

Protocole d'analyses en laboratoire de L'urine stockée : Valorisation de L'urine au Domaine de la Jasse

Étude scientifique sur l'utilisation de l'urine et de sous-produits de l'urine en plein champs

Partenaires du projet :



Personnes (organismes) liées au projet Valurine : AIT MOUHEB Nassim (IRSTEA) ; CLOUET Benjamin (ECOSEC) ; FROMENT Geoffrey (IRSTEA) ; HERAN Marc (IEM) ; LE BRETON Bruno (Domaine de la Jasse) ; MOLLE Bruno (IRSTEA) ; MOLLE Geoffrey (ECOSEC).

Personnes chargées des analyses en laboratoire : HERAN Marc (IEM) ; MOLLE Geoffrey (ECOSEC).

Rédacteur : MOLLE Geoffrey (ECOSEC)

Date de rédaction : 02/08/18

SCOP ECOSEC

111, Avenue du Faubourg Boutonnet
34 090 MONTPELLIER



1. Données de départ

Le protocole d'expérimentation du Domaine de la Jasse est sur deux saisons distinctes, 2018 et 2019.

Pour rappel, voici les données sur lesquels sont basés les calculs et réflexions en lien avec la fertigation par système goutte à goutte. Ce système est mis à disposition par le Domaine de la Jasse sur une de leurs parcelles viticoles (Plantier).

La vigne : cépage merlot

- Longueur d'une ligne : 90 m
- Largeur de 15 lignes : 35 m
- Espacement inter-rang : 2,5 m
- Écartement des pieds de vignes : 90 cm
- Nombre de pieds de vignes par ligne : 100
- Surface exploitée (sur les 15 lignes) : 3150 m²
- Surface d'un traitement (3 lignes) : 675 m²



Figure 1 : Traitement contre le Mildiou au Domaine de la Jasse



Figure 2 : Parcelle expérimentale Plantier



Figure 3 : Épandage de l'urine



Figure 4 : Système d'injection

Le système d'irrigation : tuyau goutte à goutte

- Type de GàG : incorporé au tuyau PE
- Diamètre nominal : DN16
- Débit théorique des GàG : 2,3 L/h auto-régulant
- Espacement des GàG : 1 m
- Hauteur sol / GàG : 30 cm
- GàG par ligne : 90
- GàG par traitement : 270

La parcelle : Plantier

- La surface d'étude correspond à environ 1/10 ème de la surface totale « Plantier » (voir Fig. 5. encadré noir).
- La pente imite un dôme (pente ascendante à l'Ouest et descendante à l'Est).
- Le sol est principalement argileux et qualifié de « fertile avec une bonne réserve hydrique » (résultat provenant de l'étude de sol faite en 2010 sur la fosse n°5).



Figure 5 : Parcelle Plantier

Objectifs des analyses

- Étude de sol (NaCl, NPK) en début et fin d'expérimentations (analyses des échantillons prélevés).
- Étudier et quantifier l'impact de l'auto-hygiénisation de l'urine, par le stockage en tonne à eau translucide, en fonction du temps, du pH et de la température.
- Quantifier les éléments pathogènes (coliformes et entérocoques) présents dans l'urine et voir leur évolution au cours du temps, lors de la phase « stockage ».

2. Étude préliminaire

Les effluents et produits utilisés :

- L'urine épandue : des mesures de pathogènes ont été effectuées le 02/07/18, avant épandage. Cette urine provient d'un festival et a été récupérée au début du mois de janvier, puis placée dans une tonne à eau (500 L) plastique transparente graduée, fermée hermétiquement et placée au soleil. Cela est en accord avec les normes de l'OMS en vigueur, indiquant un stockage de 6 mois avant utilisation de l'urine (OMS (2012), *L'utilisation sans risque des eaux usées, des excréta et des eaux ménagères*). [hyperlien](#)
- Type de système de récolte : toilette séparative par tapis (société Ecodoméo)
- Nombre de dispositifs : 2 cabines et 6 urinoirs
- L'urine de stockage : récupérée lors du bal des insoumis, organisé par la mairie de Murviel-lès-Montpellier, puis mise en place dans 2 bidons de 20 L, dont l'un est stocké au soleil (« translucide ») et l'autre à l'ombre sous une bâche (« opaque »).



