléter le volume pour 100 ml. Cette solution devra être préparée quotidiennement.

Réactif tampon

- peser 136 g d'acétate de sodium ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) et les dissoudre dans de l'eau distillée. Ajouter 40 ml de solution d'acide acétique 1N et diluer pour 1000 ml avec de l'eau distillée.

Solution d'acide acétique 1N

- a) mesurer 58 ml d'acide acétique concentré et diluer pour 1000 ml avec de l'eau distillée.

Solution de ériochrome Cyanine –R (stock)

- a) peser et dissoudre 150 mg du colorant dans environ 50 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 2,9 avec de l'acide acétique 1:1 (2 ml d'acide sont nécessaires). Diluer pour 100 ml avec de l'eau distillée.

Solution de travail (ériochrome Cyanine –R)

- a) mesurer 10 ml de la solution-stock et diluer pour 100 ml avec de l'eau distillée. Cette solution reste stable pendant 6 mois.

Solution indicatrice de méthylorange

- a) peser et dissoudre 100 mg de méthylorange dans 200 ml d'eau distillée.

Solution stock d'Aluminium (1ml = 500 µg Al)

- a) peser 8,791 g de sulfate double d'aluminium et de potassium ($\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) et les dissoudre dans un peu d'eau distillée. Compléter le volume pour 1000 ml dans un ballon volumétrique.

Solution-standard d'Aluminium (1ml = 5 µg)

- a) diluer 10 ml de la solution stock d'aluminium pour 1000 ml avec de l'eau distillée dans un ballon volumétrique. Préparer quotidiennement.

Observation: 1) tous les réactifs doivent être préparés avec de l'eau distillée libre d'aluminium.
2) effectuer toutes les procédures qui déterminent la dilution ou le complément pour x ml en ballon volumétrique.

Solution d'EDTA 0,01M

- a) peser et dissoudre 3,7 grammes d'EDTA dans 1000 ml d'eau distillée.

Réactifs pour l'analyse de fluorures

Solution-standard de fluorures

- a) préparer une solution-stock en dissolvant 221,0 mg de fluorure de sodium anhydre (NaF) dans de l'eau distillée et diluer à 1000 ml (1 ml de cette solution équivaut à 100 µgF);
- b) diluer 100 ml de la solution stock précitée pour 1000 ml avec de l'eau distillée (1 ml = 10 µgF).

Réactif zirconium-alizarine

- a) peser et dissoudre 300 mg d'oxychlorure de zirconium ($ZrOCl_2 \cdot 8H_2O$), dans 50 ml d'eau distillée et verser dans un flacon volumétrique de 1000 ml avec un couvercle;
- b) peser et dissoudre 70 mg de mono sulfate d'alizarine dans 50 ml d'eau distillée;
- c) verser la solution 2 dans la solution 1, lentement en remuant;
- d) la solution résultante devra reposer quelques minutes.

Mélange acide

- a) mesurer 101 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCl) et diluer pour approximativement 400 ml avec de l'eau distillée;
- b) ajouter précautionneusement 33,3 ml d'acide sulfurique concentré (H_2SO_4) dans environ 400 ml d'eau distillée;
- c) mélanger les deux solutions après refroidissement.

Réactifs *Scott-Sanchis*

- a) ajouter le mélange acide à la solution réactive Zirconil-alizarine;
- b) compléter le volume pour 1000 ml avec de l'eau distillée et mélanger;
- c) conserver dans un flacon ambre et dans un endroit protégé de la lumière directe. Ce réactif reste stable pendant 6 mois.

Arsénite de sodium

- a) peser 5 g d'arsénite de sodium (NaAsO_3) et dissoudre dans un peu d'eau, diluer pour 1 litre avec de l'eau distillée (utiliser 1 goutte pour chaque 0,1 mg de chlore existant dans l'échantillon).

Observation: cette solution est toxique – éviter l'ingestion et le contact avec la peau.

Réactifs pour l'analyse de la teneur du chlore actif:

Thiosulfate de sodium 0,1 N – Dissoudre 25 grammes de thiosulfate de sodium $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dans 1 litre d'eau distillée récemment bouillie. Stocker pendant deux semaines et standardiser avec du dichromate de potassium $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 0,1 N.

Remarques:

1. Utiliser de l'eau distillée bouillie dans la préparation du thiosulfate.
3. Ajouter quelques millilitres de chloroformions (± 5 ml) pour minimiser la décomposition bactérienne de la solution de thiosulfate.

Dichromate de potassium 0,1 N – Peser 4,904 grammes de dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), dissoudre dans un peu d'eau distillée et diluer de suite pour un litre. Stocker dans un flacon en verre avec un couvercle en verre.

Solution indicatrice d'amide – Peser 5,0 grammes d'amide. Ajouter un peu d'eau distillée jusqu'à former une pâte. Dissoudre de suite cette pâte dans un litre d'eau distillée bouillante. Laisser reposer pendant une nuit. Utiliser le liquide surnageant en le préservant afin d'ajouter 1,25 grammes d'acide salicylique.

Standardisation de la solution de thiosulfate de sodium 0,1N

Matériel nécessaire:

- a) burette de 50 ml;
- b) flacon *Erlenmeyer* de 250 ml;
- c) pipette graduée de 1 ml;
- d) pipette volumétrique de 10 ml.

Procédure:

- a) verser 80 ml d'eau distillée dans le flacon *Erlenmeyer*;
- b) ajouter, sans cesser de remuer, 1 ml de H_2SO_4 concentré et 10 ml de dichromate de potassium 0,1 N;
- c) ajouter 1,0 gramme de iodure de potassium;
- d) laisser réagir le mélange pendant 6 minutes dans l'obscurité;
- e) titrer avec la solution de thiosulfate de sodium jusqu'à l'apparition d'une coloration jaune clair;
- f) ajouter 1,0 ml de la solution d'amide et continuer le titrage jusqu'à la disparition de la couleur bleue formée.

Calcul

$$\text{Normalité} = \frac{1}{\text{mL de thiosulfate consommé}}$$

Règles générales pour corriger les solutions titrées

La correction des solutions titrées est une procédure très utilisée en laboratoire. Elle sert à mesurer le degré d'exactitude des solutions standardisées. Périodiquement, le technicien doit vérifier l'exactitude de ces solutions pour que les résultats des analyses soient les plus corrects possibles.

Règle 1

Lorsque le volume consommé de la solution à titrer est égal au volume de la solution-standard pris pour le titrage, cela signifie qu'elle est exacte. Ex.: 10 ml de HCl 0,1N ont été consommés pour titrer 10 ml de Na_2CO_3 0,1N.

Règle 2

Lorsque le volume consommé de la solution à titrer est inférieur que le volume du standard pris, cela signifie que la solution à titrer est plus concentrée. Dans ce cas, corriger de la façon suivante: Ex.: 8,3 ml de HCl 0,1 N ont été utilisés dans le titrage de 10 ml de Na_2CO_3 0,1N; en appliquant l'équation suivante, nous avons: 8,3: 10:: x: 1000.

Les calculs effectués donnent:

$$10x = 8,3 \times 1000$$

$$x = 8300/10 \quad \therefore \quad x = 830 \text{ ml}$$

Ensuite, on mesure 830 ml de la solution à titrer et on complète à 1000 ml avec de l'eau distillée. Faire un nouveau titrage pour vérifier la rigueur du dosage qui ne doit pas rester au-dessous de 9,9 et au-dessus de 10,1 ml.

Règle 3

Si le volume de la solution à titrer est supérieur à celui de la solution standard, cela signifie que la solution à titrer est plus diluée. Dans ce cas, on calcule le facteur de correction de la façon suivante:

Exemple: 10,5 ml d'une solution de HCl 0,1N ont été consommés pour titrer 10 ml d'une solution standard de Carbonate de Sodium.

En appliquant l'équation suivante, nous avons:

$$10,5: 10:: 1: x$$

Les calculs effectués donnent:

$$10 = 10,5x \quad x = 10/10,5 \quad x = 0,9524$$

Le facteur de correction de la solution est donc de 0,9524.

Nettoyage du matériel en verre au laboratoire

La précision et l'exactitude des analyses sont liées, entre autres facteurs, à l'usage du matériel de verre au laboratoire.

Il est donc nécessaire que toute la verrerie soit parfaitement propre, libre d'impuretés, telles que les savons, détergents et autres produits qui peuvent adhérer aux parois des récipients.

