



MERS REGIONALES

PROGRAMME DES NATIONS UNIES POUR L'ENVIRONNEMENT

31 Octobre 1983

DETERMINATION DES STREPTOCOQUES FECAUX DANS L'EAU DE MER PAR LA METHODE DE CULTURE SUR MEMBRANES FILTRANTES

METHODES DE REFERENCE POUR LES ETUDES DE POLLUTION MARINE

No. 4 Rev. 1

Préparé en coopération avec



OMS

Note: Ce document a été préparé conjointement par l'Organisation Mondiale de la Santé et par le Programme des Nations Unies pour l'Environnement sous les project FP/ME/0503-76-05, ME/0503-81-01 et FP/0503-77-03.

Pour la bibliographie ce document est à citer comme suit:

PNUE/OMS: Détermination des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Référence pour les études de pollution marine No. 4 Rev. 1, PNUE 1983.



MERS REGIONALES

PROGRAMME DES NATIONS UNIES POUR L'ENVIRONNEMENT

31 Octobre 1983

DETERMINATION DES STREPTOCOQUES FECAUX DANS L'EAU DE MER
PAR LA METHODE DE CULTURE SUR MEMBRANES FILTRANTES

METHODES DE REFERENCE POUR LES ETUDES DE POLLUTION MARINE

No. 4 Rev. 1

Préparé en coopération avec



OMS

PREFACE

Le PNUE a débuté le Programme des Mers Régionales en 1974. Depuis lors, le Conseil d'Administration du PNUE a appuyé à plusieurs reprises une approche régionale pour le contrôle de la pollution marine et l'aménagement des ressources marines et côtières et a sollicité le développement de plans d'action régionale.^{1/ 2/}

Un des composants de base des plans d'action, sous le patronage du PNUE dans le cadre du Programme des Mers Régionales, est l'évaluation de l'état de la pollution marine, des sources et des directions de la pollution et de l'impact de la pollution sur la santé de l'homme, sur les écosystèmes marins et sur la qualité de la vie. De manière à aider ceux qui participent à cette activité et à garantir que les données obtenues à travers cette évaluation puissent être comparées sur des bases mondialement compréhensives et ainsi contribuer au Système Mondial de Surveillance continue de l'Environnement (GEMS) du PNUE, une série de méthodes de référence et de manuels d'instructions pour l'étude des pollutions marines a été élaborée et recommandée pour être adoptée par les Gouvernements participant au Programme des Mers Régionales.

Les méthodes et les manuels d'instructions ont été préparés en coopération avec les corps des services spécialisés intéressés des Nations Unies et ont été testés par un nombre d'experts compétents dans le domaine concernant les méthodes décrites.

Dans la description des méthodes et des manuels d'instruction, le style employé par l'Organisation Internationale de Standardisation (OIS) a été suivi aussi près que possible.

Les méthodes et les manuels d'instructions publiés en fascicules du PNUE en tant que Méthodes de Références pour l'Etude des Pollutions Marines, ne sont pas considérés comme des textes finaux et donnés une fois pour toute. Ils sont conçus pour être révisés périodiquement en tenant compte du développement de notre connaissance des problèmes, des instruments d'analyse et de l'actuel besoin des usagers. De manière à faciliter ces révisions, les usagers sont invités à envoyer leurs commentaires et leurs suggestions à:

Mr. le Directeur
Centre d'Activités du Programme des Mers Régionales
Programme des Nations Unies pour l'Environnement
Palais des Nations
GENEVE
Suisse

1/ PNUE (1982) Réalisations et Projets d'extension du programme du PNUE pour les mers régionales et des programmes comparables relevant d'autres organismes. Rapports et études des mers régionales, No. 1.

2/ HULM, P. (1983) Une Stratégie pour les Mers. Le Programme des Mers Régionales: Passé et Avenir du PNUE.

SOMMAIRE

	<u>Page</u>
1. Portée et champs d'application	1
2. Références	1
3. Définition	2
4. Principes	2
5. Appareils et verrerie	2
6. Milieux de culture et produits chimiques	5
7. Prélèvement	7
8. Mode opératoire d'une analyse	8
9. Expression des résultats	12
10. Rapport d'analyse	14

1. PORTEE ET CHAMP D'APPLICATION

La méthode décrite convient pour la numération des streptocoques fécaux dans les eaux côtières de baignade des mers tempérées et tropicales. Elle a été établie pour la surveillance sanitaire des plages balnéaires.

Du fait de leur survie limitée dans l'environnement, il n'est pas recommandé d'utiliser uniquement les streptocoques fécaux pour la détermination de la qualité sanitaire de l'eau. Ajoutées aux données obtenues sur les coliformes fécaux (PNUE/OMS 1983a), les données obtenues sur les streptocoques fécaux peuvent donner une information plus précise sur les sources de pollution et ceci parce que certains streptocoques fécaux sont des hôtes spécifiques.

Cette méthode utilise un procédé de filtration sur membranes qui permet la concentration des bactéries avant leur culture. Elle peut être utilisée en remplacement de la Méthode Fermentative des Tubes Multiples (ou Nombre le Plus Probable: NPP) (PNUE/OMS 1983). Bien que la Méthode de Culture par Filtration sur Membrane (FM) soit préférable au NPP, le choix dépend des conditions locales et des préférences personnelles. En règle générale, la méthode FM est moins fastidieuse et, dû à la préconcentration des bactéries, elle est mieux adaptée dans les cas où l'on doit estimer de faibles concentrations bactériennes. Il faut choisir la méthode NPP lorsque le prélèvement d'eau est très chargé en particules qui pourraient fausser la lecture des membranes après incubation.

Le groupe des streptocoques fécaux provient normalement des intestins des animaux à sang chaud et indiquent une pollution par des matières fécales lorsqu'ils sont mis en évidence dans l'eau de mer. De récents travaux indiquent que des streptocoques, voisins du groupe des streptocoques fécaux, peuvent être trouvés dans certaines plantes ou produits végétaux. Ainsi donc, les rejets effectués par les usines d'industrie alimentaire peuvent également être la source de ces organismes et donnent lieu à des réactions positives lorsqu'ils sont testés par cette méthode. Leur taux de mortalité (T-90) dépend de la salinité, de la température, du rayonnement solaire, etc., et doit être pris en considération lors de l'interprétation des résultats.