Figure 6 : Bidons d'urine à épandre



Figure 7 : Flacon d'Aurin

L'Aurin est un fertilisant commercialisé par la société Suisse Eawag, celle-ci récupère les urines domestiques afin de les stabiliser / concentrer / conditionner, pour en sortie, disposer d'un fertilisant commercialisable et éco-responsable. De ce fait, les analyses en laboratoire sur ce produit ne sont pas pertinentes, car les caractéristiques sont déjà connues et maîtrisées lors de la conception.

La struvite quant à elle, est un précipité apparaissant lors du stockage et de la décantation de l'urine. La réaction de précipitation de la struvite peut être accélérée par l'ajout de magnésium dans l'urine, cette pratique est à écarter du fait de son coût élevé, ainsi que de son important impact environnemental.

La struvite est sous forme cristalline (relativement stable), malgré cela nous effectuons une analyse en laboratoire afin d'en connaître la composition exacte (IEM).

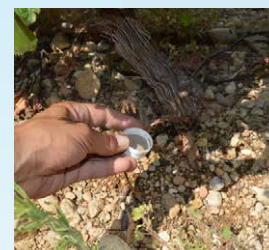


Figure 8 : Épandage manuel de la struvite

Quantité et période de prélèvement :

Les prélèvements d'urine à épandre s'effectuent directement dans la tonne à eau, sur le lieu de stockage pour « auto-hygiénisation » (liée à l'action du soleil et à la montée en pH de l'urine). La méthode appliquée est la suivante : 1) homogénéisation sommaire ; 2) prélèvement à l'aide d'une perche munie en son extrémité d'un récipient. Nous avons fixé un prélèvement d'environ 50 cL, afin de conserver des échantillons au frais (période : juste avant l'épandage du produit fertilisant).

Les prélèvements d'urine à suivre pendant 6 mois s'effectuent directement dans les bidons, sur le lieu de stockage. La méthode appliquée comporte une homogénéisation par renversement des bidons, puis un prélèvement à l'aide du bec verseur des bidons. Nous avons fixé un prélèvement d'environ 50 cL, dans le but de conserver des échantillons au frais (période : toutes les semaines durant les 2 premiers mois, puis tous les mois pendant 4 mois).

Une importance particulière est à porter sur l'aspect hermétique de la tonne à eau et des bidons. En effet, les récipients doivent être conservés fermés hermétiquement après chaque analyse, afin de minimiser la perte d'azote par évaporation (de même éviter l'ouverture prolongée des contenants).

Les analyses sont généralement effectuées dans les 4 heures suivant le prélèvement et les échantillons sont identifiés avec la date et la provenance.

Cela fait (pour cette saison 2018) :

- 54 analyses coliformes totaux / *E. coli* (par méthode IDEXX)
- 54 analyses entérocoques (par méthode IDEXX)
- 4 analyses NPK et 4 chromatographies ioniques

3. Protocole d'analyses : coliformes totaux, *E. coli* et entérocoques (voir Annexe 1)

Le protocole concernant les analyses en éléments pathogènes doit suivre celui fourni par IDEXX, présent à l'IRSTEA (voir *Annexe 1 : Protocole IDEXX*).

La quantité de réactif utilisé lors des analyses est difficile à approximer car il dépend de la dilution, de la qualité de la manipulation, ainsi que du respect des temps et des températures d'incubation.

Après réflexion, nous avons choisi de diluer 100 fois les échantillons, afin d'obtenir des résultats lisibles dans la gamme d'IDEXX. En l'absence d'eau distillée, nous avons fait bouillir de l'eau à la bouilloire pour ajouter 99 mL d'eau à 1 mL d'urine. L'absence d'eau distillée et l'utilisation d'eau du robinet ne présente par d'influence sur les résultats obtenus.

