

2019/2020

# Microbiologie de l'eau

Préparé par Dr. A.Hadji

- **Plan:**
  - I) Introduction**
  - II) méthodes générales de prélèvement, transport et conservation**
  - III) Transport et conservation au laboratoire**
  - IV) Méthodes générales d'examen bactériologique des eaux**
  - V) Bactéries indicatrices de contamination**



# I) Introduction

- L'eau est un élément essentiel au fonctionnement de tout écosystème, mais aussi des activités humaines (agriculture, industrie) et de notre vie de tous les jours (usage domestique, loisirs).
- L'origine des eaux servant à l'alimentation humaine provient des eaux souterraines, les eaux douces de surface c'est-à-dire celle des ruisseaux, des rivières, des fleuves, des barrages, ou dans certains cas, par adoucissement des eaux de mer

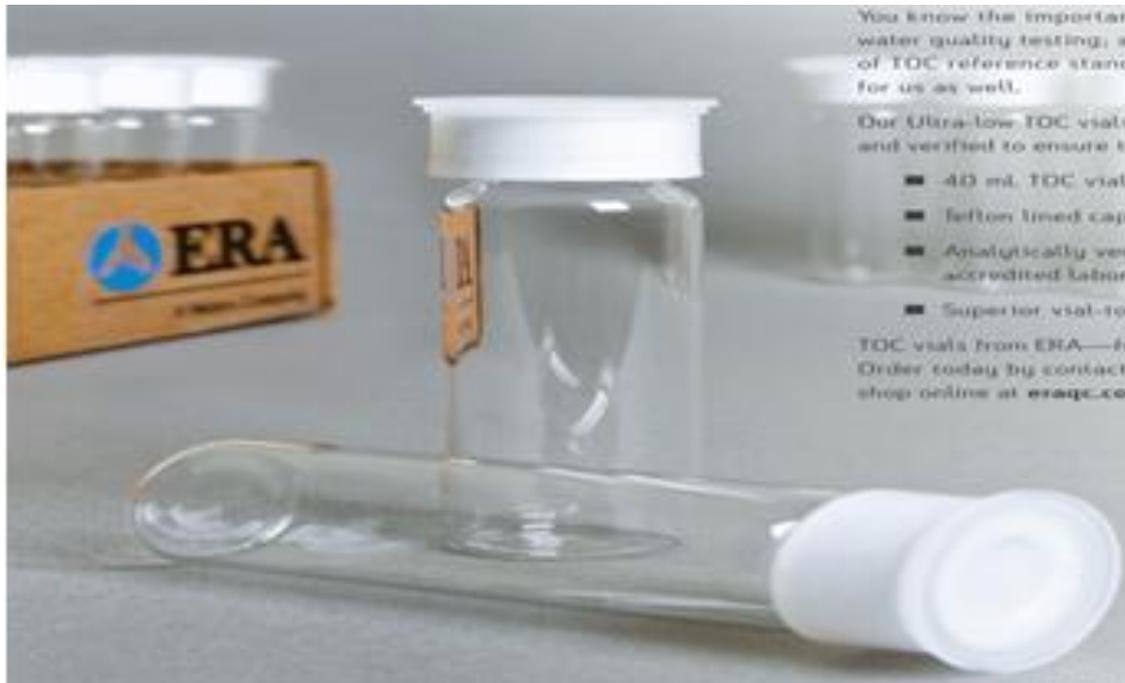
- La contamination microbiologique de l'eau peut être directe ou indirecte par les excréta humains ou d'animaux et surtout de la contamination fécale



- L'Algérie connaît de genre de problème particulièrement en saison chaude pour diverses raisons (pénurie d'eau , habitat précaire ...etc)