2. REFERENCES

- APHA (1981) Standard methods for the examination of water and waste water. American Public Health Association, Washington D.C. (15th edition).
- OMS/PNUE (1983) Réunion de travail sur les méthodes pour la surveillance de certains polluants dans les eaux d'effluents et dans les eaux balnéaires. Rome 24-26 Novembre 1982. OMS Bureau Régional pour l'Europe. Copenhague.

PNUE/OMS (1983a) Détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Référence pour les Etudes de Pollution Marines No. 3, PNUE, Genève.

PNUE/OMS (1983b) Détermination des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la méthode fermentative des tubes multiples (NPP). Méthodes de Référence pour les Etudes de Pollution Marine No. 23, PNUE, Genève.

PNUE/OMS (en préparation) Manuel d'instruction pour la surveillance de la qualité des eaux de baignade et des eaux de conchyliculture. Méthodes de Référence pour les études de Pollution Marine No. 1, PNUE, Genève.

3. DEFINITION

Les streptocoques fécaux sont des cocci sphériques légèrement ovales, Gram-positifs, sous forme de paire ou de courtes chaînettes lors de leur croissance sur la gélose KF contenant une solution de 2,3,5-triphenyl-tetrazolium-chlorure (TTC). Après 48 heures de culture à $36 \pm 1^\circ\text{C}$, le TTC produira sur les colonies une couleur rose à rouge foncé ou des colonies ayant le centre rouge foncé.

4. PRINCIPES

A partir d'échantillons d'eau de mer pris en conditions stériles, une série de dilutions est effectuée selon la quantité de streptocoques fécaux estimée dans le prélèvement d'eau. Des quantités aliquotes de cette série de dilutions sont filtrées à travers des membranes filtrantes de porosité 0,45 μ . Ces membranes de filtrations sont déposées à la surface de la Gélose KF contenant du TTC et incubées à $36 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 heures. Les colonies roses ou rouges ou dont le centre est rouge sont considérées comme étant dues à des streptocoques fécaux.

5. APPAREILS ET VERRERIE

5.1. Flacons pour prélèvement en surface, de capacité 200 à 300 ml, en verre borosilicaté ayant un col d'ouverture assez large et un bouchon avec membrane.

5.2 Une barre de prélèvement (bras extenseur) en matière plastique inoxydable ayant une pince pour tenir le flacon de prélèvement.

5.3 Flacon pour prélèvement en profondeur, du type décrit dans la figure 2 ou de type semblable, lesté et avec une cordelette en plastique.