Matériel



Figure 9 : Étuve pour l'incubation des échantillons



Figure 10 : Chambre de vision lumière noire (lecture UV)



Figure 11 : Sertisseuse de plaques Quanti-Tray 2000



Figure 12 : Kit d'analyse IDEXX Quanti-Tray 2000



Figure 13 : Support de plaques Quanti-Tray 2000



Figure 14 : Plaque Quanti-Tray 2000

# Large well Position	IDEXX Quanti-Tray /2000 MPN Table											
	# Small Well Position											
1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
3	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
4	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
5	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
6	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
7	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
8	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
9	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
10	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
11	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
12	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144
13	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156
14	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168
15	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180
16	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192
17	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204
18	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216
19	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228
20	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240
21	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252
22	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264
23	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276
24	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288
25	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300
26	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312
27	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324
28	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336
29	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348
30	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360
31	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372
32	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384
33	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396
34	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408
35	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420
36	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432
37	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444
38	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456
39	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468
40	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480
41	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492
42	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504
43	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516
44	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528
45	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540
46	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552
47	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564
48	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576
49	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588
50	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600

Figure 15 : Abaque IDEXX

Résultats

		Translucide							
Mois 2018	Semaine	Coliformes - TR	E. Coli - TR	Dilution coliformes	Entérocoques - TR	Dilution entérocoques	T° - TR	pH - TR	Conductivité - TR
1er mois	06-juin	22 470	3 680	D100	241 960	D100	23,4	8,9	>20
	12-juin			D100	54 750	D100	22,4	9,3	>20
	19-juin	>24196	>24196	D10	1340	D100	27,3	8,8	>20
	26-juin			D10		D100	27,1	8,77	>20
	05-juil			D50		D1000	28,9	8,78	>20
2ème mois	10-juil								
	17-juil								
	24-juil								
	02/08/2018 non filtré			1000		100			
3ème mois	02/08/2018 filtré			1000		100			
	13-17/08								
4ème mois	10-14/09								
5ème mois	15-19/10								
6ème mois	12-16/11								
		Opaque							
Mois 2018	Semaine	Coliformes - OP	E. Coli - OP	Dilutions coliformes	Entérocoques - OP	Dilutions entérocoques	T° - OP	pH - OP	Conductivité - OP
1er mois	06-juin	22470	3680	D100	241960	D100	23,4	8,9	>20
	12-juin			D100	41 060	D100	21,1	9,34	>20
	19-juin	>24196	>24196	D10	720	D100	26,5	8,8	>20
	26-juin			D10		D100	27,4	8,79	>20
	05-juil			D50		D1000	28,8	8,74	>20
2ème mois	10-juil								
	17-juil								
	24-juil								
	01/08/2018 non filtré	770100	21600	1000		100			
3ème mois	01/08/2018 filtré	69700	1000	1000		100			
	13-17/08								
4ème mois	10-14/09								
5ème mois	15-19/10								
6ème mois	12-16/11								

Figure 16 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus d'après les analyses en pathogènes (IDEXX) de l'urine de stockage ; les cases jaunes indiquent des résultats hors gamme ou une absence de pathogènes (coliformes et entérocoques) ; pour ce qui est des résultats du 05/07/18, des analyses ayant été effectuées le 02/07 en D10/D100 n'ayant rien donné, nous avons décidé de réaliser des D50/D1000, qui n'ont également rien donné

Le suivi de l'abattement des pathogènes (hygiénisation de l'urine) est l'un des sujets principaux du projet Valurine. Néanmoins, notons que cette urine n'a pas été utilisée pour l'épandage, car les volumes étaient, au départ, trop faibles. Celle-ci a été récupérée lors du bal des insoumis, organisé par la mairie de Murviel-lès-Montpellier, puis mise en place dans 2 cuves, dont l'une est stockée au soleil (« translucide ») et l'autre à l'ombre, sous une bâche (« opaque »). L'objectif étant de déterminer l'influence du soleil (lumière et chaleur) sur la prolifération ou l'inhibition des bactéries. Les premières analyses ont été effectuées à l'aide de kits IDEXX fournis par l'IRSTEA, puis ECOSEC a investi dans ces mêmes kits, afin de réaliser un suivi périodique.

Observations

L'absence de résultats (ou résultats partiels) pose un problème majeur dans l'étude de l'abattement des pathogènes. Le sujet est actuellement en discussion entre les différents partenaires concernés (notamment ECOSEC, IRSTEA, IEM), ainsi que le fournisseur IDEXX.

Des hypothèses ont été émises, suite à une discussion avec le fournisseur, puisqu'en effet, le cadre d'étude est atypique, les kits étant à la base produits pour l'analyse d'eaux et non d'urines. Par ailleurs, les résultats de notre étude intéressent le fournisseur IDEXX qui n'a aucun recul sur l'utilisation de ses kits sur les urines.