## II) méthodes générales de prélèvement, transport et conservation

- **1.) Matériel de prélèvement:**
- Le récipient utilisé doit assurer, une fois bouché, une protection totale contre toute contamination.
- Il ne doit pas céder à l'échantillon de substances toxiques vis-à-vis des bactéries.
- On peut utiliser des flacons en verre de 250, 500 ou 1 000 mL, de préférence borosilicatés, à bouchage émeri.
- Avant l'usage, ces flacons doivent être soigneusement lavés, puis rincés car il ne doit rester aucune trace d'un éventuel détergent ou antiseptique. Ils sont ensuite séchés puis bouchés au coton cardé ; il est recommandé d'apposer une étiquette permettant d'inscrire ultérieurement l'identification du prélèvement.
- Le bouchon émeri, destiné à la fermeture après le prélèvement est lavé, rincé, séché, puis enveloppé séparément dans un morceau de papier filtre
- Le bouchon emballé et le flacon sont alors enveloppés de papier filtre et stérilisés à l'autoclave (120 °C) durant 15 minutes



You know the importance of water quality testing, and you know the importance of TOC reference standards for us as well.

Our Ultra-low TOC vials are analytically verified and verified to ensure the highest quality.

- 40 ml. TOC vials
- Teflon lined caps
- Analytically verified and accredited laboratories
- Superior vial-to-vial consistency

Order today by contacting your local ERA representative or order online at [eraqc.com](http://eraqc.com)

### III) Transport et conservation au laboratoire

- La teneur initiale en germes des eaux risque de subir des modifications dans le flacon, après le prélèvement. C'est pour cela que toute analyse doit être effectuée le plus rapidement possible
- si la durée du transport dépasse 1 heure, et si la température extérieure est supérieure à 10 °C, les prélèvements seront transportés dans des glacières dont la température doit être comprise entre 4 à 6 °C. Même dans ces conditions, l'analyse bactériologique doit débuter dans un délai maximal de 8 heures, après le recueil de l'échantillon: plus la pollution microbiologique est grande, plus le délai de conservation doit être court.
- Il est donc admis que le délai maximum entre le prélèvement et le début de l'analyse ne doit pas excéder 24 heures, l'échantillon étant maintenu à moins de + 4 °C et qu'il est préférable de raccourcir ce délai lorsque l'eau est présumée très polluée.
- Après la prise d'essai, il est recommandé de placer le reste du prélèvement non utilisé au réfrigérateur. Il peut arriver en effet que les premières lectures bactériologiques, 24 ou 48 heures après l'ensemencement, donnent des résultats inattendus, incitant à vérifier l'analyse

## IV) méthodes générales d'examen bactériologique des eaux

- l'analyse bactériologique n'est pas seulement qualitative mais aussi quantitative.
- Dans les eaux très polluées, il convient donc de pratiquer de nombreuses dilutions (eaux de rivière, eaux usées, etc.).
- Dans d'autres cas, comme dans celui des eaux destinées à l'alimentation, au thermalisme, à la baignade, les exigences réglementaires imposent une sensibilité telle qu'une concentration est au contraire nécessaire (absence de bactéries dans 100, 250, 1 000 mL)

# Détermination bactériologique

dénombrement direct des colonies

concentration par filtration

inoculation d'un volume donné de l'échantillon en milieu solide

répartition de l'inoculum dans un de tubes de milieu de culture liquide

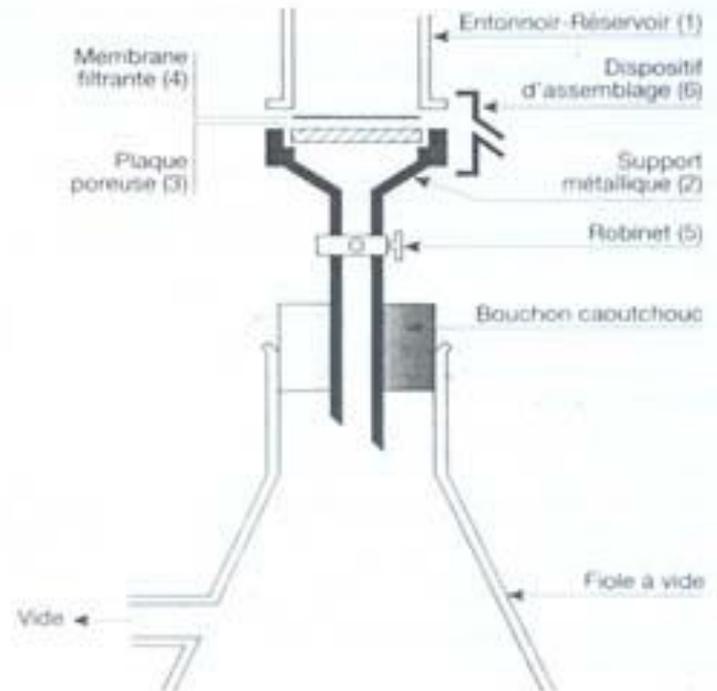
évaluation par calcul statistique du nombre le plus probable d'unités infectieuses (NPP)