La verrerie peut en général simplement être lavée avec de l'eau, de l'eau et du savon neutre ou par le biais de solutions spéciales, comme la solution sulfochromique, par exemple.

Procédure de lavage

Pour de la verrerie neuve:

- a) la majorité des matériels en verre neuf est légèrement alcaline, de ce fait ces matériels doivent tremper pendant quelques heures dans une solution d'acide chlorhydrique ou nitrique à 1% avant d'être lavés.

Pour de la verrerie déjà utilisée:

- a) Les matériels en verre déjà utilisés avec un milieu de culture (boîtes de Pétri, tubes de culture), doivent être stérilisés avant d'être lavés. Ensuite ils doivent être placés dans un grand récipient contenant de l'eau et 1 à 2% de savon ou de détergent, en les laissant bouillir pendant 30 minutes. Ils doivent ensuite être rincés à l'eau courante, nettoyés avec des détergents neutres et rincés à nouveau;
- b) Dans certaines situations où les matériaux de verre ne pourraient pas être propres avec des détergents communs ou d'autres produits de nettoyage, il serait nécessaire d'utiliser un mélange constitué d'acide sulfurique et de solution saturée de dichromate de sodium, préparée de la façon suivante: mélanger 1 litre d'acide sulfurique concentré avec 35 ml de la solution saturée de dichromate de sodium. Cette solution ne doit pas être utilisée pour le lavage de verreries utilisées pour l'analyse du chrome.

Remarques:

1. La solution précitée est acide et attaque la peau;
2. ne pas permettre le contact entre la main et la solution;
3. la solution attaque les tissus. Eviter le contact avec les affaires;
4. ne pas laver avec cette solution les verres collés comme les cuves utilisées dans les spectrophotomètres, les cuves de turbidité, etc.;

5. après avoir passé cette solution sur la verrerie, la rincer à grande eau et tout de suite après avec de l'eau distillée.

Relation de matériels de laboratoire d'analyse de l'eau

Equipements

- a) autoclave verticale, d'une capacité de 18, 24, 48 ou 72 litres et 110/220 volts;
- b) incubateur pour la culture bactériologique, avec un thermostat réglable allant de 30 à 65°C, ayant une taille de 45x45x40 cm respectivement de largeur, profondeur et hauteur, et équipée d'un plateau réglable à 3 positions;
- c) balance analytique; électrique avec une capacité de 160 g, une sensibilité de 1/100 mg, cinq décimales et 110/220 volts;
- d) balance de précision avec une échelle doublé et un pesage maximum de 200 grammes et une sensibilité de 0,1 g;
- e) distillateur d'eau, capacité de 2 litres/heure et 110/220 volts;
- f) bain-marie d'une capacité de 50 tubes à essai, avec un thermostat réglable de 35 à 65°C et 110/220 volts;
- g) bain de vapeur, pour 6 essais simultanés; construit en plaque métallique, avec un thermostat réglable jusqu'à 6 positions et 110/220 volts;
- h) chapelle pour l'échappement forcé de gaz, avec un moteur électrique de 1/3 de HP et 110/220 volts;
- i) plaque chauffante avec un thermostat réglable, de taille x et 110/220 volts;

- j) incubateur pour la stérilisation et le séchage, taille respectivement de 50x40x50 cm de largeur, profondeur et hauteur, avec un thermostat réglable jusqu'à 300°C ainsi qu'un plateau réglable à 3 positions et 110/220 volts;
- k) appareil de *Jar-Test* pour 6 tests simultanés, avec un régulateur de vitesse de 0 à 100 rpm, sur une base de verre ou acrylique illuminé et 110/220 volts;
- l) mesureur de chlore résiduel, portable, avec un disque de couleur, une échelle de 0 à 3,5 mg/l, pour une utilisation au réactif DPD;
- m) thermomètre bactériologique, avec une échelle de 0 à 60°C et des divisions de 1°C;
- n) thermomètre chimique ayant une échelle de 0 à 300°C et des divisions de 1°C;
- o) turbidimètre complet;
- p) mesureur digital de pH, sur pied avec une bande de mesure de 0 à 14, un électrode, ainsi que 110/220 volts;
- q) mesureur digital de pH, portable ayant une bande de mesure de 0 à 14, un électrode et fonctionnant avec une batterie de 9 volts;
- r) lanterne pour l'identification du *E. coli*, avec une lampe fluorescente ultraviolette, 6 watts, 365 nm, rechargeable, portable et de 110 volts;
- s) bec de Bunsen;
- t) déionisateur d'une capacité de 50 litres/heure et de 110/220 volts.

Verrerie

- a) tube pour culture, sans bord, taille 150 x 16 mm;

- b) tube pour culture, sans bord, taille 180 x 18 mm;
- c) tube pour culture, sans bord, taille 125 x 15 mm;
- d) tube de Nessler, de forma haute, capacité de 50 et 100 ml;
- e) tube de Durhan, taille 40 x 5 mm;
- f) ballon volumétrique, fond plat, avec un couvercle en téflon ou en verre abrasé, classe "A" ayant une capacité de de 50, 100,250, 500 et 1000 ml;
- g) bécher de forme basse, gradué, d'une capacité de 50, 100, 250, 500 et 1000 ml;
- h) burette avec un robinet en verre ou en téflon, à enregistrement permanent, casse "A" et une capacité de 10, 25, et 50 ml;
- i) pipette sorologique, codifiée par couleurs, avec un bocal pour le coton, à enregistrement permanent et une capacité de 1, 2, 5 et 10 ml;
- j) pipette de MOHR, codifiée par couleurs, un bocal et un bec tempérés, un enregistrement permanent et une capacité de 1, 2, 5 et 10 ml;
- k) pipette volumétrique, codifiée par couleurs, un bocal et des becs tempérés, un enregistrement permanent, classe A et une capacité de 10, 25, 50 et 100 ml;
- l) flacon de verre pour les réactifs, évasé, de couleur blanche avec bouchon de verre dépoli interchangeable et une capacité de 125 ml;
- m) bécher gradué à conter, avec une base hexagonale en verre, un enregistrement permanent, classe "A" et une capacité de 10, 25,50, 100, 250, 500 et 1000 ml;
- n) flacon *Erlenmeyer*, ouverture large renforcée, gradué et d'une capacité de 125, 250 et 500 ml;

- o) entonnoir analytique avec un angle de 60°, lisse, avec une tige courte et un diamètre de 50, 75 et 100 mm;
- p) entonnoir analytique avec un angle de 60°, rayé, avec une tige longue et un diamètre de 50, 75 et 100 mm;
- q) entonnoir analytique avec un angle de 60°, rayé, avec une tige courte et un diamètre de 50, 75 et 100 mm;
- r) Boîte de Pétri en verre, transparent, de taille 100 x 15 mm;
- s) ensemble de distillation pour les fluorures, constitué d'un ballon de fond plat de 1000 ml ayant une sortie latérale pour le condensateur Graham, avec des joints abrasés;
- t) bâton de verre de 30 cm de longueur x 5 mm de diamètre;

Matériels divers

- a) anse de platine calibrée à 3 mm de diamètre;
- b) câble Kolle pour manipuler le platine;
- c) coton en feuille pour la bactériologie;
- d) crayon dermatographique;
- e) bouillon lactosé, déshydraté, en emballage de 100 ou 500 grammes;
- f) bouillon lactosé, bilié vert brillant à 2%, déshydraté, en emballage de 100 ou 500 grammes;
- g) milieu *ENDO MF*, pour coli total, en emballage de 100 ou 500 grammes;
- h) milieu *EC MF*, pour coli fécal, en emballage de 100 ou 500 grammes;
- i) pourpre de bromocrésol en emballage de 5 grammes;
- j) étagère pour tubes à essai, avec une capacité de 15 tubes de 180 x 18 mm, en bois ou en plastique résistant.