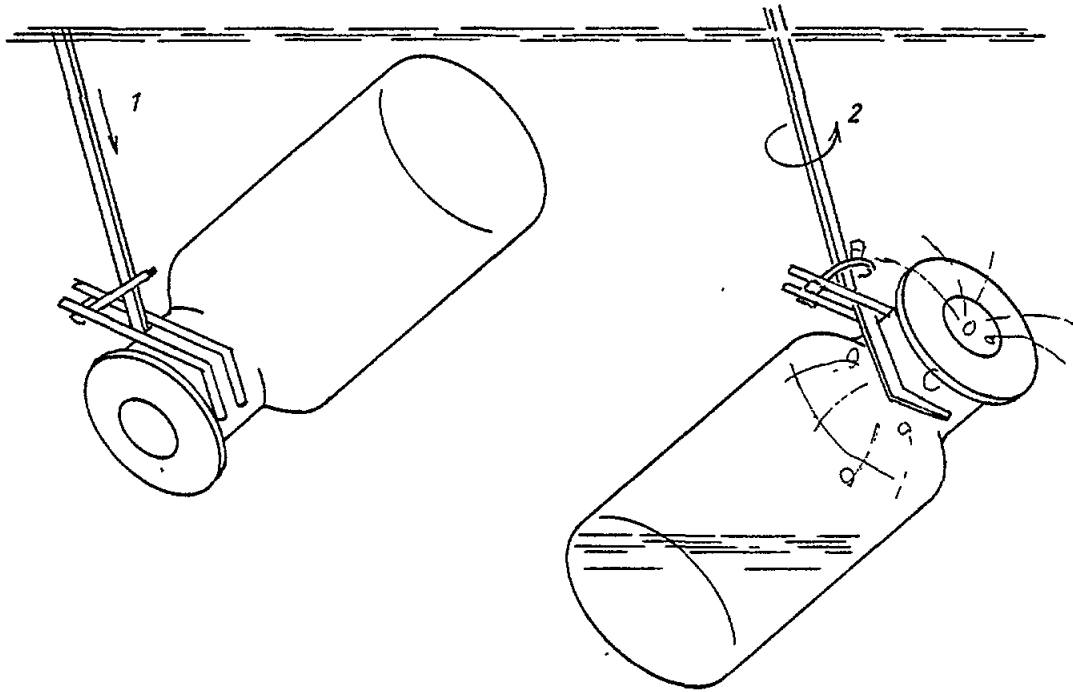


FIGURE 1 : PRELEVEMENT EN SURFACE AU MOYEN D'UN BRAS EXTENSEUR

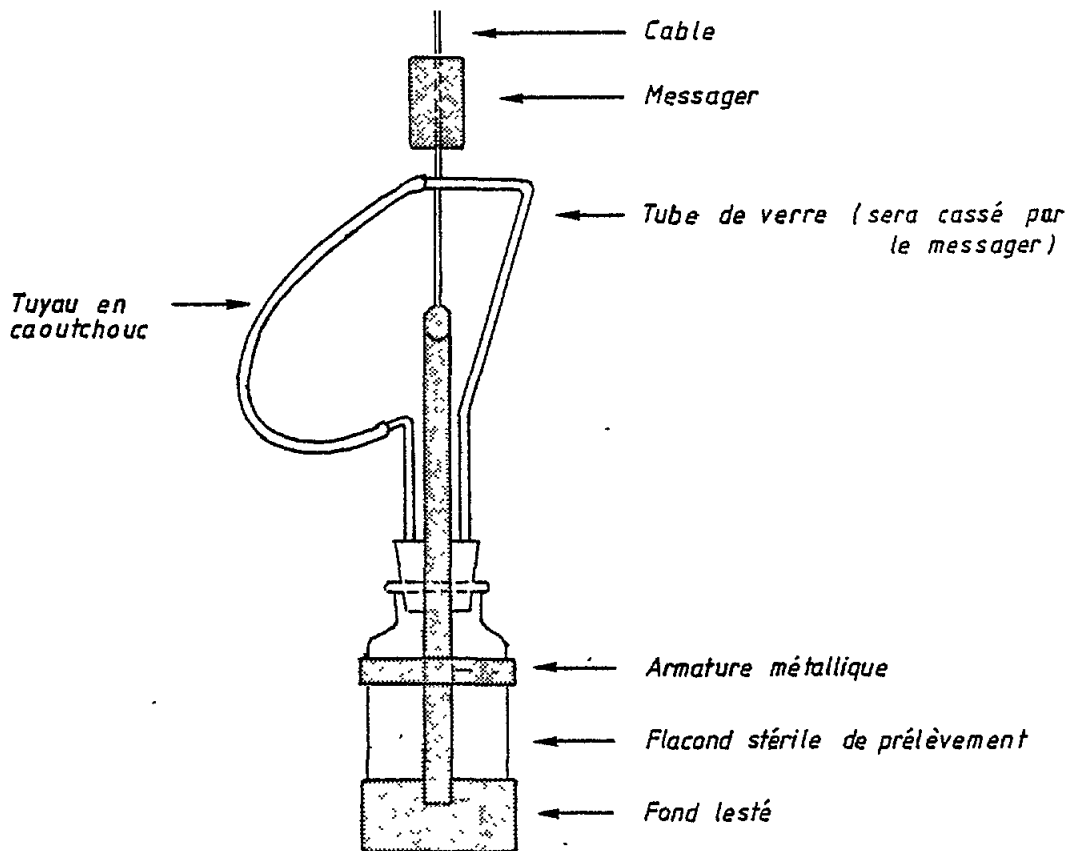


FIGURE 2 : FLACON POUR LES PRELEVEMENTS STERILES AU-DESSOUS DE LA SURFACE

5.4 Mallettes isothermiques avec des sachets réfrigérants (équipement de camping) pour conserver les échantillons.

5.5 Thermomètre gradué de 0 à 50°C ayant une précision de $\pm 1^\circ\text{C}$, de préférence incassable (plastique), à utiliser pour noter la température dans les malettes (5.4).

5.6 Appareil de filtration pour membranes filtrantes (MF) de 4,7 cm de diamètre, comprenant au moins trois unités de filtration pour la filtration simultanée, avec réservoirs en verre borosilicaté ou autre matière autoclavable non toxique, complété par une pompe électrique ou une trompe à eau pour le vide partiel.

5.7 Etuve à $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

5.8 Microscope stéréoscopique, grossissement 10-50X; et/ou un compteur de colonies sur fond noir.

5.9 Autoclave, maximum 2 atmosphères, soit électrique, soit à gaz.

5.10 Stérilisateur à vapeurs sèches à 160°C.

5.11 pHmètre, précision $\pm 0,1$ unité pH.

5.12 Pincés en acier inoxydable.

5.13 Balance de précision à ± 1 mg.

5.14 Réfrigérateur à $4 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

5.15 Agitateur électrique pour mélanger les liquides dans les tubes de culture.

5.16 Boîtes de Petri en verre borosilicaté, diamètre 5 cm, avec des boîtes de rangement en acier inoxydable pour la stérilisation ou bien des boîtes de Petri en plastique pré-stérilisées et à usage unique.

5.17 Flacons de type Ehrlenmeyer en verre borosilicaté pour la préparation des milieux, capacité 1 à 2 litres.

5.18 Tubes de culture de bactériologie en verre borosilicaté.

5.19 Pipettes (à écoulement total) en verre borosilicaté de 1, 9, 10 et 20 ml de volume, avec des boîtes de rangement en acier inoxydable pour la stérilisation.

REMARQUE: Des pipettes de 9 ml sont utiles mais non essentielles.

5.20 Bêchers gradués, en verre borosilicaté, de 100, 500 et 1000 ml de capacité, ayant un bec verseur.

5.21 Petits tubes en verre borosilicaté ("tubes de Durham") servant à être mis en position renversée dans certains tubes de culture.

5.22 Anses de bactériologie à boucle, de calibre 22-24, en chrome, chromonickel ou platine-irridium. Diamètre de la boucle: 3 mm.

5.23 Papier épais d'emballage.

5.24 Papier d'aluminium (qualité ménage).

5.25 Membranes filtrantes (MF), porosité de 0,45 u, diamètre de 4,7 cm, ou similaire, s'adaptant à la rampe de filtration (5.6).

REMARQUE: Les membranes filtrantes (MF) de 0,45 u de porosité doivent être garanties par le fabricant comme étant sans substances pouvant inhiber la croissance et le développement des bactéries. Les meilleures filtrations sont obtenues en utilisant des membranes à base d'esters mixtes de cellulose.

5.26 Appareil de filtration pour préparer des solutions stériles.

5.27 Papier filtre.

6. MILIEUX DE CULTURE ET PRODUITS CHIMIQUES

REMARQUE: La composition des milieux est basée sur des solutions de 1 litre ou avec des unités du même ordre. Avant la préparation il faut établir la liste des poids et des volumes des différents ingrédients nécessaires.

6.1 Gélose KF à Streptocoques

6.1.1 Composition de base

Protéose peptone no.3 ou polypeptone	10,0	g
Extrait de levure	10,0	g
NaCl	5,0	g
Glycerophosphate de sodium	10,0	g
Maltose	20,0	g
Lactose	1,0	g
Azide de sodium	0,4	g
Pourpre de bromocrésol	0,015	g
Agar	20,0	g
Eau distillée	1,0	litre

Préparation: Mélanger les ingrédients dans un bécher stérile puis chauffer jusqu'à ébullition pour dissoudre l'agar. Laisser refroidir à 50°C puis ajouter stérilement, immédiatement avant usage 10 ml d'une solution de TTC (6.1.2) à 1000 ml de la composition de base (6.1.1). Le pH devra être de 7,2 ±

0,1 après cuisson. Réajuster le pH, si nécessaire, avec une solution de 10 pour cent de carbonate de sodium. Dès solidification de la gélose dans les boîtes de Petri (4 à 5 ml de gélose par boîte), retourner les boîtes de Petri de manière que la buée ne se forme pas sous le couvercle, puis les stocker au réfrigérateur.