Inoculum dans des puits de microplaques contenant un substrat nutritif déshydraté

# 1) Méthodes générales de dénombrement après concentration

Concentration in situ par adsorption: sur de la gaze hydrophile

Concentration au laboratoire par filtration sur membranes



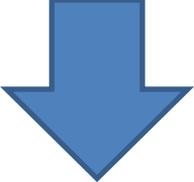
Coupe schématique d'un appareil de filtration sur membranes

L'expression des résultats se fait sous forme d'un nombre d'unités formant colonies (UFC).

## 2) Méthodes générales de dénombrement direct par numération des colonies après ensemencement sur (ou dans) une gélose nutritive

- Dans ce type de méthodes, les bactéries maintenues dispersées dans un milieu solide (ou à sa surface), donnent naissance, dans des conditions favorables, à des colonies isolées les unes des autres qui, de ce fait, peuvent être directement comptées.
- Connaissant le volume d'échantillon ensemencé, il est possible d'exprimer le résultat final du dénombrement en fonction d'un volume d'eau pris comme unité : x colonies pour 1 mL, ou y colonies pour 100 mL.
- On admet comme hypothèse de travail que chaque colonie correspond à une bactérie, ce qui d'ailleurs en pratique est loin d'être toujours exact ; plusieurs bactéries s'adsorbent, par exemple, sur une même particule et ne donnent naissance qu'à une seule colonie. Parfois, la sélectivité du milieu est telle que le premier dénombrement répond immédiatement au but de l'analyse
- Il est alors nécessaire, en principe, de repiquer sur des milieux confirmatifs toutes les colonies suspectes

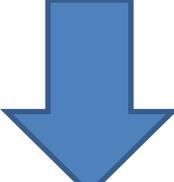




**Dénombrement par  
incorporation en gélose**



La méthode fréquemment utilisée (bactéries aérobies revivifiables) consiste à mélanger dans une boîte de Pétri de 90 à 100 mm de diamètre, 1 mL d'échantillon et 15 mL de milieu gélosé, fondu et ramené à une température de 45 °C environ. Dans ces conditions, le nombre maximum de colonies acceptable pour éviter les phénomènes de confluence et de compétition bactérienne est généralement estimé à 300



**Dénombrement par étalement  
en surface**



Un faible volume d'échantillon est réparti avec un étaleur stérile (pipette Pasteur repliée « en rateau ») sur la surface d'une gélose en boîte de Pétri. Pour une boîte de 90 à 100 mm de diamètre, ce volume ne peut guère excéder 0,2 mL. Cette technique a l'avantage de ne pas donner lieu à des chocs thermiques. Elle est particulièrement favorable pour les germes aérobies stricts

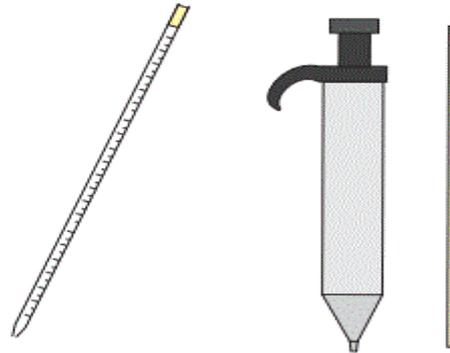
### 3.3 Méthode générale de dénombrement en milieu liquide par détermination du nombre le plus probable (NPP)