L'erreur ne vient probablement pas de la manipulation, mais plutôt du prélèvement et/ou de la nature de l'effluent. Ci-suit, dans l'ordre de probabilité majeure, les influences potentielles :

- Prélèvement de l'échantillon - le développement d'un biofilm dans le bidon serait remis en suspension lors de l'homogénéisation avant le prélèvement ;
- Effet matrice - les COT (Carbone Organique Total) pourraient interférer avec les réactifs, provoquant ainsi un délai d'activation et induisant un temps d'incubation plus long. En effet, les réactifs fonctionnent avec la consommation de leur carbone par les bactéries. Le fait que l'urine contienne également du carbone pourrait ralentir cette réaction ;
- Inhibiteur potentiel - les réactifs pourraient être inhibés par les éléments présents dans l'échantillon ou simplement générer une fluorescence naturelle qui gênerait la lecture des résultats ;
- Choc osmotique (très peu probable) - le réactif (Enterolert ou Colilert-18) pourrait créer un choc osmotique au sein du flacon, perturbant ainsi l'analyse. Pour y remédier, il suffit de mettre l'échantillon d'urine en dernier, une fois le flacon rempli d'eau et de réactif.

Néanmoins, les conseils du fournisseur ont été mis en oeuvre lors de la dernière analyse. En effet, celle-ci a été effectuée sans homogénéisation de la cuve, en insérant l'échantillon d'urine en dernier et en laissant l'échantillon plus longtemps dans l'étuve (dans les limites possibles) et pourtant aucun résultat n'en est ressorti. Un envoi d'échantillon dans un laboratoire spécialisé permettrait de déterminer avec précision l'origine du problème, ainsi que d'avoir des précisions sur la démarche à suivre pour les prochaines analyses.

4. Protocole d'analyse : NPK et NaCl par kit LCK / chromatographie ionique (voir Annexe 2)

Les protocoles concernant les analyses NPK et NaCl doivent suivre ceux fournis par les kits LCK 238 (Ntotal), présents à l'intérieur des boîtes des différents kits à l'IEM, néanmoins, une vérification par chromatographie ionique sera effectuée.

L'analyse par chromatographie ionique va permettre de mesurer, de manière précise, les éléments suivants : No, K, Mg, Ca, Cl, SO₄, PO₄.

Informations complémentaires du protocole LCK : mesure LCK 238 Ntotal, dilution de l'échantillon par un facteur 125, soit 0,8 mL dans 100 mL (d'eau distillée).

Matériel



Figure 17 : Kit Ntotal LCK 238 Hach Lange (page de mesure 5 à 40 mg/L)



Figure 18 : Chauffe-tube ECO 25 Thermoreactors



Figure 19 : Spectrophotomètre avec technologie RFID DR3900 de Hach Lange

Résultats

	Traitements	Protocole synthétique	Nombre d'analyses		Résultats des analyses	
			0 - 30 cm	30 - 45 cm	0 - 30 cm	30 - 45 cm
Avant premier apport (28/06/2018)	Sol	Ligne 2 : struvite *1 échantillon de 0 à 30 cm et 1 échantillon de 30 à 45 cm *Mélanger et homogénéiser *Récupérer 500 g pour conserver au congélateur (étiquette date et traitement)	1	1		
		Ligne 4 : eau claire *1 échantillon de 0 à 30 cm et 1 échantillon de 30 à 45 cm *Mélanger et homogénéiser *Récupérer 500 g pour conserver au congélateur (étiquette date et traitement)	1	1		

Figure 20 : Tableau récapitulatif des prélèvements d'échantillons de sol, avant épandage



Figure 21 : Échantillon de sol



Figure 22 : Tarière permettant le prélèvement des échantillons de sol

Annexe 1 : Protocole IDEXX

ITM 160 ANALYSES BACTERIOLOGIQUES SELON LA METHODE COLILERT® / ENTEROLERT®



OU Comment détecter et quantifier les Coliformes totaux, les *Escherichia coli* et les Entérocoques intestinaux dans le cadre de l'autocontrôle des eaux :

- ✓ Eau traitée et distribuée (EDCH : Eau Destinée à la Consommation Humaine) ;
- ✓ Eau après intervention sur réseau AEP ;
- ✓ Performance du traitement de potabilisation ;
- ✓ Qualité d'eau brute ; Identification rapide de la nature d'une pollution... ;
- ✓ Qualité des eaux épurées (STEU) ;
- ✓ Qualité des eaux de baignade.