Cette gélose peut être conservée à 45 à 50°C pendant 4 heures avant sa répartition en boîtes de Petri. Les boîtes, avec la gélose coulée, peuvent être conservées jusqu'à 30 jours si elles sont placées à 2 - 4°C. Faire un test de stérilité en mettant en culture une boîte de Petri contenant uniquement de la gélose KF.

REMARQUE: Ne pas autoclaver ce milieu.

REMARQUE: La surface de la gélose ne doit pas être trop sèche, car dans ce cas, la membrane de filtration n'adhérerait pas à la surface de la gélose et empêcherait la diffusion des substances nutritives nécessaires à la croissance des colonies.

6.1.2 Solution de chlorure de 2,3,5-triphényl-tétrazolium (TTC)

Préparation: Préparer une solution de TTC à 1 pour cent en eau distillée (6.4), la stériliser par filtration (5.26) et la conserver à l'obscurité. Jeter la solution de TTC dès qu'elle tourne au rouge.

REMARQUE: La solution de TTC se décompose si elle est exposée à la lumière ou à une température de plus de + 50°C.

6.2 Tampon Phosphate (pH = 7,2)

K_2HPO_4	3,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
Eau distillée (6.6)	1,0 litre

6.2.1 Tampon Phosphate pour filtrations

Préparation: Dissoudre les composants et autoclaver (5.9) pendant 15 minutes à 121°C.

6.2.2 Tampon Phosphate pour dilutions

Préparation: Dissoudre les composants et verser 9 ml de la solution obtenue dans les tubes destinés aux dilutions en séries (8.4) puis les autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

6.3 Solution de thiosulfate

Préparation: Préparer une solution de thiosulfate de sodium à 10% avec de l'eau distillée (6.4), (pour stériliser la solution préparée, filtrez-la à travers une membrane filtrante stérile (8.2.4, 8.2.5)).

6.4 Eau distillée

N'utiliser que de l'eau distillée faite dans des appareils de distillation entièrement en verre ou entièrement en quartz. L'eau déminéralisée convient également si elle est produite par des appareils ne relargant pas de substances toxiques.

REMARQUE: L'eau distillée du commerce est souvent produite dans des appareils en cuivre et en zinc et est donc fortement toxique pour les bactéries. Avant d'utiliser une telle eau, sa toxicité devra être testée avec une souche de collection (6.7)

6.5 Détergent pour le lavage de verrerie et des instruments

Utiliser seulement des détergents recommandés par les fournisseurs de matériel bactériologique. Si un tel détergent n'est pas disponible, faire un essai avec un détergent de ménage en utilisant une souche de collection (6.7).

REMARQUE: Ne jamais utiliser des solutions à base d'acide sulfochromique pour le lavage de la verrerie.

6.6 Ethanol à 95%, de haut degré de pureté.

6.7 Souche streptocoques fécaux provenant d'une collection.

7. PRELEVEMENT

Pour l'élaboration d'une campagne de prélèvements, se reporter à la Méthode de Référence No. 1 (PNUE/OMS en préparation).

7.1 Prélèvement en surface

Attacher un flacon (bocal ou bouteille) de prélèvement (8.2.1) propre et stérilisé à la barre de prélèvement (5.2) (bras extenseur). Oter le bouchon sans toucher avec les mains le col du flacon. Immerger le flacon à l'avant du bateau ou du côté du vent lorsque le bateau avance lentement. Pousser le flacon à l'aide du bras extenseur à 25 cm sous la surface de l'eau, le flacon étant renversé verticalement de manière à éviter les contaminations dues à la surface de l'eau. Retourner alors le bocal de prélèvement et recueillir l'échantillon d'eau (figure 1). Pour prélever, on peut aussi immerger à la main le flacon.

Retirer le flacon et jeter un peu d'eau, si nécessaire, de manière à ce qu'il reste un peu d'air dans le flacon fermé. Ce volume d'air est nécessaire pour pouvoir homogénéiser l'eau prélevée lors de sa réception au laboratoire. Replacer le bouchon et conserver les flacons dans une mallette isothermique propre (5.4) contenant des sachets réfrigérants, à environ 4°C, en évitant une exposition à plus de 10°C. Les flacons de prélèvement seront séparés les uns

des autres par du papier d'emballage propre (5.23) de manière à éviter la casse. Noter la température à l'aide d'un thermomètre (5.5) toutes les trois heures. Noter les anomalies dans le rapport d'analyse. Etiqueter les flacons de prélèvement en indiquant la station de prélèvement, la durée de prélèvement et les autres paramètres relatifs à l'interprétation des résultats.

7.2 Prélèvement sous la surface de l'eau (prélèvement en profondeur)

Immerger la bouteille destinée aux prélèvements en profondeur (8.2.2) après l'avoir attachée à une cordelette propre en nylon, en évitant que le fond lesté de la bouteille ne touche le sédiment du fond (figure 2). Envoyer le message et après une minute retirer la bouteille et la placer dans la mallette isothermique réfrigérée (5.4). Par suite, procéder comme pour le prélèvement de surface (7.1).

REMARQUE: Il est connu que le taux de mortalité des coliformes à température ambiante et en présence de lumière est très élevé. Ainsi donc, tous les efforts doivent être faits pour ne pas récolter plus d'échantillons d'eau que l'on puisse filtrer et mettre en culture le jour même. Si cela n'est pas possible, les échantillons d'eau devront être stockés et analysés moins de 24 heures après le prélèvement.

8. MODE OPERATOIRE D'UNE ANALYSE

8.1 Lavage de la verrerie et des instruments

Toute la verrerie et tous les instruments (5) seront lavés avec des détergents non toxiques (6.5), d'abord rincés minutieusement à l'eau chaude du robinet, ensuite au moins trois fois rincés à l'eau distillée (6.4).