- k) étagère pour tubes à essai avec une capacité de 40 tubes de 180 x 18 mm, en fil métallique résistant à l'autoclavage;
- l) bouillon tryptose lauryl sulfate, déshydraté, en emballage de 100 ou 500 grammes;
- m) milieu EC, déshydraté, en emballage de 100 ou 500 grammes.
- n) *Plate count agar*, déshydraté, en emballage de 100 ou 500 grammes;
- o) substrat chromogène pour la détermination enzymatique qualitative de coliformes totaux e *E. coli* en échantillons de 100 ml d'eau, conditionné en boîtes de 20 ampoules;
- p) panier métallique avec une capacité de 50 tubes à essai de 180 x 18 mm, résistant à autoclavage;
- q) support pour tube de Nessler de 50 et 100 ml, en bois ou en aluminium avec une capacité de 8 tubes;
- r) papier d'aluminium, mesurant 7,5 m de longueur x 30 cm de largeur;
- s) coton hydrophile, paquet de 500 grammes;
- t) Boîte de Petri en plastique, stérilisée, de 47 mm de diamètre;
- u) filtres stérilés de 47 mm de diamètre, 0,45µm de porosité avec un carton absorbant, en emballage de 100 unités;
- v) ensemble porte-filtre de membrane, en acier inoxydable, avec un dispositif pour la stérilisation sur le champ;
- w) pince en acier inoxydable de 10 cm de longueur.

La biosécurité en laboratoire

Dans ce manuel ne sont contenues que les principales procédures en matière de biosécurité en laboratoire, procédures qui devront être respectées par les techniciens qui travaillent dans ce domaine.

Procédures d'ordre personnel:

- a) ne pipeter aucune sorte de liquide avec la bouche;
- b) utiliser des lunettes de protection dans les endroits du laboratoire où l'utilisation est obligatoire;
- c) ne pas mettre les mains à la bouche ou se toucher les yeux lors de manipulation de produits chimiques;
- d) ne pas conserver les aliments dans le réfrigérateur du laboratoire;
- e) ne pas manger à l'intérieur du laboratoire;
- f) ne pas fumer à l'intérieur du laboratoire;
- g) toujours utiliser un tablier ou une blouse à manches longues avec un élastique aux poignets et l'enlever en sortant du laboratoire;
- h) Se laver les mains consciencieusement avec assez d'eau et de savon avant de manger;
- i) ne pas manipuler de produits toxiques sans s'assurer avant de leur toxicité.

Procédures relatives au laboratoire

- a) maintenir les comptoirs du laboratoire toujours propres et libres de matériels étrangers au travail;

- b) retirer du comptoir les matériels, échantillons et réactifs employés au travail après les avoir utilisés;
- c) nettoyer immédiatement n'importe quel épanchement de produits et de réactifs avec les précautions nécessaires;
- d) en vidant un flacon de réactif, le nettoyer préalablement avec de l'eau avant de le mettre au lavage;
- e) étiqueter immédiatement n'importe quel réactif ou solution préparés, ainsi que les échantillons collectés;
- f) ne pas jeter des produits corrosifs concentrés dans l'évier; il faut d'abord les diluer;
- g) dans la préparation de solutions acides ne jamais ajouter d'eau dans l'acide mais de l'acide dans l'eau;
- h) ne pas jeter dans l'évier des liquides inflammables et ou volatils; les stocker dans des récipients adéquats;
- i) disposer les cylindres avec des gaz dans un endroit externe au laboratoire, correctement conditionnés;
- j) utiliser une chambre de flux laminaire (cabine de sécurité biologique) pour la manipulation de milieux de culture et pour la recherche microbiologique;
- k) utiliser une chambre d'extinction (cabine de sécurité chimique) avec un purificateur de gaz lors de l'utilisation de liquides inflammables et/ou volatils.

Procédures relatives à l'utilisation de la verrerie:

- a) ne pas utiliser de matériels en verre fissurés;
- b) utiliser des gants en amiante pour manipuler les objets en verre qui sont chauds;
- c) ne pas laisser les flacons chauds sans protection sur les étagères du laboratoire, les placer sur des plaques d'amiante;

- d) ne pas chauffer de récipient en verre directement avec une flamme, utiliser un écran d'amiante;
- e) ne pas pressuriser les récipients en verre;
- f) ne pas oublier le verre lorsqu'il est en train de chauffer, toujours utiliser un minuteur ou un réveil;
- g) ne pas utiliser de flacons pour échantillons qui ne soient pas parfaitement propres et sans s'assurer de leur adéquation à l'utilisation qui va en être faite;
- h) utiliser des gants de cuir et des lunettes de sécurité, à chaque manipulation de bouchon en liège ou en caoutchouc, de tubes en verre ou de thermomètres;
- i) jeter les couvercles en verre bloqués;
- j) jeter les morceaux de verre – utiliser une pelle et un balai;
- k) utiliser une protection faciale et des gants de pelica pour remuer des solvants volatils dans des flacons fermés.

Procédure pour l'utilisation d'équipements en général

- a) avant d'utiliser n'importe quel équipement, lire les instructions d'utilisation fournies par le fabricant;
- b) ne jamais allumer les appareils sans vérifier le voltage avant;
- c) ne pas installer ni mettre en marche d'équipements électriques sur des superficies humides;
- d) ne pas laisser d'appareils électriques allumés dans le laboratoire après utilisation, excepté ceux qui ont un besoin constant d'énergie comme les réfrigérateurs, les incubateurs, etc.;
- e) éteindre le feu sur des appareils électriques seulement avec un extincteur de CO₂;

- f) Garder les équipements de sécurité dans un local facilement accessible et à portée de tous les employés du laboratoire, tels que:
- extincteur d'incendie;
 - douche d'urgence;
 - lave-yeux;
 - couverture de sécurité;
 - masque à gaz;
 - masque et lunettes de sécurité, etc.



Annexe A
Collecte et conservation d'échantillons pour
Comptage des cellules de cyanobactéries et
cyanotoxines



Introduction

A la fin de l'élaboration de ce manuel, déjà révisé et adapté à la législation actuelle concernant la qualité de l'eau pour la consommation humaine, les procédures de base de collecte d'échantillons de l'eau afin de d'identifier et de compter les cyanobactéries dans les sources d'approvisionnement ont été incluses.

Une telle initiative est due à une eutrophisation en hausse des milieux aquatiques qui a été produite principalement par l'activité humaine, causant un enrichissement artificiel de ses écosystèmes. Les sources principales de cet enrichissement ont été identifiées comme les déversements d'égouts domestiques et industriels des centres urbains ainsi que la pollution diffuse venant des régions agricoles. Cette eutrophisation artificielle produit des changements dans la qualité de l'eau, dont: la réduction de l'oxygène dissout, la perte des qualités scéniques, c'est-à-dire, des caractéristiques esthétiques du milieu et de son potentiel de loisir, la mort de nombreux poissons et l'augmentation de l'incidence de floraison de micro-algues et de cyanobactéries, avec des conséquences négatives sur l'efficacité et le coût du traitement de l'eau, lorsqu'il s'agit de la source d'approvisionnement public. Ces floraisons ou "blooms" se caractérisent par une croissance intense de ces micro-organismes sur la surface de l'eau, formant une couche dense de cellules de plusieurs centimètres de profondeur, ayant des conséquences sur la santé publique.

Collecte et conservation d'échantillons pour le comptage de cellules de cyanobactéries

Matériel nécessaire

- a) Flacon en polyéthylène ou en verre ambré d'une capacité de 1000 ml;

- b) une bouteille de Van Dorn ou similaire;
- c) Solution de lugol;
- d) Solution de formaldéhyde à 40%;
- e) Equipements de protection individuelle (gants, bottes et masque).

Définition du point de collecte de l'échantillon

- a) s'il y a floraison de cyanobactéries, l'échantillon devra être collecté dans le point de concentration le plus élevé de cette dernière;
- b) s'il n'y a pas de floraison de cyanobactéries, l'échantillon devra être collecté dans le point de captation de l'ETA, dans la source.

Identification des échantillons

- a) tous les échantillons devront être identifiés par une numération sur le flacon de collecte, faisant référence à la fiche de collecte ou fiche de prélèvement;
- b) les fiches de prélèvement accompagneront les échantillons et devront comporter les données suivantes: nom et adresse de l'intéressé, nom de la source, type de source, date et heure de la collecte, description du local de collecte, – GPS, nom du collecteur, apparition de phénomènes.

Procédure de collecte – échantillon de superficie

- a) nettoyer le flacon de collecte au moins trois fois;
- b) remplir le conteneur avec un échantillon collecté, en laissant un volume d'air dans la partie supérieure du flacon;

- c) collecter au minimum 1000 ml d'échantillon pour eau brute;
- d) collecter 4.000 ml d'échantillon pour eau traitée.