- Cette méthode est une estimation statistique du nombre de micro-organismes supposés distribués dans l'eau de manière parfaitement aléatoire.
- Dans ce type de méthode, les bactéries se multiplient librement dans le milieu liquide. En cas de présence, l'ensemble du milieu liquide inoculé vire à la « positivité » (trouble ou virage de l'indicateur).
- Un jugement quantitatif est possible en jouant sur les volumes de la prise d'essai.
- La précision s'accroît avec le nombre de replicats par dilution si bien que les microplaques de 12 × 8 puits sont très bien adaptées à la méthode. Celle-ci permet, en fonction du nombre de tubes ou puits « positifs » dans chaque série, d'indiquer la valeur statistiquement la plus probable : « nombre le plus probable » (NPP)

Le matériel :

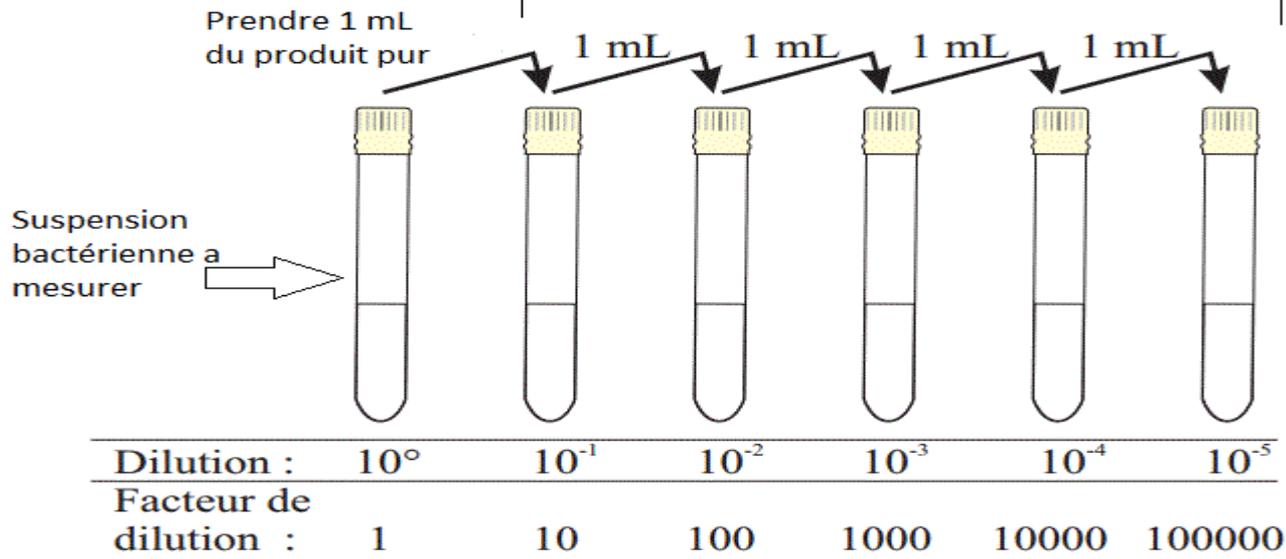


Tubes de diluant  
de 9 mL



Pipette graduée ou pipette paille de 1 mL

La technique :



- exemple

Volume de l'inoculum: 1mL	Produit pur	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Résultat	+	+	+	+	-	-

- Il y a au moins 1 micro-organisme dans 1 mL de la dilution  $10^{-3}$  et moins d'un micro-organisme dans 1mL de la dilution  $10^{-4}$  et donc on peut en déduire qu'il y a au moins  **$10^3$  micro-organismes** mais moins de  **$10^4$  micro-organismes** dans 1mL de produit pur

• **Exemple avec des essais multiples (3 tubes par dilution)**

Dilution	Produit pur	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>
Résultat	+++	+++	+++	++-	+--	---
Chiffre égale à la somme des tubes positifs	3	3	3	2	1	0

Interprétation statistique: méthode du NPP (table de Mac Grady)

• Se reporter au table de Mac Grady pour 3 tubes de dilution afin de trouver le NPP correspondant au nombre 321: **le NPP est 15.**

Cela signifie qu'il y a statistiquement quinze bactéries dans l'inoculum de la dilution 10<sup>-2</sup> mL. D'après les limites de confiance données par certaines tables, cette valeur numérique de 15 est en fait considérée comme comprise entre 3 et 38 avec une probabilité de 95 %, entre 2 et 52 avec une probabilité de 99 %.