⚠ Ces analyses ne peuvent être prise en compte pour le contrôle réglementaire (ARS)

RAPPEL SUR LES METHODES D'ANALYSES BACTERIOLOGIQUES

- ➔ Méthodes normalisées en laboratoire par filtration sur membrane* ou par microplaques** :
 - NF EN ISO 9308-1* et 9308-3** pour les *Escherichia coli* et les coliformes totaux ;
 - NF EN ISO 7899-2* et 7899-1** pour les Entérocoques intestinaux.
- ➔ Méthode de terrain selon les marques COLILERT® ou ENTEROLERT® (société IDDEX) selon 2 procédures possibles :
 - ➔ Analyse P/A « Présence / Absence » ou analyse Quanti-Tray « quantifiée »

Méthode colorimétrique et chromogénique assez rapide et sélective pour la détection et la quantification :

- o Des coliformes totaux et *E. coli* dans l'eau grâce aux réactifs COLILERT® (résultats sous 24 heures) ou COLILERT®-18 (résultats sous 18 heures) ;
- o Des entérocoques intestinaux grâce aux réactifs ENTEROLERT®-e (toutes eaux) ou ENTEROLERT®-DW (spécifique « Drinking Water » donc pour les eaux potables et eaux ayant subi un traitement d'oxydation), avec résultats sous 24 heures. La formule « DW » est enrichie de façon à mieux « récupérer » les bactéries stressées par l'oxydant.

➔ Permet la détection simultanément de ces bactéries à 1 NPP /100 mL en 18 à 24 heures, même en présence de bactéries hétérotrophes (jusqu'à 2 millions UFC par 100 mL).



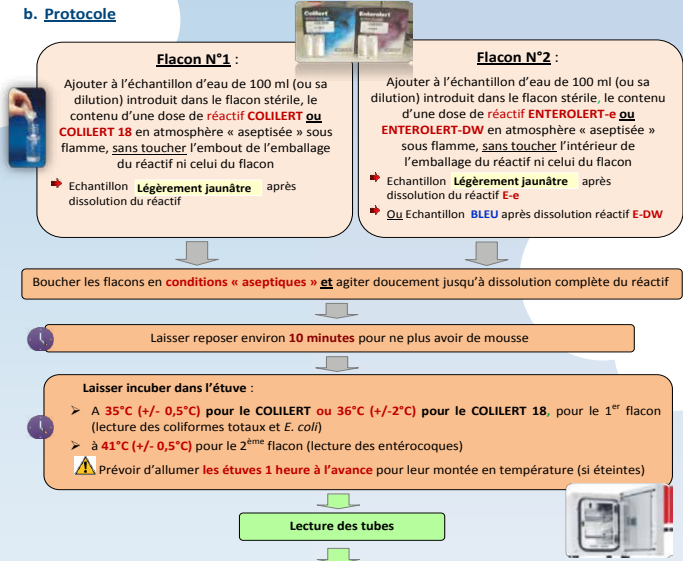
- ⚠ Respecter les règles de sécurité de manipulation en laboratoire (Consigne sécurité N°49) et assurer la gestion des déchets biologiques contaminés (DSE IT 46)
- ⚠ CHOIX DES ETUVES : ne pas sélectionner l'étuve « BOEKEL » proposée par IDDEX (médocre en stabilité de T° et en robustesse) mais plutôt l'étuve BINDER (ou toute autre étuve proposée par VWR, FISCHER...)