8.2 Stérilisation de la verrerie et des instruments

8.2.1 Flacons d'échantillon pour la surface (5.1). Sécher et stériliser des flacons de prélèvement propres (8.1) au stérilisateur à vapeurs sèches (5.10) pendant trois heures à 160°C. Avant la stérilisation, placer un morceau de papier filtre (5.26) dans le col de la bouteille de manière à ce que le bouchon ne se coince pas lors du refroidissement. Après refroidissement et lorsque le stérilisateur a atteint la température ambiante, ôter les morceaux de papier filtre avec une pince stérile (8.2.6) et replacer le bouchon sur le col du flacon de prélèvement. Placer les flacons dans les mallettes isothermes nettoyées (5.4). Séparer les flacons les uns des autres avec du papier filtre ou du papier d'emballage propre (5.23) de manière à éviter la casse.

REMARQUE: Si des résidus chlorés sont suspectés dans l'eau échantillonnée, ajouter, aseptiquement, 0,1 ml d'une solution de thiosulfate à 10 pour cent (6.5) par 100 ml d'eau échantillonnée dans les flacons de

prélèvement et ceci avant stérilisation. Cette quantité est suffisante pour neutraliser environ 15 mg de chlore résiduel par litre.

8.2.2 Prélèvement au-dessous de la surface (5.3). Nettoyer le flacon pour le prélèvement d'après (8.1). Rincer à l'eau du robinet puis à l'eau distillée (6.4). Envelopper chaque flacon dans du papier d'emballage épais (5.23) ou dans du papier d'aluminium (5.24) et stériliser à autoclave (5.9) 15 minutes à 121°C.

8.2.3 Boîtes de Petri (5.16) et pipettes (5.19). Laver les boîtes de Petri et les pipettes, introduire un morceau de coton au col et les placer dans une boîte en acier inoxydable puis stériliser au stérilisateur à vapeurs sèches (5.10) pendant trois heures à 160°C.

REMARQUE: Des boîtes de Petri pré-stérilisées et jetables sont plus pratiques à utiliser que des boîtes de Petri en verre ré-utilisables.

8.2.4 Réservoirs de filtration pour la rampe de filtration (5.6). Détacher (ou dévisser) le réservoir de la rampe de filtration et l'envelopper soit dans du papier d'emballage épais (5.23) soit dans du papier d'aluminium (5.24). Stériliser à l'autoclave (5.9) pendant 15 minutes à 121°C ou au four chaud (5.10) pendant 3 heures à 160°C.

8.2.5 Membranes filtrantes (MF) (5.25). Oter le papier d'emballage (s'il est présent) et placer 10 à 20 membranes propres dans des boîtes de Petri (en verre) (5.16). Autoclaver (5.9) 15 minutes à 121°C. A la fin de la stérilisation, laisser s'échapper rapidement un jet de vapeur de manière à réduire l'accumulation de buée sur les membranes de filtration.

REMARQUE: Des membranes filtrantes pré-stérilisées sont commercialisées.

8.2.6 Pinces (5.12). Stériliser les pinces en les trempant dans de l'alcool éthylique (éthanol) à 95 pour cent (6.8) puis les flamber de suite.

8.3 Choix du volume de prélèvement à filtrer et choix des séries de dilution

Les membranes filtrantes devraient présenter idéalement entre 20 et 80 colonies après leur incubation. Si des expériences antérieures pour déterminer le type de dilution en eau de mer non polluée ne sont pas disponibles, filtrer les volumes suivants pour l'eau de mer non diluée: 100 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml (figure 3). Pour les eaux polluées, les dilutions doivent être plus élevées.

8.4 Préparation des séries de dilution

Avant de prendre des quantités aliquotes à partir de l'eau de prélèvement ou à partir des dilutions, il faut agiter vigoureusement le flacon et les tubes pour une bonne représentativité de la prise d'essai.

Préparer les séries de dilution en prélevant 1 ml d'eau à analyser avec une pipette stérilisée (8.2.3) (figure 3, dilution: D-0) après avoir