En déduire la concentration en micro-organismes par mL de produit pur N.

NPP= nombre le plus probable obtenu par lecture de la table de Mac Grady

V inoculum= 1 mL

Fd= facteur de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique 10<sup>-2</sup>

N= NPP /V inoculum \* Fd

15/0,01 =15 10<sup>2</sup> micro-organismes par mL

Tables NPP (d'après la norme ISO 7218 :1996(F))

**Tableau 1 - Table NPP pour 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) et 3 x 0,01 g (ml).**

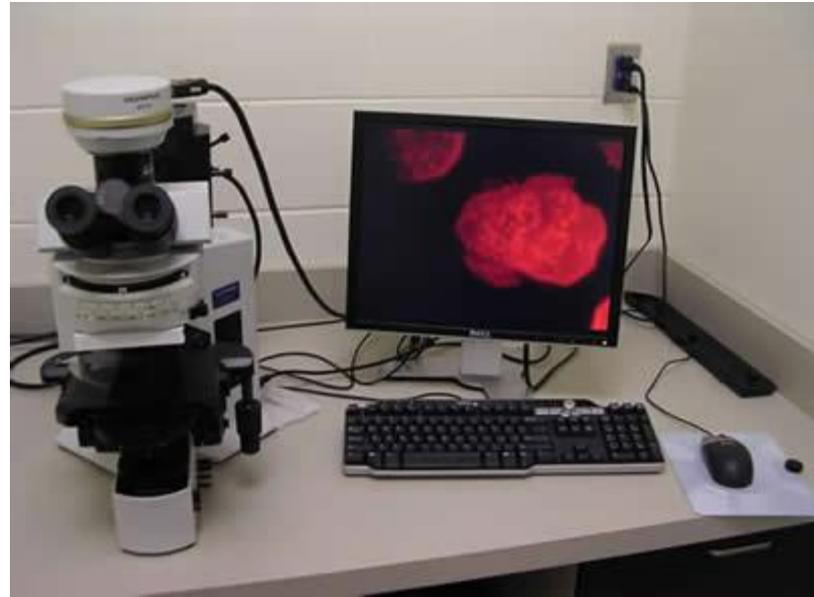
Nombre de résultats positifs			NPP	Catégorie lorsque le nombre d'essais de mesures est de 1 pour le lot considéré	Limites de confiance			
					>95%	>95%	>99%	>99%
0	0	0	<0,30		0,00	0,94	0,00	1,40
0	0	0	0,30	3	0,01	0,95	0,00	1,40
0	1	0	0,30	2	0,01	1,00	0,00	1,60
0	1	1	0,61	0	0,12	1,70	0,05	2,50
0	2	0	0,62	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0	3	0	0,94	0	0,35	3,50	0,18	4,60
1	0	0	0,36	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1	0	1	0,72	2	0,12	1,70	0,05	2,50
1	0	2	1,1	0	0,4	3,5	0,2	4,6
1	1	0	0,74	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1	1	1	1,1	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1	2	0	1,1	2	0,4	3,6	0,2	4,6
1	2	1	1,5	3	0,5	3,8	0,2	5,2
1	3	0	1,6	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2	0	0	0,92	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2	0	1	1,4	2	0,4	3,5	0,2	4,6
2	0	2	2	0	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	0	1,5	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2	1	1	2,0	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2	1	2	2,7	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	0	2,1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2	2	1	2,8	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	2	2	3,5	0	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	0	2,9	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2	3	1	3,6	0	0,9	9,4	0,5	14,2
3	0	0	2,3	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3	0	1	3,8	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3	0	2	6,4	3	1,6	18,1	1,0	25,0
3	1	0	4,3	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3	1	1	7,5	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3	1	2	12	3	3	36	2	44
3	1	3	16	0	3	38	2	52
3	2	0	9,3	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3	2	1	15	1	3	38	2	52
3	2	2	21	2	3	40	2	56
3	2	3	29	3	9	99	5	152
3	3	0	24	1	44	99	3	152
3	3	1	46	1	9	198	5	283
3	3	2	110	1	20	400	10	570
3	3	3	>110					
autres valeurs			non cité dans la table ISO 7218 : 1996 (F)					