I. ANALYSE AVEC LE TEST « P/A » ou PRESENCE / ABSENCE

a. Matériel

2 Flacons stériles (contenance 100ml = au trait)	Lampe UV (365 nm)	Chambre noire (support de la lampe UV)	2 Etuves	Réactifs unidoses COLILERT et ENTEROLERT (par 20, 100 ou 200)	Flacon comparateur	Chalumeau ou Bec Meker ou Bunsen (pour une atmosphère « aseptisée »)

b. Protocole

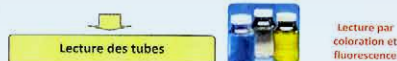
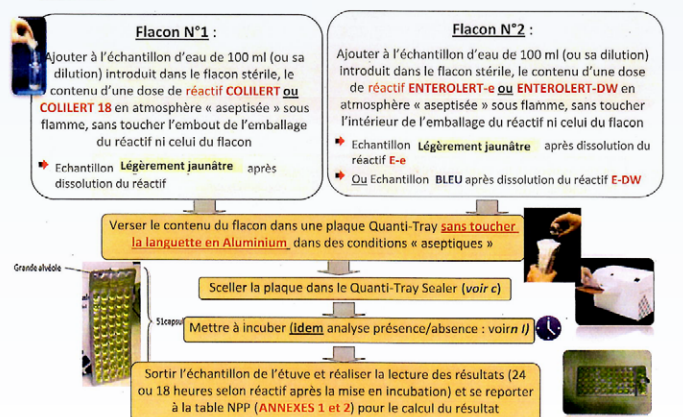


II. ANALYSE AVEC LE TEST « QUANTI/TRAY » DE QUANTIFICATION

a. Matériel

2 Flacons stériles (contenance 100ml = au trait)	Lampe UV (365 nm)	Chambre noire (support de la lampe UV)	2 Etuves	Réactifs unidoses COLILERT et ENTEROLERT (par 20, 100 ou 200)	Chalumeau ou Bec Meker ou Bunsen (pour une atmosphère « aseptisée »)
Plaques Quanti-Tray (51 cupules) ou Quanti-Tray/2000 (97 cupules)	Appareil Quanti-Tray Sealer	Plaque comparateur			

b. Protocole



Sortir le **Flacon n°1** de l'étuve après 24h (à 28h) d'incubation si COLILERT ou 18h (à 22h) si COLILERT 18 et lire le résultat :

➔ **Coliformes totaux** : Apparition d'une coloration **jaune** d'intensité égale ou supérieure à celle du comparateur en **présence** de coliformes totaux

⚠ Si Echantillon Légèrement jaunâtre : Absence de coliformes donc également d'*E. coli*

➔ **Escherichia coli** : Placer le flacon et le comparateur sous la lampe UV dans la chambre noire. Une coloration **jaune et fluorescente** d'intensité supérieure ou égale à celle du comparateur apparaît en **présence** d'*E. coli*

Comparateur



Sortir le **Flacon n°2** de l'étuve après 24h (à 28h pour E-DW) d'incubation et lire le résultat :

➔ **Entérocoques avec ENTEROLERT-e** : Placer le flacon et le comparateur sous la lampe UV dans la chambre noire. **Présence** si apparition de coloration **jaune et fluorescente** d'intensité supérieure ou égale à celle du comparateur

➔ **Entérocoques avec ENTEROLERT-DW** : Apparition d'une coloration **verte** d'intensité égale ou supérieure à celle du comparateur en **présence** d'Entérocoques (sans lampe).

⚠ Si Echantillon Légèrement jaunâtre : Résultat négatif et Absence d'Entérocoques

En temps normal, les **incubateurs ne doivent pas être arrêtés**, afin de les conserver à bonne température. Celle-ci doit cependant être vérifiée régulièrement. Vérifiez également régulièrement les thermomètres de contrôle.

➔ cf IT Vérification de thermomètre de mesure ou de régulation d'appareil (IT 05 08).

● **Lecture des résultats :**

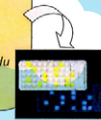
PLAQUE DU FLACON N°1 :

- **Coliformes totaux :** compter les cupules **jaunes** (sans la lampe UV)
- **Escherichia coli :** compter les cupules **jaunes et fluorescentes** (sous lampe UV)

PLAQUE DU FLACON N°2 :

- **Entérocoques (E-E) :** compter les cupules **jaunes et fluorescentes** (sous lampe UV)
- **Entérocoques (E-DW) :** compter les cupules **vertes** (sans la lampe UV)

Se reporter à la table NPP ou MPM 51 ou 97 cupules (ANNEXES 1 et 2) pour le calcul du résultat (Exemple : 3 cupules fluorescentes correspondent à un NPP (Nombre le Plus Probable) ou MPM (Most Probable Number) de 3,1 / 100mL)



Un « **Comparateur Quanti-Tray** » spécifique à chaque type de plaque peut être utilisé pour aider à la lecture des résultats (comparateur de couleur limite et fluorescent permettant de faire la distinction entre les résultats au seuil positif et les résultats négatifs).