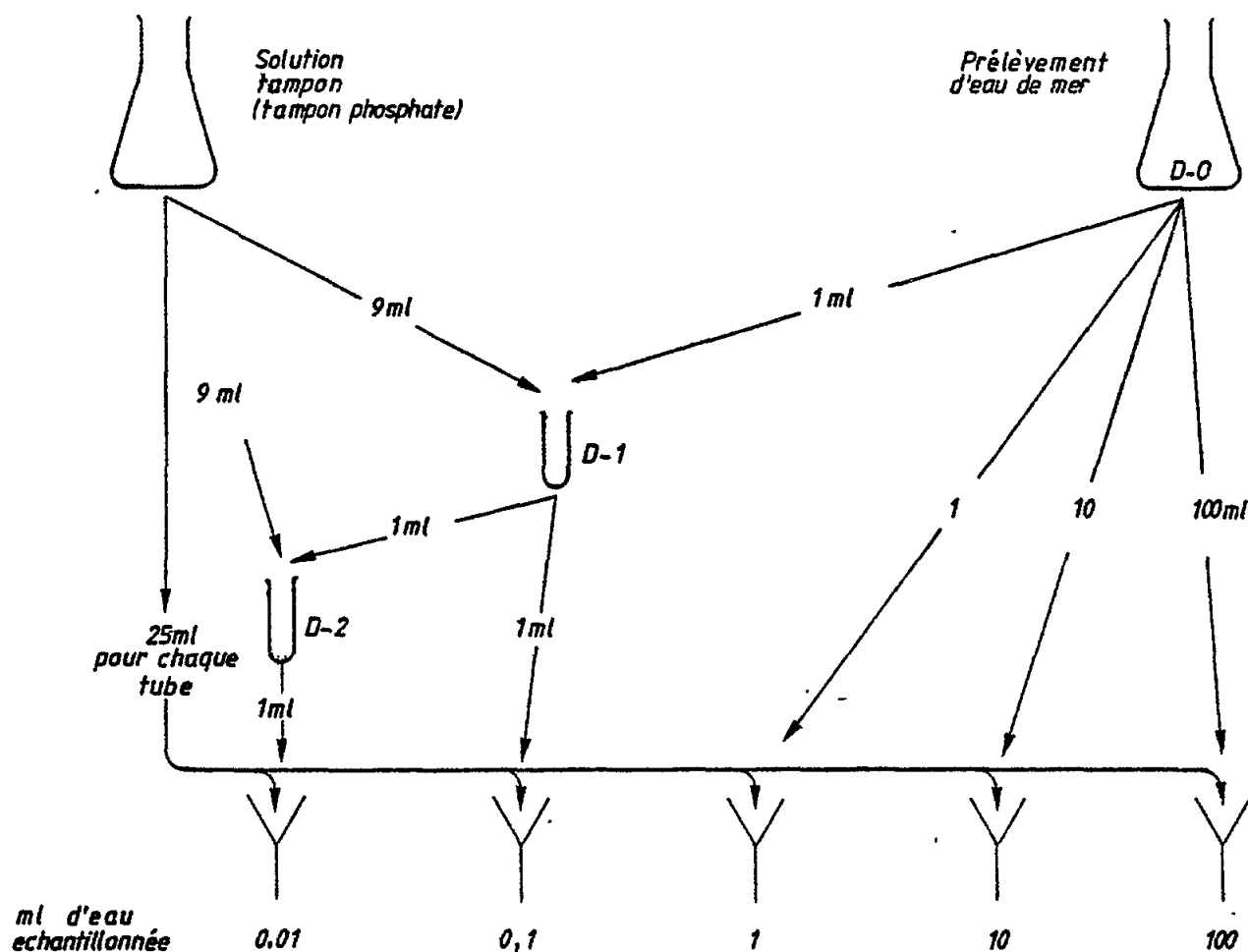


FIGURE 3 : SCHEMA DE LA PREPARATION D'UNE SERIE DE DILUTION ET SCHEMA DE FILTRATION

vigoureusement agité l'échantillon (7) et verser ce 1 ml dans un tube de culture propre et stérilisé (6.2.2) de manière à obtenir 10 ml correspondant à la première dilution (D-1). Agiter le tube à l'aide d'un agitateur électrique (5.15) ou en le tournant par rotation du poignet. Poursuivre la suite de la série de dilutions en prélevant 1 ml de la première dilution (D-1) et en plaçant ce ml dans 9 ml de tampon phosphate (6.2.2) et en agitant de manière à obtenir la deuxième dilution (D-2), etc.

8.5 Filtration

Commencer par filtrer la dilution la plus élevée (c'est-à-dire D-2), afin d'éviter des contaminations. Utiliser un réservoir de filtration stérilisé (8.2.4) pour chaque série de dilutions. Placer une membrane filtrante, stérilisée (8.2.5) avec une pince stérilisée à la flamme (8.2.6), sur le plateau poreux de la rampe de filtration (8.2.4). Déposer soigneusement le réservoir sur le réceptacle (le visser éventuellement). Verser dans le réservoir 20 ml environ de tampon phosphate stérile (6.2.1). A l'aide d'une pipette stérile (8.2.3), verser 1 ml de la dilution la plus élevée (ici D-2) dans la solution

tampon contenue dans le réservoir. Filtrer sous vide partiel par trompe à vide ou moteur électrique. Rincer le réservoir deux ou trois fois avec la solution tampon (6.2.1) puis filtrer de nouveau. Débloquer (ou dévisser) le réservoir, retirer immédiatement la membrane filtrante avec les pinces stérilisées à la flamme (8.2.6) et placer cette membrane sur la gélose coulée dans la boîte de Pétri (6.1), ceci avec un mouvement tournant de manière à éviter la formation de bulles d'air entre la membrane et la gélose. Avant de filtrer la dilution suivante (D-1) par une opération semblable, filtrer 20 ml de solution tampon (6.2.1) à travers l'unité de filtration.

8.6 Incubation

Les boîtes de Petri contenant les membranes sur la gélose (8.5) sont fermées et incubées (5.7) immédiatement pendant 48 ± 3 heures à $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Pour être sûr de la stérilisation, incuber également un témoin (sans membrane), c'est-à-dire une boîte de Petri ne contenant que la gélose KF (6.1).

8.7 Interprétation

Compter comme colonies de streptocoques fécaux, avec un microscope stéréoscopique ou un appareil similaire (5.8), les colonies qui sont roses à brun rouge foncé, ou à centre rouge ou éventuellement les rouges ayant une fine bordure blanchâtre. La taille de ces colonies peut varier de 0,5 à 3 mm. Noter le nombre de colonies de streptocoques dans la rapport final (alinéa 8 dans la tableau 1).

REMARQUE: Pour la mise en évidence de colonies réduisant le TTC, il est impératif que la membrane ne soit pas trop chargée en colonies. La réduction du TTC se manifeste par une coloration rouge (formation de triphényl formazane) et peut ne pas survenir si les colonies sont trop près les unes des autres. En plus de *Streptococcus faecalis* et des streptocoques apparentés, la définition des streptocoques fécaux inclue les *Streptococcus faecius*, *S. bovis* et *S. equinus* qui réduisent faiblement le TTC.

8.8 Estimation de la précision

Noter la précision de la technique à diverses époques (au minimum une fois par saison) en préparant trois séries indépendantes de dilutions (8.4) du même échantillon, c'est-à-dire en répétant les quatre étapes de dilutions successives décrites en 8.3 et 8.4 (figure 3). L'eau de mer utilisée devra être récoltée lors d'un programme de routine de surveillance dans une station côtière type de la région. Les séries de dilutions devront être choisies de manière qu'une étape de dilution puisse montrer sur trois membranes de filtration des comptages compris entre 20 et 200 colonies, ce qui est recommandé dans la section 9.1.

Filtrer chaque dilution selon la manière décrite en 8.5. Incuber selon 8.6. Noter le dénombrement des colonies selon le procédé décrit dans les sections 9.1 et 9.2 en tenant compte de la méthode d'interprétation de la section 8.7. Les résultats devront être enregistrés dans le rapport d'analyse (alinéa 9 dans le tableau 2).