# V) Bactéries indicatrices de contamination

- Sont distingués deux types principaux d'indicateurs.
- Les indicateurs de contamination fécale permettent d'apprécier, avec plus ou moins de sûreté ou de précocité, le risque d'une contamination par des matières fécales pouvant véhiculer des micro-organismes pathogènes.
- Les indicateurs d'efficacité de traitement permettent d'évaluer la qualité d'un traitement de désinfection de l'eau vis-à-vis de micro-organismes pathogènes dont la présence peut être redoutée dans l'eau brute utilisée.
- En général, les mêmes germes sont utilisés dans l'une ou l'autre des situations. Si dans ces deux cas, les modalités d'interprétation des résultats sont entièrement différentes

# 1) Dénombrement des germes totaux

- **A) La méthode par épifluorescence microscopique:**
- donne directement le nombre total de germes. Elle est relativement rapide et sensible. Elle ne permet pas la différenciation des bactéries selon des critères taxonomiques, d'activité métabolique ou de viabilité.
- Principe La méthode comprend une fixation permettant la conservation, une coloration avec un composé fluorescent, une filtration sous vide sur une membrane en polycarbonate non fluorescente et une numération avec un microscope à épifluorescence.



- **B) Méthode par incorporation en milieu gélosé**

- L'eau est inoculée par incorporation dans un milieu strictement défini et non sélectif. La lecture est faite après 48 heures d'incubation à 36 °C ou après 72 heures d'incubation à 22 °C. Cette méthode fait cependant subir un choc thermique aux micro-organismes au moment de l'incorporation de la gélose en surfusion (à 45 °C).
- **Domaine d'application** Cette méthode est la plus employée pour les analyses à but sanitaire.
- Avec le mode opératoire type, elle donne des résultats de précision correcte pour les échantillons contenant plus de 30 germes par mL.
- Cette méthode est donc utilisable pour l'application de la réglementation concernant les eaux d'alimentation délivrées sous forme conditionnée

- **Domaine d'application**
- Cette méthode est la plus employée pour les analyses à but sanitaire.
- Avec le mode opératoire type, elle donne des résultats de précision correcte pour les échantillons contenant plus de 30 germes par mL.
- Cette méthode est donc utilisable pour l'application de la réglementation concernant les eaux d'alimentation délivrées sous forme conditionnée

## 2) Dénombrement des coliformes

- **A) Définition des coliformes:**
- Le terme de « coliformes » ne correspond pas à une définition microbiologique stricte.
- Sous ce terme est regroupé un certain nombre d'espèces bactériennes appartenant en fait à la famille des Enterobacteriaceae et qui partagent certaines caractéristiques biochimiques.
- La définition suivante a été adoptée par l'Organisation internationale de standardisation (ISO): **Le terme « coliforme » correspond à des organismes en bâtonnets, non sporogènes, Gram négatifs, oxydase négatifs, facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaries ou d'autres agents de surface possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose (et le mannitol) avec production d'acide et d'aldéhyde en 48 heures, à des températures de 35 à 37 °C**
- Les coliformes comprennent entre autres les genres : Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Yersinia, Serratia
- Le dénombrement de ces organismes à 35-37 °C est souvent désigné sous l'expression de « dénombrement des coliformes totaux

- Le terme de « coliformes fécaux » ou de « coliformes thermo-tolérants » correspond à des coliformes qui présentent les mêmes propriétés (caractéristiques des coliformes) après incubation à la température de 44 °C.
- Le groupe des coliformes fécaux comprend entre autres les espèces suivantes : *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter amalonaticus*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Moellerella wisconsensis*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*.

- Aujourd'hui la réglementation parle de recherche de coliformes totaux.
- On ne distingue pas les coliformes d'origine fécale des autres origines (telluriques, cliniques, etc.) et de E. coli (coliformes d'origine fécale).