- ⚠ A conserver dans sa pochette à l'abri de la lumière et entre 2 et 30°C
- ⚠ Durée de conservation de 6 mois maximum

c. Utilisation du Quanti-Tray Sealer

➤ **Phase chauffage :** Changement de couleur du voyant (jaune en vert si température atteinte).

➤ **Sceller une plaque Quanti-Tray :**

- Veiller à faire remonter vers la cupule supérieure les bulles d'air piégées dans l'échantillon en inclinant verticalement et en tapotant la plaque.
- Placer la plaque Quanti-Tray avec son échantillon sur le plateau en caoutchouc de même forme. Vérifier que **chaque cupule se trouve bien dans un trou du plateau.**
- Placer le tout sur la tablette d'entrée de l'appareil, **la plus grande alvéole en dernier.**
- Faire glisser le plateau et la plaque à sceller jusqu'à ce que le moteur les attrape et les entraîne.
 ⚠ **Attention aux doigts.**
- Attendre **15** secondes : Plateau et plaque sont partiellement éjectés à l'arrière du Quanti Tray Sealer.
- Récupérer le tout et mettre la plaque à incuber.



⚠ Si le plateau est mal positionné dans l'appareil ou si la plaque est mal installée : possibilité de récupérer le tout en maintenant le bouton noir enfoncé SAUF si le plateau est entièrement à l'intérieur de l'appareil Quanti Tray Sealer. En cas de problème consulter la notice.

III. INFORMATIONS COMPLEMENTAIRES

➤ **Sélection des plaques de Quanti-Tray**

Il existe 2 plaques de numération : Quanti-Tray : pour une numération <200 NPP/100 mL ou Quanti-Tray/2000 pour une numération <2000 NPP/100mL :

- Dans le cas des eaux de surface, eaux épurées ou eaux de baignade très contaminées : utiliser le Quanti-Tray/2000 ; des dilutions de l'échantillon avec de l'eau stérile sont néanmoins possibles.
- Dans le cas d'eaux peu contaminées (épurées désinfectées) et d'EDCH: le Quanti-Tray classique suffit.

➤ **Cas de la numération pour les eaux de baignade en eau de mer ou saumâtre :**

Il est nécessaire de diluer l'échantillon au 1/10^è avec de l'eau stérile, non tamponnée et exempte d'oxydant.

- Remplir un flacon stérile avec 90 ml d'eau stérile.
- Ajouter le contenu d'une dose de Colilert ou Colilert-18 ou Enterolert-e et agiter doucement jusqu'à dissolution du réactif.
- Rajouter les 10 mL d'eau de mer ou saumâtre dans le flacon et agiter soigneusement.
- Verser le contenu du flacon dans un Quanti-Tray et le sceller dans le Quanti-Tray Sealer. Puis suivre les indications précisées ci-dessus.
- Après lecture de la plaque, multiplier la valeur de NPP par le facteur de dilution 10.

➤ **Analyse des échantillons contenant un résiduel désinfectant**

Il est nécessaire de neutraliser le résiduel d'oxydant qui peut interférer avec la coloration du réactif voire avec l'analyse ; le prélevement doit être réalisé en flacon contenant un neutralisant (flacon IDDEX avec thiosulfate de sodium ou autre). L'excès de sel neutralisant n'interfère pas l'analyse.

➤ **Certification AFNOR Validation :**

La méthode **COLILERT®-18/Quanti-Tray®** est certifiée AFNOR Validation :

- depuis novembre 2009 pour *E. coli* et des coliformes dans l'EDCH (traitée et distribuée)
- et depuis juin 2012 pour *E. coli* et des coliformes dans les eaux de baignade :



Ce test revêt une notoriété puisque reconnu comme méthode alternative aux méthodes normalisées de référence.

Il est donc **conseillé d'utiliser COLILERT-18**, parce que le test COLILERT n'est pas certifié AFNOR Validation et nécessite une incubation plus chaude (35 ± 0,5°C et non 36 ± 2°C) et plus longue (24 à 28 h et non 18 à 22h).