Calculer la concentration totale de streptocoques fécaux de l'échantillon d'origine (prélèvement non dilué) pour chacune des membranes, selon la section 9.3 et noter le résultat dans le rapport d'analyse (alinéa 9 dans le tableau 2).

Pour chaque dilution dont chacune des trois membranes présente un dénombrement compris entre 20 et 200 colonies de streptocoques fécaux, calculer: la moyenne, la valeur maximale et la valeur minimale, la déviation standard et le coefficient de variation. Noter ces résultats dans le rapport d'analyse (alinéa 10 dans le tableau 2).

Si un prélèvement d'eau présente moins de 20 colonies par membrane de filtration dans une dilution, préparer une culture bactérienne test très diluée à partir d'une souche de collection et recommencer l'exercice de l'estimation de la précision.

REMARQUE: Le coefficient de variation (%) =
$$\frac{\text{déviati\on standard} \times 100}{\text{moyenne}}$$

9. EXPRESSION DES RESULTATS

9.1 Compter le nombre de colonies de streptocoques fécaux sur chaque membrane après complète incubation. Ne prendre en considération que les membranes présentant entre 20 et 200 colonies (total des colonies incluant streptocoques fécaux et non fécaux).

Indiquer les résultats obtenus pour chacun des filtres dans le rapport d'analyse (tableau 1, alinéa 8).

9.2 Exprimer les résultats en tant que streptocoques fécaux pour 100 ml d'eau récoltée en utilisant la relation suivante:

$$\text{Streptocoques fécaux pour 100 ml d'eau: } \frac{\text{Nombre de colonies de de streptocoques}}{\text{ml d'eau échantillonnée et filtrée}} \times 100$$

Indiquer dans le rapport d'analyse (tableau 1, alinéa 9) les résultats obtenus séparément pour chaque dilution. Reporter aussi les résultats obtenus sur membrane lorsqu'il y a moins de 20 colonies par membrane. S'il n'y en a aucune à colonies streptocoques sur les membranes filtrantes, donner comme réponse "< 1 streptocoque pour 100 ml".

9.3 Calculer le nombre de streptocoques fécaux pour 100 ml d'eau récoltée et le reporter en tant que résultat final (tableau 1, alinéa 10). S'il y a des membranes contenant entre 20 et 200 colonies caractéristiques dans deux dilutions successives, calculer la moyenne sur ces deux dilutions et notez-la sur le rapport final.

9.4 Relever dans le rapport d'analyse (tableau 1, alinéa 11) les anomalies observées lors des différentes phases de l'analyse (croissance confluyente de colonies, variations de température lors du stockage ou de l'incubation, etc.).

10. RAPPORT D'ANALYSE

Remplir le rapport d'analyse (tableaux 1 et 2) en donnant tous les détails propres à chaque colonne.

Tableau 1: Rapport d'analyse concernant les streptocoques fécaux dans le prélèvement d'eau de mer.

1. Zone de prélèvement

1.1 pays: _____ 1.2 zone: _____

2. Point de prélèvement (station)

2.1 numéro de code: _____ 2.2 longitude: _____

2.3 latitude: _____

3. Date du prélèvement

3.1 heure: _____ 3.2 jour: _____ 3.3 mois: _____

3.4 année: _____

4. Prélèvement et paramètres divers

4.1 profondeur du prélèvement: _____ 4.2 flacon no: _____

4.3 température au point de prélèvement : _____

4.4 salinité au point de prélèvement: _____

4.5 durée du stockage: _____

4.6 Se reporter à la rubrique 11 pour les autres facteurs pouvant influencer sur les résultats.

5. Date de la filtration

5.1 heure: _____ 5.2 jour: _____

6. Début de l'incubation

6.1 heure: _____ 6.2 jour: _____

7. Fin de l'incubation

7.1 heure: _____ 7.2 jour: _____

8. Nombre de colonies pour chaque filtre

dilution	ml de l'échantillon original filtré	colonies de streptocoques fécaux
D-0	100	_____
D-0	10	_____
D-0	1	_____
D-1	0.1	_____
D-2	0.01	_____
D-3	0.001	_____
D-4	0.0001	_____

9. Nombre de streptocoques fécaux/100 ml d'eau prélevée.

dilutions	n/100 ml
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

10. Résultat de l'analyse: _____ streptocoques fécaux/100 ml d'eau

11. Anomalies observées durant les travaux:

12. Adresse complète de l'Institut chargé des travaux:

13. Nom(s) et signature(s) de la (des) personne(s) qui a (ont) effectuée(s) les travaux:

Date: _____

Tableau 2: Rapport d'analyse sur la précision de l'estimation

1. Zone de récolte

1.1 pays: _____ 1.2 zone: _____

2. Point de prélèvement (station)

2.1 numéro de code: _____ 2.2 longitude: _____

2.3 latitude: _____

3. Date de prélèvement

3.1 heure: _____ 3.2 jour: _____ 3.3 mois: _____

3.4 année: _____

4. Prélèvement et autres paramètres

4.1 profondeur du prélèvement: _____ 4.2 flacon no: _____

4.3 température: _____ 4.4 salinité: _____

4.5 durée du stockage: _____

4.6 Se reporter à la rubrique 11 pour les autres facteurs pouvant influencer sur les résultats.

5. Date de filtration

5.1 heure: _____ 5.2 jour: _____

6. Début de l'incubation

6.1 heure: _____ 6.2 jour: _____

7. Fin de l'incubation

7.1 heure: _____ 7.2 jour: _____

8. Nombre de colonies pour chaque filtre

dilution	ml de l'échantillon original filtré	Nombre de streptocoques fécaux dans trois dilutions identiques		
		1ère membrane	2ème membrane	3ème membrane
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____	_____

9. Nombre de streptocoques fécaux dans 100 ml

dilutions	n/100 ml
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

10. Résultats de l'analyse (streptocoques fécaux/100 ml d'eau récoltée)

moyenne	dénombrement le plus petit au plus grand	déviatiion standard	coefficient de variation en %
_____	_____	_____	_____