Observation: collecter seulement dans des flacons ambre

Conservation, conditionnement et transport de l'échantillon

- a) milieux oligotrophes: conserver les échantillons dans de la solution Lugol (ajouter 1ml/l);
- b) milieux eutrophisés: conserver les échantillons dans une solution formaldéhyde à 40%(ajouter 2ml/L)
- c) conserver l'échantillon à 4°C;
- d) conditionner dans des caisses thermiques et;
- e) envoyer au laboratoire dans un délai maximum de 8 heures.

Collecte et conservation des échantillons pour la détermination de cyanotoxines

Matériel utilisé

- a) flacon en polyéthylène ou en verre ambré, d'une capacité de 1000 ml;
- b) équipements de protection individuelle (gants, bottes et masque;

Définition du point de collecte de l'échantillon

- a) s'il y a une floraison de cyanobactéries, l'échantillon devra être collecté dans le point de concentration le plus élevé de cette dernière;

- b) s'il y a une floraison de cyanobactéries et que le comptage de ces dernières dépasse 20.000 cellules/ml, des échantillons devront être collectés à la source et à la sortie de l'ETA, selon le décret MS n° 2914/2011;
- c) s'il n'y a pas de floraison de cyanobactéries, un échantillon devra être collecté au point de captation de l'ETA, à la source.

Identification des échantillons

- a) tous les échantillons devront être identifiés par une numérotation sur le flacon de collecte même, mentionnant également les fiches de collecte ou fiches de prélèvement;
- b) les fiches de prélèvement accompagneront les échantillons et devront comporter les données suivantes: nom et adresse de l'intéressé, nom et type de la source, date et heure de collecte, description du local de collecte – GPS, nom du collecteur et apparition de phénomènes.

Procédures de collecte de fraction particulaire

Matériel nécessaire

- a) nettoyer le flacon de collecte au moins trois fois;
- b) remplir le contenant avec l'échantillon collecté, en laissant un volume d'air dans la partie supérieure du flacon;
- c) collecter au minimum 1000 ml d'échantillon de eau brute;
- d) collecter 4000 ml d'échantillon de eau traitée;

Conservation, conditionnement et transport de l'échantillon

- a) conserver l'échantillon à 4°C;
- b) conditionner dans des caisses thermiques et envoyer au laboratoire dans un délai maximum de 8 heures.

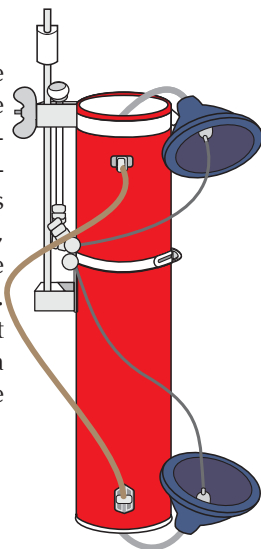
Observation: si l'échantillon ne peut pas être envoyé au laboratoire le jour de la collecte, cette dernière devra être congelée et envoyée au laboratoire dans un délai de 15 jours.

Lavage des flacons

Pour laver les flacons de collecte et de conservation d'échantillons pour l'analyse de cyanotoxines, il est suggéré de procéder de la façon suivante: laisser les flacons immergés dans du savon neutre pendant 12 heures, les laver ensuite exhaustivement avec de l'eau et les immerger dans une solution de HCl à 5% pendant 12 heures, les laver de nouveau exhaustivement avec de l'eau distillée et les sécher. Si le flacon avait déjà été utilisé pour une collecte d'échantillons contenant des cyanobactéries, l'immerger dans une solution d'eau sanitaire pendant 30 minutes antes de passer à l'étape du savon neutre.

Bouteille de van Dorn

La bouteille de van Dorn (fig.) consiste en un tube de PVC d'un volume de 2; 5 et 7 litres ou plus. Le fonctionnement consiste à plonger la bouteille ouverte par les deux extrémités jusqu'à atteindre le point désiré, laisser tomber le loquet qui ferme hermétiquement les deux extrémités. L'échantillon est retiré par le robinet qui est sur la partie latérale de la bouteille en déconnectant la partie supérieure.



Annexe B
Détermination du *Giardia sp* et du *Cryptosporidium sp* dans l'eau par la technique de filtration, de séparation immunomagnétique et de microscopie de l'immunofluorescence



Introduction

La transmission de protozooses via l'approvisionnement d'eau, en particulier le *Giardia* et le cryptosporidium, est un sujet de préoccupation grandissant pour la santé publique.

Les protozoaires sont des micro-organismes eucariotiques, unicellulaires, sans parois cellulaires qui se nourrissent de bactéries et d'autres organismes. La plupart des protozoaires sont à l'état libre et on les rencontre fréquemment dans les eaux superficielles, dont (où ?) beaucoup d'espèces sont parasites. Les effets sur la santé découlant de l'exposition aux protozoaires présents dans l'eau de consommation sont multiples. L'effet le plus commun se manifeste par des dérangements gastro-intestinaux, normalement de courte durée. Cependant, chez les individus sensibles, tels que les enfants, les personnes âgées et les immunodéprimés, les effets peuvent être plus graves, chroniques et même fatals.

La transmission de protozooses via l'approvisionnement d'eau, en particulier le *Giardia* et le cryptosporidium, est un sujet de préoccupation grandissant pour la santé publique.

Les protozoaires sont des micro-organismes eucariotiques, unicellulaires, sans parois cellulaires qui se nourrissent de bactéries et d'autres organismes. La plupart des protozoaires sont à l'état libre et on les rencontre fréquemment dans les eaux superficielles, où beaucoup d'espèces sont parasites. Les effets sur la santé découlant de l'exposition aux protozoaires présents dans l'eau de consommation sont multiples. L'effet le plus commun se manifeste par des dérangements gastro-intestinaux, normalement de courte durée. Cependant, chez les individus sensibles, tels que les enfants, les personnes âgées et les immunodéprimés, les effets peuvent être plus graves, chroniques et même fatals.

Le *Giardia* et le cryptosporidium sont des microorganismes très répandus et relevant de la pathogénicité, qui se multiplient seulement dans l'appareil gastro intestinal des êtres humains et d'autres animaux. Bien qu'ils ne puissent pas se reproduire dans l'environnement, ils peuvent survivre longtemps dans le milieu aquatique. Les cystes de *Giardia* et principalement, les oocystes de cryptosporidium, sont connus pour résister aux agents désinfectants utilisés sans le traitement de l'eau pour la consommation humaine, en particulier lorsque c'est le chlore qui est utilisé.

Face à ce scénario, le décret MS n° 2.914/2011 impose le contrôle du *Giardia* et du cryptosporidium au niveau du point de captation de l'eau lorsque la moyenne géométrique annuelle de l'E. coli à ce point est supérieure ou égale à 1.000 org/100ml. En outre, lorsque la moyenne arithmétique de la concentration de oocystes de cryptosporidium spp. est supérieure ou égale à 3,0 oocystes/L aux points de captation de l'eau, le décret recommande que la turbidité de l'effluent filtré (filtration rapide) soit inférieure ou égale à 0,3 uT, ou qu'alternativement on emploie le processus de désinfection qui atteint la même efficacité dans l'élimination des oocystes de *cryptosporidium* spp de façon prouvée.

Les méthodologies utilisées pour la détection d'(oo)cystes se basent sur la concentration des échantillons et sur la détection. Dans toutes les méthodes utilisées concernant le contrôle des oocystes, les étapes de concentration, de purification (qui est incorporée pour séparer les (oo)cystes des résidus restants) et de détection sont considérées comme très importantes. Soulignons que ces méthodologies ont été décrites et standardisées (normalisées) dans des pays comme les USA, l'Australie et le Canada, dont les programmes et les législations en matière de contrôle de la pollution et de dégradation des sources sont une priorité.

Les différentes méthodologies employées pour la recherche de protozoaires pathogènes dans l'eau sont sujettes à de nombreuses limitations, parmi lesquelles on trouve les coûts élevés, la nécessité d'importer des intrants et le besoin de personnel spécialisé. Il y a également la grande variété des résultats et le taux de récupération bas des méthodes analytiques, même lorsqu'on emploie la méthode de référence – la Méthode 1623/USEPA. On peut encore considérer que ces méthodologies ne permettent pas l'identification de l'espèce de protozoaire (qui peut être un indicateur utile de la source de contamination), elles ne fournissent pas non plus d'informations concernant l'infectiosité des organismes.