Annexe 1 : Table NPP du Quanti-Tray "51 Cupules"

Nombre de cupules donnant une réaction positive par échantillon de 100 mL	Nombre le Plus Probable NPP/100 mL	Limites de confiance à 95 %	
		Minimum	Maximum
0	< 1	0,0	3,7
1	1,0	0,3	5,6
2	2,0	0,6	7,3
3	3,1	1,1	9,0
4	4,2	1,7	10,7
5	5,3	2,3	12,3
6	6,4	3,0	13,9
7	7,5	3,7	15,5
8	8,7	4,5	17,1
9	9,9	5,3	18,8
10	11,1	6,1	20,5
11	12,4	7,0	22,1
12	13,7	7,9	23,9
13	15,0	8,8	25,7
14	16,4	9,8	27,5
15	17,8	10,8	29,4
16	19,2	11,9	31,3
17	20,7	13,0	33,3
18	22,2	14,1	35,2
19	23,8	15,3	37,3
20	25,4	16,5	39,4
21	27,1	17,7	41,6
22	28,8	19,0	43,9
23	30,6	20,4	46,3
24	32,4	21,8	48,7
25	34,4	23,3	51,2
26	36,4	24,7	53,9
27	38,4	26,0	56,6
28	40,6	28,0	59,5
29	42,9	29,7	62,5
30	45,3	31,5	65,6
31	47,8	33,4	69,0
32	50,4	35,4	72,5
33	53,1	37,5	76,2
34	56,0	39,7	80,1
35	59,1	42,0	84,4
36	62,4	44,6	88,8
37	65,9	47,2	93,7
38	69,7	50,0	99,0
39	73,8	53,1	104,8
40	78,2	56,4	111,2
41	83,1	59,9	118,3
42	88,5	63,9	126,2
43	94,5	68,2	135,4
44	101,3	73,1	146,0
45	109,1	78,6	159,7
46	118,4	85,0	174,5
47	129,8	92,7	195,0
48	144,5	102,3	224,1
49	165,2	115,2	272,2
50	200,5	135,8	387,6
51	> 200,5	146,1	infinite

IDEXX Quanti-Tray®/2000 MPN Table

# Large Wells Positive	# Small Wells Positive	
	30	60
0	25,3	25,4
1	26,6	27,7
2	28,0	30,0
3	29,5	32,5
4	31,1	35,1
5	32,8	37,8
6	34,6	40,6
7	36,4	43,5
8	38,3	46,4
9	40,3	49,4
10	42,4	52,4
11	44,5	55,5
12	46,6	58,6
13	48,8	61,7
14	51,1	64,8
15	53,4	67,9
16	55,8	71,0
17	58,2	74,1
18	60,6	77,2
19	63,0	80,3
20	65,4	83,4
21	67,8	86,5
22	70,2	89,6
23	72,6	92,7
24	75,0	95,8
25	77,4	98,9
26	79,8	102,0
27	82,2	105,1
28	84,6	108,2
29	87,0	111,3
30	89,4	114,4
31	91,8	117,5
32	94,2	120,6
33	96,6	123,7
34	99,0	126,8
35	101,4	129,9
36	103,8	133,0
37	106,2	136,1
38	108,6	139,2
39	111,0	142,3
40	113,4	145,4
41	115,8	148,5
42	118,2	151,6
43	120,6	154,7
44	123,0	157,8
45	125,4	160,9
46	127,8	164,0
47	130,2	167,1
48	132,6	170,2
49	135,0	173,3
50	137,4	176,4

Annexe 2 : Protocole NPK



Figure 23 : Kit d'analyse NPK

Etape 1 : prélever 0,5 mL de l'échantillon, puis ajouter 2 mL de la solution A et 1 pastille de la solution B

Etape 2 : mettre la nouvelle solution dans l'étuve à 100°C pendant 1h

Etape 3 : ajouter une pastille de la solution C lorsque que la température est ambiante

Etape 4 : homogénéiser la nouvelle solution

Etape 5 : prélever 0,5 mL de cette nouvelle solution et la déverser lentement dans petit flacon à code barre

Etape 6 : ajouter lentement 0,2 mL de la solution D

Etape 7 : homogénéiser rapidement

Etape 8 : mettre le flacon dans le chromatographe pour lecture de la concentration, pendant 15 min