11. Anomalies observées durant les travaux:

12. Adresse complète de l'Institut chargé des travaux:

13. Nom(s) et signature(s) de la (des) personne(s) qui a (ont) effectué les travaux:

Date: _____

LIST OF REFERENCE METHODS FOR MARINE POLLUTION STUDIES

LISTE DES METHODES DE REFERENCE POUR LES ETUDES DE POLLUTION MARINE

- UNEP/WHO : Guidelines for monitoring the quality of coastal recreational waters. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 1, UNEP 1982.
- UNEP/WHO : Determination of total coliforms in sea-water by the membrane filtration culture method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 2 Rev. 1, UNEP 1983.
- PNUE/OMS : Détermination des coliformes totaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Références pour les études de pollution marine No. 2 Rev. 1, PNUE 1983.
- UNEP/WHO : Determination of faecal coliforms in sea-water by the membrane filtration culture method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 3 Rev. 1, UNEP 1983.
- PNUE/OMS : Détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Références pour les études de pollution marine No. 3 Rev. 1, PNUE 1983.
- UNEP/WHO : Determination of faecal streptococci in sea-water by the membrane filtration culture method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 4 Rev. 1, UNEP 1983.
- PNUE/OMS : Détermination des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Références pour les études de pollution marine No. 4 Rev. 1, PNUE 1983.
- UNEP/WHO : Determination of faecal coliforms in bivalves by multiple test tube method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 5 Rev. 1, UNEP 1983.
- PNUE/OMS : Détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Références pour les études de pollution marine No. 5 Rev. 1, PNUE 1983.
- UNEP/FAO/IAEA : Guidelines for monitoring chemical contaminants in marine organisms. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 6, UNEP (in preparation)

- UNEP/FAO/IAEA : Sampling of selected marine organisms and sample preparation for trace metal analysis. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 7 Rev. 1, UNEP 1983.
- UNEP/FAO/IAEA : Determination of total mercury in selected marine organisms by flameless atomic absorption spectrophotometry. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 8 Rev. 1, UNEP 1983.
- UNEP/FAO/IAEA : Determination of total arsenic in selected marine organisms by flameless atomic absorption spectrophotometry. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 9, UNEP 1983.
- UNEP/FAO/IAEA : Determination of total selenium in selected marine organisms by flameless atomic absorption spectrophotometry. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 10, UNEP 1983.
- UNEP/FAO/IAEA : Determination of total cadmium, zinc, lead and copper in selected marine organisms by flameless atomic absorption spectrophotometry. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 11 Rev. 1, UNEP 1983.
- UNEP/FAO/IAEA : Sampling of selected marine organisms and sample preparation for the analysis of chlorinated hydrocarbons. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 12, UNEP 1982.
- UNEP/FAO/IAEA : Determination of methylmercury in selected marine organisms. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 13, UNEP 1982.
- UNEP/FAO/IAEA : Determination of DDTs and PCBs in selected marine organisms. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 14, UNEP 1982.
- UNEP/IOC/IAEA : Monitoring of tar on marine beaches. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 15, UNEP (in preparation)
- UNEP/IAEA : Determination of DDTs, PCBs, PCCs and other hydrocarbons in sea-water by gas chromatography. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 16, UNEP 1982.
- UNEP/IAEA : Determination of DDTs, PCBs and other hydrocarbons in marine sediments by gas liquid chromatography. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 17, UNEP 1982.
- UNEP/IOC : Determination of total dissolved cadmium in sea-water by differential pulse anodic stripping voltammetry. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 18, UNEP 1983.

- UNEP/IOC : Determination of total mercury in estuarine waters and suspended matter by cold vapour atomic absorption spectrophotometry. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 19, UNEP 1983.
- UNEP/IOC : Monitoring of petroleum hydrocarbons in sediments. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 20, UNEP (in preparation)
- UNEP/WHO : Determination of total coliforms in sea-water by multiple test tube method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 21, UNEP 1983.
- UNEP/WHO : Determination of faecal coliforms in sea-water by multiple test tube method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 22, UNEP 1983.
- UNEP/WHO : Determination of faecal streptococci in sea-water by multiple test tube method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 23, UNEP 1983.
- UNEP/IOC : Monitoring of petroleum hydrocarbons in sea-water. (in preparation)
- UNEP/IAEA : Guidelines for monitoring of estuarine waters and suspended matter. (in preparation)
- UNEP/WHO : Determination of faecal coliforms in estuarine waters, suspended matter and sediments. (in preparation)
- UNEP/WHO : Determination of phosphorus in suspended matter and sediments. (in preparation)
- UNEP/WHO : Determination of nitrogen in suspended matter and sediments. (in preparation)
- UNEP/WHO : Determination of BOD₅ and COD in estuarine waters. (in preparation)
- UNEP/UNESCO : Determination of total cadmium in estuarine waters and suspended matter. (in preparation)
- UNEP/IOC : Determination of basic oceanographic and meteorological conditions. (in preparation)
- UNEP/IOC : Determination of standard physical and chemical parameters. (in preparation)
- UNEP/WHO : Statistical methods for the evaluation of results from monitoring the quality of coastal recreational and shellfish-growing waters. (in preparation)

- UNEP/WMO : Sampling of aerosols and wet precipitation for analysis of chemical pollutants. (in preparation)
- UNEP/IAEA : Determination of selected trace metals in aerosols and in wet precipitation. (in preparation)
- UNEP/IAEA : Determination of halogenated hydrocarbons in aerosols and in wet precipitation. (in preparation)
- UNEP/WMO : Sampling of dry deposition. (in preparation)
- UNEP/IAEA : Determination of total mercury in marine sediments by flameless atomic absorption spectrophotometry. (in preparation)
- UNEP/IAEA : Determination of total cadmium in marine sediments by flameless absorption spectrophotometry. (in preparation)

Publié et imprimé par:



Centre d'activités du Programme pour les mers régionales
Programme des Nations Unies pour l'environnement

Des exemplaires de ce document ainsi que d'autres
publications du Centre d'activités du Programme pour les
mers régionales du PNUE peuvent être obtenus du:

Centre d'activités du Programme pour les mers régionales
Programme des Nations Unies pour l'environnement
Palais des Nations
GENEVE
Suisse