Suit une méthodologie de détermination de giardose sp et de *Cryptosporidium* sp dans des échantillons d'eau.

Détermination du *Giardia* sp et du *Cryptosporidium* sp dans l'eau par la technique de filtration, de séparation immunomagnétique et de microscopie de l'immunofluorescence

La méthode 1623 de l'USEPA est la suivante: la détermination du *Giardia* sp. et du *Cryptosporidium* sp. dans l'eau par la technique de filtration, de séparation immunomagnétique et par la microscopie de l'immunofluorescence (USEPA, 2005).

1. Principe de la méthode

La technique de détection du *Cryptosporidium* et du *Giardia* décrite dans cette procédure est basée sur les étapes suivantes: concentration de l'échantillon par filtration et centrifugation, purification par séparation immunomagnétique (IMS), coloration et lecture de lames (microscopie de l'immuno-fluorescence – FA). Le *cryptosporidium* et le *Giardia* sont identifiés grâce à des colorants DAPI (de l'anglais 4'-6-Diamidino-2-phenylindole) et une microscopie de contraste par interférence différentielle. Cette méthode

identifie les genres, *cryptosporidium* ou *Giardia*, mais pas le niveau des espèces. Son application exige l'emploi de personnel très qualifié avec de l'entraînement et de l'expérience concernant la détermination du *Cryptosporidium* et du *Giardia* par filtration, IMS, et FA.

2. Interférents

<p>Turbidité</p>	<p>Influence dans les étapes de concentration et séparation, en vertu de la concentration de la matière particulaire et de l'analyse de l'échantillon en microscopie, rendant difficile l'identification des oocystes de <i>cryptosporidium</i> et des cystes de <i>Giardia</i>.</p>
<p>Organismes ou détritrus à auto-fluorescence ou Immuno-fluorescence</p>	<p>Interférence dans l'identification des (oo)cystes, à l'origine de faux test positifs.</p>
<p>Contamination</p>	<p>Solvants, réactifs, matériel de laboratoire et de traitement des échantillons qui peuvent être responsables de l'introduction des interférents et à l'origine d'erreurs d'interprétation des examens microscopiques d'oocystes et de cystes. Dans tous les matériels utilisés on doit avoir constaté l'absence d'interférents grâce à une analyse faite en blanc (contrôle négatif). On doit utiliser du matériel jetable autant que possible.</p>

Inexpérience du laborantin

L'identification d'(oo)cystes au microscope exige une capacité du laborantin d'identifier autant les genres grâce à un échantillon environnemental (composé de composants divers) qu'à l'entraînement dans les étapes diverses des méthodes d'utilisation des équipements.

3. Sécurité

Les dangers de contamination biologique associée et le risque d'infection par des cystes et des oocystes sont élevés dans cette méthode, étant donné qu'elle inclut la manipulation d'échantillons concentrés d'organismes pathogènes vivants (actifs), c'est pourquoi ils doivent être manipulés avec des gants;

Le laboratoire doit établir des mesures de sécurité et des pratiques de santé appropriées, observant les procédures de sécurité typiques des laboratoires de microbiologie qui traitent des organismes pathogènes durant la préparation, l'utilisation et l'élimination d'échantillons concentrés, de réactifs et de matériels dans la manipulation et la stérilisation d'équipements;

Les connaissances de la toxicité ou de la carcinogénicité des composants ou réactifs utilisés ne sont pas bien consolidées, ainsi chaque composant doit être traité comme potentiellement dangereux pour la santé, ce qui implique une exposition la plus réduite possible à ces produits;

Le transport d'échantillons contenant des agents infectieux doit être réalisé de façon rigoureuse, en procédant de préférence à l'inactivation des agents. En outre, on doit respecter les standards et les législations en vigueur concernant le transport d'agents biologiques inactifs ou non.

4. Equipements et matériels

Remarque: les marques ou les fournisseurs cités le sont à titre de référence. Des résultats équivalents peuvent être atteints en utilisant d'autres marques, il faut néanmoins respecter l'adéquation des intrants utilisés.

4.1 les gallons ou récipients en plastique (polyéthylène) pour le prélèvement d'échantillons d'un volume entre 10 et 50 litres. Le matériel de prélèvement doit être recyclable de préférence;

Remarque: on peut opter pour la stérilisation des galons de prélèvement en les lavant avec 200 ml de solution d'hypochlorite de calcium à 12,5% (bien remuer afin de répandre la solution), conserver de 8 à 12h (pendant la nuit), jeter la solution d'hypochlorite de calcium et laver d'abord avec 200 ml de solution de thiosulfate de sodium (52%) et rincer de suite avec de l'eau distillée (eau réactive). Opcionalmente, pode-se optar pela esterilização dos galões de coleta pela lavagem com 200 mL de solução de hipoclorito de cálcio 12,5% (agitar bastante para espalhar a solução), aguardar de 8 a 12h (overnight), descartar a solução de hipoclorito de cálcio e lavar, primeiramente, com 200 mL de solução de tiosulfato de sódio (52%) e em seguida enxaguar com água destilada (água reagente).

4.2 Agitateur de tubes (du type Vortex);

4.3 Agitateur magnétique;

4.4 Barres magnétiques;

4.5 Agitateur rotatif d'une capacité de 18 rpm/min;

4.6 Pompe à vide/pression ou ligne de pression d'une capacité minimale de 5 bar;

- 4.7 Centrifugeuse pouvant proportionner une force de 1500g équipée de rotateurs "swinging-bucket" qui accommodent les tubes coniques de 250 ml et 50 ml;
- 4.8 Concentrateur de particules magnétiques pour tubes de 10 ml (MPC®1 ou MPC®6);
- 4.9 Concentrateur de particules magnétiques pour tubes de micro-centrifugeuse (MPC®-M ou MPC®-S);
- 4.10 Mélangeur rotatif (homogénéisateur) du type « Stomacher » d'une capacité de 300/350 coups/minute;
- 4.11 Sacs plastiques compatibles avec l'homogénéisateur;
- 4.12 Micro-pipeteurs d'un volume variable de 100-1000 μL et 10-100 ou 20-200 μL ;
- 4.13 Microscope optique équipé d'un contraste interférentiel différentiel (DIC) et d'une épi fluorescence ayant la capacité d'augmenter de 200x, 400x et 1000x;
- 4.14 Porte filtre en mousse;
- 4.15 Bêchers de 1000 ou 2000 ml;
- 4.16 Filtres en mousse (Filta-Max);
- 4.17 Station de lavage et de concentration (Filta-Max);
- 4.18 Membrane de polycarbonate de 25 mm de diamètre et d'une rétention de 1 μm ;
- 4.19 Lames pour la microscopie de fluorescence;
- 4.20 Lamelles couvre-objet (minimum 24x32 mm);
- 4.21 Pipettes Pasteur;

- 4.22 Pipettes sérologiques de 5 et 10 ml;
- 4.23 Aiguilles en polypropylène d'une capacité de 200-300 μL et 1000 μL ;
- 4.24 Éprouvette de 500 ml;
- 4.25 Tubes de polypropylène de 1,5 ml (du type eppendorf);
- 4.26 Tubes coniques de centrifugeuse d'une capacité de 250 ml et de 50 ml;
- 4.27 Tubes de Leighton (côté plat).

5. Réactifs

- 5.1 Hydroxyde de sodium;
- 5.2 Acide chloridrique;
- 5.3 Acétone;
- 5.4 Glycérole;
- 5.5 Ethanol;
- 5.6 Méthanol;
- 5.7 Eau réactive (eau ultra pure);
- 5.8 Tween® 20 (Sigma Chemical);
 - 5.8.1 Tampon phosphate salin – PBS pH 7.4 (Sigma Chemical): 8 g NaCl; 0.2 g KCl; 1.15 g Na_2HPO_4 anhydre; 0.2 g KH_2PO_4 ; 1,0 L d'eau réactive;
 - 5.8.2 DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole (Sigma Chemical);

5.9 Solutions pour l'élu­tion des filtres;

5.9.1 Tampon phosphate salin/Tween® 20 (PBST): Ajouter 0,10ml (100µL) de Tween® 20 à 1,0 L de solution tampon phosphate salin (PBS);

5.9.2 Solution de stock:dissoudre 2 mg DAPI dans 1,0 ml de méthanol absolu;

Remarque: Préparer des volumes minimums pour l'utilisation et verser dans un flacon ou un tube stérile protégé de la lumière avec un couvercle fileté. Conserver entre 1°C et 10°C. Ne pas congeler. Jeter la solution après 2 semaines ou lorsque le contrôle positif devient négatif.