- **B) Intérêt hygiénique de la recherche des coliformes dans une eau:**
- Les coliformes sont intéressants car un très grand nombre d'entre eux vivent en abondance dans les matières fécales des animaux à sang chaud et de ce fait, constituent des indicateurs fécaux de la première importance.
- Par ailleurs, leur résistance aux agents antiseptiques, et notamment au chlore et à ses dérivés, est voisine de la résistance des bactéries pathogènes vis-à-vis desquelles ce type de traitement est instauré ; ils constituent donc des indicateurs d'efficacité de traitement

- Au total, trois types d'examens colimétriques peuvent être distingués :
  - ❑ – La recherche et le dénombrement de l'ensemble des coliformes, sans préjuger de leur appartenance taxonomique et de leur origine. Cet examen, capital pour la vérification de l'efficacité d'un traitement désinfectant, est d'un intérêt plus nuancé pour déceler une contamination d'origine fécale.
  - ❑ – La recherche et le dénombrement des coliformes fécaux, examen sans base taxonomique, mais proposé en raison d'une concordance statistique entre leur présence et l'existence d'une contamination fécale quasi certaine.
  - ❑ – La recherche et le dénombrement des seuls *Escherichia coli*.
- Ces deux derniers examens sont, au contraire, essentiels dans le diagnostic d'une contamination fécale.

- **C) Méthode de dénombrement par filtration sur membrane:**
- **Première étape :**
- dénombrement direct sur la membrane Elle conduit à un dénombrement présomptif des coliformes et des coliformes fécaux.
- Filtrer sur deux membranes différentes, dans les conditions précisées antérieurement, deux prises d'essai de l'eau à analyser soigneusement homogénéisée par agitation.
- Les prises d'essai ne devant pas être inférieures à 20 mL, diluer si nécessaire.
- Placer chacune des deux membranes sur une boîte de gélose lactosée au TTC et Tergitol.
- Mettre ces boîtes à incuber durant 24 heures l'une à 37 °C, l'autre à 44 ( 0,5 °C). Très important : l'enceinte à 44 °C doit avoir une température homogène et son atmosphère être chargée de vapeur d'eau.
- La norme demande un complément d'incubation de 24 heures aux deux températures.
- La lecture des boîtes permet de reconnaître la présence de coliformes par les caractéristiques suivantes : – coloration jaune, orange des colonies, résultant de l'absence de réduction du TTC par les coliformes ; en général, les Escherichia coli provoquent

- une coloration nettement orangée ; les Klebsiella une coloration jaune paille ; – halo jaune, dans le milieu lui-même, sous la membrane, autour des colonies précédentes, correspondant à une fermentation du lactose par ces colonies.
- La flore bactérienne associée est généralement beaucoup moins abondante dans la boîte incubée à 44 °C.
- **Deuxième étape :**
- examen et repiquage des colonies sur des milieux de confirmation  
En certaines circonstances, il est possible de se contenter de compter les colonies correspondant, d'après leurs aspects, aux coliformes ; il est toutefois recommandé de pratiquer des tests **simples confirmatifs**.
- **Cette étape** est nécessaire pour les eaux d'alimentation ou lorsque le nombre de colonies « douteuses » est tel qu'une limite de tolérance administrative pourrait être franchie.

- Cette étape comporte à partir d'une colonie isolée :
  - ❑ 1. Coloration par la méthode de Gram et examen microscopique des bacilles à Gram négatif.
  - ❑ 2. Recherche de l'oxydase négative
  - ❑ 3. Impérativement repiquage sur les milieux confirmatifs liquides :
    - a) Bouillon lactosé bilié au vert brillant à cloche, incubé à 37 °C : l'existence d'un virage au jaune et de gaz dans la cloche correspond à une réaction positive pour la présence de coliformes.
    - b) Même milieu, incubé à 44 °C ; une réaction positive correspond à la présence de coliformes fécaux.
    - c) Milieu de Schubert ou milieu lauryl tryptose mannitol à 44 °C ; une réaction positive pour la présence d'Escherichia coli ,

## D) Méthode de détermination du nombre le plus probable (NPP) par inoculation de tubes en milieux liquides:

- **■ Principe:** Après ensemencement de plusieurs dilutions de l'échantillon, chacune dans une série de tubes contenant un milieu de culture non véritablement sélectif mais permettant de mettre en évidence la fermentation du lactose avec production de gaz, repiquer les tubes « positifs » sur un milieu liquide contenant des sels biliaires ou des agents de surface, incubés soit à 36 °C soit à 44 °C pour les dénombrements de coliformes ou de coliformes fécaux respectivement et en outre sur un milieu contenant du tryptophane pour mettre en évidence la production d'indol à partir du tryptophane à 44 °C par les *Escherichia coli* présumés.