5.9.3 DAPI (solution d'utilisation – suivre les instructions du fabricant du kit d'anticorps): ajouter 0,01 ml de DAPI (solution stock) à 50 ml de PBS;

Remarque: Préparer des volumes minimums pour l'utilisation et conserver dans un flacon ou un tube stérile protégé de la lumière avec un couvercle fileté. Conserver entre 1°C et 10°C. Préparer la solution quotidiennement.

5.10 Solutions pour le montage de lames;

5.10.1 Glycérole/PBS: Mélanger 60 ml de glycérole et 40 ml de PBS.

Remarque: Préparer au moment de l'utilisation.

5.10.2 milieu de montage DABCO/Glycérole: peser 2,0g de DABCO (Sigma Chemical) et les mettre dans un ballon volumétrique. Ajouter 95 ml de solution de glycérole/PBS tiède (chauffée) et mélanger jusqu'à la dissolution complète du réactif. Compléter le volume pour 100 ml et verser dans un flacon stérile ayant un couvercle fileté d'une capacité de 100 ml. Conserver entre 2 et 8°C (validité: 3 mois).

6. Prélèvement d'échantillon

- 6.1 Remplir entièrement le contenant assurant ainsi une collecte de 10 L (la version de la méthode utilisant un filtre d'éponge Filta Max[®] a été validée pour un volume de 50 L, toutefois des volumes d'échantillon alternatifs peuvent être utilisés);
- 6.2 Les échantillons devront être prélevés dans un volume unique et conservés au réfrigérateur entre 1°C et 10°C, sans les congeler, jusqu'à leur traitement;

7. Identification de l'échantillon

- 7.1 Identifier correctement l'échantillon;
 - 7.1.1 Enregistrer les informations concernant la provenance de l'échantillon ainsi que la date et l'heure de prélèvement;
 - 7.1.2 Enregistrer les données de l'analyse: date du début de l'analyse, volume analysé et volume du centrifugat;
 - 7.1.3 Enregistrer les lots des réactifs et des solutions utilisés.

8. Filtration

- 8.1 Mettre le filtre en mousse sur le porte-filtre;
- 8.2 Connecter à l'aide de tuyaux de silicone ou du porte-filtre au récipient contenant l'échantillon et la pompe ou la ligne de pression;
- 8.3 L'effluent pendant le processus de filtration doit être conservé dans un récipient gradué afin de mesurer son volume;

8.4 A la fin de la filtration de l'échantillon, arrêter la pression. Déconnecter le porte-filtre du tuyau et fermer le couvercle du porte-filtre avec un bouchon en caoutchouc aux points d'entrée et de sortie;

8.5 Si l'éluion n'est pas faite immédiatement, conserver le porte-filtre et la mousse entre 1 et 10°C.

L'éluion peut être commencée 96h après le prélèvement de l'échantillon ou sa filtration dans le champ.

9. Elution

Remarque: le processus d'éluion décrit utilise la station de lavage Filta-Max®, il est fortement recommandé de lire les instructions du fabricant afin de connaître le fonctionnement du montage et du mode d'opération de l'appareil. On peut également utiliser un Stomacher en option.

9.1 Procédure d'éluion dans la station Filta-Max®;

9.1.1 Premier lavage;

9.1.1.1 Poser la membrane filtrante plane sur la base du concentrateur avec la partie rugueuse vers le haut;

9.1.1.2 Utiliser les verrous de la station de lavage pour incubateur le tube concentrateur (en créant une étanchéité dans la membrane);

9.1.1.3 Retirer le tube concentrateur de la station de lavage;

9.1.1.4 Jeter le filtre en mousse du porte-filtre;

9.1.1.5 Connecter le filtre en mousse à la station de lavage;

9.1.1.6 Verser l'excédent de liquide récupéré à partir du module de filtration dans le tube concentrateur, puis le laver de suite avec du PBST et verser le liquide à nouveau dans le tube concentrateur;

9.1.1.7 Ajouter 600 ml de PBST dans le tube concentrateur et le connecter à la base en dessous du tube d'élution;

Remarque: Si plus de 50 ml de liquide a été récupéré à partir du module de filtration, réduire le volume de PBST en conséquence.

9.1.1.8 Laver le filtre en mousse en bougeant le piston vers le haut et vers le bas 20 fois. Il est recommandé d'effectuer des mouvements doux afin d'éviter de produire trop de mousse;

9.1.1.9 Séparer le concentrateur et purger le liquide restant dans le tube d'élution, en bougeant le piston vers le haut et vers le bas 5 fois, puis mettre le tampon fourni à extrémité du tube d'acier de suite, afin d'éviter que cela ne goutte;

9.1.1.10 Concentrer la solution éluée du premier lavage en utilisant l'appareil Filta-Max[®]. Mettre le tube concentrateur sur un agitateur magnétique et mettre le couvercle avec sa barre magnétique;

9.1.1.11 Connecter l'appareil de vidange à la valve sur la base du concentrateur. Allumer l'agitateur et ouvrir la valve;

9.1.1.12 Allumer la pompe à vide;

9.1.1.13 Laisser le liquide s'écouler jusqu'à une hauteur approximativement égale au milieu de barre magnétique et fermer la valve de suite;

9.1.1.14 Enlever l'agitateur magnétique et le laver avec du PBST ou de l'eau réactive afin de récupérer tous les oocystes;

9.1.1.15 Transférer le concentré dans un tube de 50 ml, laver ensuite les parois du tube de concentration et transférer le produit du rinçage dans le tube de 50 ml.

9.1.2 Second lavage.

9.1.2.1 Ajouter un volume additionnel de 600 ml de PBST au module concentrateur;

9.1.2.2 Répéter le lavage des filtres en mousse, bougeant le piston vers le haut et le bas 10 fois. Il est recommandé d'effectuer des mouvements doux afin d'éviter de produire trop de mousse;

9.1.2.3 Ajouter le concentré du premier lavage conservé dans le tube de 50 ml pour l'éluat (mélange d'éluant et de soluté) du second lavage et répéter le processus de concentration de l'échantillon avec l'appareil Filta-Max®.

Remarque: En cas d'obstruction des pores de la membrane et d'interruption de l'écoulement avant la fin de la concentration, il est possible de remplacer la membrane filtrante. Démonter le tube concentrateur et conserver l'éluat restant dans un récipient. Retirer la membrane à l'aide d'une pince et la mettre dans le sac fourni. Mettre une nouvelle membrane et remonter le tube concentrateur. Remettre l'éluat conservé dans le tube concentrateur, laver le récipient à l'eau réactive, additionner le liquide à l'éluat et continuer la concentration. La membrane peut être remplacée plusieurs fois si nécessaire. La concentration peut également être réalisée par centrifugation à 1500G pendant 15 minutes.

9.1.2.4 Enlever l'agitateur magnétique.

- 9.1.2.5 L'échantillon final peut être versé dans le même tube de 50 ml. Laver les parois du tube concentrateur avec du PBST et verser la solution dans le tube de 50 ml.
- 9.1.2.6 Insérer le tube concentrateur vide dans la station de lavage.
- 9.1.2.7 Retirer la membrane et la transférer dans le sac fourni à l'aide d'une pince;
- 9.1.2.8 Laver la membrane:
- 9.1.2.8.1 Manuellement – Ajouter 5 ml de PBST dans le sac contenant la membrane. Frotter la superficie de la membrane à travers le sac jusqu'à ce qu'elle paraisse propre. Transférer le produit de l'élution dans un tube de 50 ml en utilisant une pipette. Répéter le lavage de la membrane avec plus de 5 ml de PBST et transférer le produit de l'élution dans le tube de 50 ml.
- 9.1.2.8.2 Lavage avec un "Stomacher" – Ajouter 5 ml de PBST dans le sac contenant la membrane. Le mettre dans un "Stomacher" et remuer pendant 3 minutes. Transférer l'éluat dans un tube de 50 ml en utilisant une pipette. Répéter le lavage deux fois en utilisant le "Stomacher" et 5 ml d'aliquotes de PBST.

10. Centrifugation

- 10.1 Centrifuger le tube de 50 ml à 1500g pendant 15 minutes.
- 10.2 Aspirer avec soin ce qui surnage jusqu'à 5 ml au dessus du sédiment à l'aide d'une pipette de Pasteur.
- 10.3 Enregistrer le volume du sédiment.

Remarque: Le volume du sédiment ne doit pas être supérieur à 0,5 ml, quantité maximale recommandée de matière particulière pour la purification par la méthode.

11. Séparation immunomagnétique

11.1 Remuer vigoureusement le tube en vortex pour suspendre le sédiment:

11.1.1 Si le volume de sédiment est inférieur à 0,5 ml, agiter le tube en vortex vigoureusement jusqu'à suspension complète du sédiment. Tourner le tube à centrifuger doucement afin de réduire la mousse formée après l'homogénéisation.

11.1.2 Si le volume de sédiment est supérieur à 0,5 ml, le concentré doit être séparé en plusieurs sous-échantillons (un sous-échantillon ne doit pas avoir un volume de sédiment supérieur à 0,5 ml).

11.1.2.1 Estimer le volume total requis en utilisant le volume du sédiment pour la formule

$$\text{Volume total requis (mL)} = \frac{\text{Volume de sédiment (mL)}}{0,5 \text{ mL}} \times 5,0 \text{ mL}$$

Par exemple, si le volume du précipité est de 1,2 ml, le volume total nécessaire est de 12 ml. Ajouter de l'eau purifiée au tube à centrifuger pour compléter le volume à 12 ml.

11.1.3 Si tout le volume obtenu est soumis à l'IMS, le diviser par 5 ml et calculer le nombre de sous-échantillons qui devront être analysés (en arrondissant au chiffre rond supérieur le plus proche). Dans l'exemple cité ci-dessus, $12/5 \text{ ml} = 2,4$, en arrondissant cela donne 3 sous-échantillons.

- 11.1.4 Si le volume à être analysé est partiel, remuer vigou-
reusement le volume total en vortex afin de suspendre
complètement le précipité.
- 11.2 Préparer pour chaque concentré 1,5ml d'une dilution
1X du tampon SL-A 10X. Pour chaque 1,0 ml requis de
la solution diluée, mélanger 100µL (0,1ml) et 900µL
(0,9ml) d'eau réactive.
- 11.3 Transférer 5ml de l'échantillon concentré (ou sous-
-échantillon) dans le tube de Leighton (côté plat) con-
tenant 1,0 ml de chaque tampon SL-A 10X et SL-B 10X
(Dynabeads GC-Combo) à l'aide d'une pipette de 10ml.
- 11.4 Rincer deux fois avec de l'eau réactive le tube conte-
nant le concentré (ou sous-échantillon), de sorte que
le volume final dans le tube de Leighton soit de 12 ml.
- 11.5 Ajouter à chaque tube de Leighton (contenant l'échantillon
et les tampons), 100 ml de Dynabeads®Crypto-Combo
et 100ml de Dynabeads®*Giardia*-Combo, homogé-
nisés à l'avance dans le vortex pendant 10 secondes.
Mettre les tubes dans l'agitateur rotatoire pendant au
moins 1 heure, à 18rpm.
- 11.6 Transférer le tube de Leighton dans le concentrateur
magnétique de particules (MPC®1 ou MPC®6), homo-
généiser, manuellement et avec soin, dans un angle de
90° approximativement pendant 2 minutes.
- 11.7 Eliminer ce qui surnage sans retirer le tube du concentra-
teur magnétique de particules et sans remuer la matière.
- 11.8 Si l'échantillon est flou, éliminer ce qui surnage, sus-
pendre le sédiment dans 10 ml de PBS et répéter la pro-
cédure dans le concentrateur magnétique de particules.

- 11.9 Enlever le concentrateur magnétique de particules et suspendre l'échantillon dans 500 μ L (0,50ml) de tampon SL-A 1X en utilisant une pipette Pasteur et transférer dans un tube eppendorf. Ajouter à nouveau 500 μ L de tampon SL-A 1X au tube de Leighton, bien laver et transférer dans le tube eppendorf. Mettre ce dernier dans le concentrateur magnétique MPC®-M ou MPC®-S, et homogénéiser manuellement dans un angle de 180°C pendant 1 minute.
- 11.10 Pour transférer, quantitativement, tout le volume, attendre environ une minute après le second transfert et recueillir tout le volume résiduel qui se serait écoulé vers la partie inférieure du tube.
- 11.11 Eliminer ce qui surnage sans retirer le concentrateur magnétique.
- 11.12 Dissociation du complexe beads/(oo)cyste.
- 11.13 Enlever le concentrateur magnétique.
- 11.14 Ajouter 50 μ L de solution de HCl 0,1N puis agiter dans le vortex à grande vitesse pendant environ 50 secondes.
- 11.15 Mettre le tube dans le concentrateur magnétique (MPC®-M ou MPC®-S) sans la bande magnétique à cet endroit et laisser reposer dans une position verticale pendant au moins 10 minutes à température ambiante.
- 11.16 Agiter dans le Vortex pendant environ 30 secondes.
- 11.17 S'assurer que tout l'échantillon soit à la base du tube. Placer le tube de la micro-centrifugeuse (eppendorf) dans le concentrateur magnétique (MPC®-M ou MPC®-S).

- 11.18 Placer la bande magnétique dans le concentrateur magnétique (MPC®-M ou MPC®-S) et laisser reposer pendant minimum 10 secondes.
- 11.19 Préparer une lame, l'identifier et ajouter 5 μL de NaOH 1,0 N dans le puits de contrôle de la lame.
- 11.20 La procédure comprend deux dissociations acides, toutefois on peut opter pour le montage de deux lames, chacune d'elle avec le volume de chaque dissociation, ou pour une lame unique. Si on opte pour le montage d'une lame unique, additionner 10 μL de NaOH 1,0 N au puits de contrôle de la lame. Le volume du concentré ajouté à la lame doit être mesuré.
- 11.21 Le volume obtenu de la dissociation peut être conservé dans un autre "eppendorf" contenant 10 μL de NaOH 1,0 N. Ainsi, on peut réaliser une lecture d'un aliquote plus petit du concentré, cependant on doit enregistrer le volume concentré et le volume de l'aliquote.
- 11.22 Sans enlever l'eppendorf du concentrateur magnétique (MPC®-M ou MPC®-S), transférer tout l'échantillon dans le puits de contrôle de la lame avec le NaOH. Éviter de toucher les particules coincées sur les parois du tube. S'assurer que tout le fluide soit transféré.
- 11.23 Enlever l'eppendorf du concentrateur magnétique et répéter la procédure de lavage avec l'acide.
- 11.24 Le volume de la seconde dissociation acide peut être ajoutée à la lame contenant le volume de la première dissociation ou peut être mis sur une deuxième lame.

Remarque: les puits de contrôles de la lame peuvent être petits pour accueillir les volumes des deux dissociations.

Remarque 2: les étapes de l'éluion, de concentration et de purification (séparation immunomagnétique) doivent être conclues le même jour.

12. Coloration

12.1 Laisser les lames sécher à température ambiante pendant la nuit (ou jusqu'à ce que la lame soit complètement sèche). Suivre les instructions du fabricant afin d'effectuer la coloration immuno-fluorescente.

Remarque: la coloration doit être commencée dans les 72h suivant la préparation de la lame.

12.2 Placer la lame dans une chambre humide, dans l'obscurité et à température ambiante pendant environ 30 minutes. (la chambre humide consiste en un récipient de plastique contenant des serviettes en papier humides sur lesquelles les lames sont posées).

12.3 Laver les puits de contrôle en ajoutant du PBS en quantité suffisante (environ 100 μ L). Aspirer le liquide avec soin sans toucher l'endroit contenant la matière.

12.4 Ajouter 50 μ L de DAPI et laisser reposer pendant 5 minutes dans la chambre humide (la chambre humide consiste en un récipient de plastique contenant des serviettes en papier humides sur lesquelles les lames sont posées).

12.5 Laver les puits de contrôle en ajoutant du PBS en quantité suffisante (environ 100 μ L). Aspirer le liquide avec soin, sans toucher l'endroit contenant la matière.

12.6 Mettre une goutte du milieu de montage DABCO/glycérole et couvrir avec une lamelle couvre-objet, en évitant la formation de bulles entre la lame et la lamelle couvre-objet.