La détermination du nombre caractéristique (nombre de tubes positifs pour chaque dilution) permettra l'établissement du nombre le plus probable de coliformes

- **Deuxième étape :** repiquage sur milieu de confirmation
  - Utilisation de bouillon lactosé bilié au vert brillant et de l'eau peptonée au vert brillant pour incubation à 36 °C ± 2 °C, en vue du dénombrement de ce coliforme, et éventuellement un second tube de ce milieu ainsi qu'un tube d'eau peptonée, pour incubation à 44 °C, si l'on veut dénombrer les coliformes fécaux et les *E. coli* présumés. Après une incubation appropriée, procéder à la 24e heure, puis à la 48e heure, à la lecture des tubes positifs permettant de calculer le NPP

- ■ Expression des résultats Les résultats sont exprimés sous la forme : nombre le plus probable de coliformes, coliformes fécaux, E. coli présumés par 100 mL.

### 3) Recherche et dénombrement des bactéries sulfito-réductrices et de leurs spores

- les Clostridium sulfito-réducteurs sont souvent considérés comme des témoins de pollution fécale.
- La forme spore, beaucoup plus résistante que les formes végétatives des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux, permettrait ainsi de déceler une pollution fécale ancienne ou intermittente et ce sont également des germes telluriques
- Dans une telle optique d'interprétation, il y a intérêt à ne rechercher que les espèces les plus susceptibles d'être d'origine fécale : c'est le cas en particulier de **Clostridium perfringens**

- **A) Méthode par incorporation en gélose**
- Après destruction des formes végétatives par chauffage à 80 °C, l'échantillon est incorporé à un milieu de base fondu, régénéré, additionné de sulfite de sodium et de sels de fer.
- L'incorporation se fait dans un tube et non dans une boîte afin de limiter la surface de contact entre le milieu et l'air.
- Après solidification et incubation, la présence de germes sulfito-réducteurs se traduit par un halo noir autour des colonies.
- Milieux de culture : **Gélose viande-foie**
- Il est indispensable de procéder à une lecture dès la 24e heure .
- s'il y a une faible quantité de colonies à la première lecture, et si les colonies sont petites, il peut y avoir un développement de nouvelles colonies dans les 24 heures suivantes

- **B) Méthode par enrichissement en milieu liquide**
- ■ Principe Après destruction des formes végétatives par chauffage assez long pour permettre une sélection des spores dans l'échantillon, la méthode utilise comme révélateur l'action réductrice du sulfite ou du bisulfite et des sels de fer.
- la présence des spores de bactéries sulfito-réductrices, entraîne la formation de sulfure de fer qui colore uniformément en noir les milieux liquides.

## 4) Recherche des Salmonella

- Les salmonelles sont en général considérées comme pathogènes bien que leur virulence et leur pathogénèse varient énormément :  
fièvres typhoïdes, salmonelloses systémiques, gastro-entérites, toxi-infections alimentaires.

- Pour une eau de surface, le volume nécessaire devrait être de 1 à 5 litres et pour une eau destinée à l'alimentation, il est de 5 litres
- **la filtration sur membrane** est la méthode de choix pour les eaux suffisamment claires.
- La centrifugation peut être utile pour les eaux usées riches en matières en suspension ou les boues.
- Pour la recherche de la **S. typhi**, qui n'est généralement pas importante pour le contrôle de la qualité de l'eau mais qui peut être rendue nécessaire dans des circonstances particulières, utiliser un milieu à la **cystine sélénite** et incuber à 35, 1 °C ou 37,1 °C pendant une période allant jusqu'à 24 h.