12.7 Seller les bords de la lamelle couvre-objet précautionneusement avec du vernis transparente.

12.8 Préparer des lames de contrôle positif ou négatif, en suivant les spécifications du fabricant.

Remarque: l'examen microscopique doit être commencé tout de suite après la fin de la coloration, mais si les colorants ne perdent pas leur fluorescence, il peut être réalisé dans un délai de 168h (7 jours) si les lames sont conservées à l'abri de la lumière.

13. Lecture microscopique

13.1 Examiner chaque puits de contrôle de façon systématique, en établissent un standard de lecture, du haut vers le bas ou d'un côté vers l'autre, garantissant que toute la surface soit évaluée.

13.2 Examiner en utilisant l'immuno-fluorescence (FA), DAPI et la microscopie de Contraste par Interférence Différentielle (DIC).

14. Contrôle positif et négatif

14.1 Commencer l'examen par le contrôle positif et négatif, identifiant dans le contrôle positif au moins trois oocystes de *Cryptosporidium* et trois cystes de *Giardia*. Examiner le contrôle négatif, confirmant l'absence de cystes et d'oocystes.

14.2 Enregistrer les résultats e commencer la lecture des échantillons seulement si les contrôles positif et négatif présentent des résultats satisfaisants.

14.3 Oocystes de *cryptosporidium*

- 14.3.1 Examiner en FITC avec un agrandissement de 200X. Ce sont des oocystes caractéristiques si ce sont des formes fluorescentes ovoïdes ou sphériques de 4 à 6 µm de diamètre;
- 14.3.2 En visualisant les oocystes, agrandir à 400X et changer le microscope pour un filtre bloquant les UV pour DAPI. Les oocystes caractéristiques présentent une coloration interne bleue brillante ou ont jusqu'à 4 noyaux de coloration bleu ciel;
- 14.3.3 Ensuite, examiner en contraste interférentiel différentiel et observer la présence de caractéristiques morphologiques internes et externes typique d'oocystes de *cryptosporidium*, en agrandissant de 1000x.
- 14.3.4 Un résultat positif d'oocyste *cryptosporidium* présente une fluorescence, une taille et des formes typiques et positives pour une Fluorescence-FITC, DAPI et DIC.

14.4 Cystes de *Giardia*

- 14.4.1 Examiner en FITC avec un agrandissement de 200X. Ce sont des cystes caractéristiques s'ils ont des formes fluorescentes ovoïdes ou sphériques de 8 à 18 µm de diamètre et 5 à 15 µm de largeur;
- 14.4.2 En regardant les cystes, agrandir à 400X et changer le microscope pour un filtre bloquant les UV pour DAPI. Les cystes caractéristiques présentent une coloration interne bleue brillante ou ont de deux à quatre noyaux de coloration bleu ciel;
- 14.4.3 Ensuite, examiner en contraste interférentiel différentiel et observer les caractéristiques morphologiques internes et externes typiques des cystes de *Giardia*.

14.4.4 Un résultat positif pour le cyste de *Giardia* donne une fluorescence typique, une taille et une forme typique et ne présente pas de caractéristiques atypiques dans les FA, DAPI ou DIC.

14.5 Calcul des résultats

Si tout le volume concentré (résultat de la dissociation acide) était examiné au microscope

$$\text{Nombre d'oo)cystes. L}^{-1} = \frac{\text{Nombre d'oo)cystes identifiés}}{\text{Volume d'échantillon prélevé}}$$

Si on effectue une lecture au microscope d'un aliquote du volume concentré obtenu à la fin de la dissociation acide.

$$N \text{ de (oo) cystes. L}^{-1} = \frac{N^{\circ} \text{ de (oo) cystos identifiés} \times \frac{\text{Volume do concentré (uL)}}{\text{Aliquote de concentré analysé (uL)}}}{\text{volume d'échantillon collecté}}$$

Bibliographie



BATALHA, B. H. L.; PARLATORE, A. C. **Controle da qualidade da água para o consumo humano: bases conceituais e operacionais**. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1977.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. **Manual técnico de análise de água para consumo humano**. Brasília: Funasa, 1999.

_____. Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de 25 de março de 2004. Dispõe sobre normas e padrões de potabilidade de água para consumo humano. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266.

COELHO, L. **Técnicas de laboratório clínico**. São Paulo: Atheneu, 1968.

GUIA de coleta e preservação de amostras de água. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1987.

LIMPEZA de vidraria. Disponível em: <http://www.profcupido.ig.com.br/conserv_e_limpeza_vidrarias.Htm>. Acesso em: 01 mar. 2004.

MAIER, F. J. **Fluoruración del agua potable**. 1. ed. México: Limusa-Wiley, 1971.

MANUAL de tratamiento de aguas. 4. ed. México: Limusa-Wiley, 1974.

OPERAÇÃO e manutenção de E.T.A. São Paulo: Cetesb, 1973. v. 2.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). **Guías para a calidad del agua potable**. 2. ed. Ginebra, 1995. v.1.

_____. **Guías para a calidad Del agua potable**. 1. ed. Ginebra, 1998. v.3.

_____. **Guías para a calidad Del agua potable**. 3. ed. Ginebra, 2004. v.1.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE (OPAS). **Fascículo água: a desinfecção da água**. Brasília: OPAS, 1999.

SANTOS FILHO, D. F. **Tecnologia de tratamento de água: água para indústria**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora AN, 1976.

SILVA, M. O. S. A. **Análises físico-químicas para controle de estações de tratamento de esgotos**. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1977.

STANDARD methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. Washington: APHA, 1985.

TÉCNICAS de abastecimento e tratamento de água. 2. ed. São Paulo: Cetesb, 1977. v.2.

TÉCNICAS de análises microbiológicas da água: membrana filtrante. 1. ed. São Paulo: Cetesb, 1997.

UNITED STATES ENVIROMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Method 1623: Cryptosporium and Gardia in water by filtration/IMS/FA. Washington, 2005. 68 p.

Elaboration



Elaboration

Marinaldo da Silva Valente/Suest/AM/**Funasa**

Collaborateurs de Funasa

Osman de Oliveira Lira/Suest/PE/**Funasa**

Nilce Bazzoli/Suest/MG/**Funasa**

Júlio César Reis da Silva/Suest/MA/**Funasa**

Raimundo Rodrigues dos Santos Filho/Suest/MA/**Funasa**

Miguel Crisóstomo Leite Brito/Densp/**Funasa**

Coordination

Maria Fernanda Bittencourt/Densp/**Funasa**

Révision Technique

Felizana M.M. da S. Palhano

Girlene Rodrigues Leite

Vilma Ramos Feitosa/Densp/**Funasa**

Marinaldo da Silva Valente/Suest-Am/**Funasa**

Révision de la 3^{ème} édition

Ana Maria Moreira Dias – Cocag/Desam/**Funasa**

Aristeu de Oliveira Junior – Cocag/Desam/**Funasa**

Antonio Carlo B. Brandão – Cocag/Desam/**Funasa**

Demétrius Brito Viana – Consultant OPS/**Funasa**

Osman de Oliveira Lira – URCQA/Sesam/Suest-PE/**Funasa**

Révision orthographique et grammaticale de la 3^{ème} édition

Leila Santos – Coesc/Gab/Prési/**Funasa**/MS

Examen 4^{ème} édition et mise à jour

Ana Maria Moreira Dias – Cocag/Desam/**Funasa**

Aristeu de Oliveira Junior – Cocag/Desam/**Funasa**

Antonio Carlo B. Brandão – Cocag/Desam/**Funasa**
Demétrius Brito Viana – Consultant OPS/**Funasa**
Osman de Oliveira Lira – URCQA/Sesam/Suest-PE/**Funasa**

Illustration

Leonardo Ribeiro da Silva Terra/Coesc/Gab/Prési/**Funasa**

Conception graphique et couverture

Gláucia Elizabeth de Oliveira – Diedi/Coesc/Gab/**Funasa**

Diagramming

Eduardo dos Santos – Diedi/Coesc/Gab/Funasa

Révision orthographique et grammaticale de la 1^{ère} et 2^{ème} édition

Olinda Myrtes Bayma S. Melo – Coesc/Gab/Prési/**Funasa**/
MS

Révision bibliographique

Raquel Machado Santos –/Coesc/Gab/Prési/**Funasa**
Solange de Oliveira Jacinto –/Coesc/Gab/Prési/**Funasa**

“La publication de ce manuel a été financée par les termes de la coopération N° 38 signée entre la FUNASA et la OPAS/OMS”.

