



MERS REGIONALES

PROGRAMME DES NATIONS UNIES POUR L'ENVIRONNEMENT

31 Octobre 1983

DETERMINATION DES COLIFORMES FECAUX DANS LES BIVALVES PAR LE TEST DES TUBES MULTIPLES

METHODES DE REFERENCE POUR LES ETUDES DE POLLUTION MARINE

No. 5 Rev. 1

Préparé en coopération avec



OMS

PNUE 1983

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 coliformes fécaux dans les bivalves par le test des tubes multiples. Méthodes de Référence pour les études de pollution marine No. 5 Rev. 1, PNUE 1983.



MERS REGIONALES

PROGRAMME DES NATIONS UNIES POUR L'ENVIRONNEMENT

31 Octobre 1983

DETERMINATION DES COLIFORMES FECAUX DANS LES BIVALVES PAR LE TEST DES TUBES MULTIPLES

METHODES DE REFERENCE POUR LES ETUDES DE POLLUTION MARINE

No. 5 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	1
4. Principes	1
5. Appareils et verrerie	2
6. Milieux de culture et produits chimiques	3
7. Prélèvement	6
8. Préparation de l'échantillon	6
9. Mode opératoire d'une analyse	7
10. Expression des résultats	11
11. Rapport d'analyse	13

1. PORTEE ET CHAMP D'APPLICATION

La méthode décrite convient pour la numération des coliformes fécaux dans les bivalves (coquillages) des mers tempérées et tropicales. Elle a été établie pour la surveillance sanitaire des fruits de mer et coquillages.

Les coliformes fécaux sont des indicateurs spécifiques présentant une corrélation positive hautement spécifique avec la contamination fécale. Des germes pathogènes d'origine fécale peuvent être présents dans le proche environnement marin des coquillages. Parmi les coquillages, les filtreurs concentrent les coliformes fécaux présents dans l'eau de mer et le taux de coliformes fécaux dans les coquillages comestibles donne une indication sur les risques potentiels des consommateurs.

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 balneaires. Rome 24-26 Novembre 1982. OMS Bureau Régional pour l'Europe. Copenhague.

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

3. DEFINITION

Les coliformes fécaux sont des bactéries Gram-négatives aérobies et anaérobies facultatives, en forme de bâtonnets ne sporulant pas et fermentant le lactose en produisant du gaz en moins de 24 heures lors de leur croissance à 36°C et à 44,5°C. Ils produisent de l'indole en eau tryptonée contenant du tryptophane à 44,5°C.

4. PRINCIPES

Les coquillages (moules, huîtres, etc.) sont lavés et brossés au laboratoire puis leurs parties molles sont prélevées stérilement et placées dans un flacon mixeur stérile à lames. Ces tissus sont dilués neuf fois avec du

tampon phosphate (ou avec de l'eau peptonée à 1 pour cent). De cette manière on obtient une solution qui contient 1 g (de poids frais) de chair de moule pour 10 ml d'homogénat.

On prépare, à partir de cet homogénat, une première série de dilutions en tubes multiples contenant du bouillon lactosé. Ces tubes sont mis en culture à $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (test présomptif).

Après 24 heures, on prélève pour chaque tube positif une goutte que l'on transfère dans une deuxième série de dilutions en tubes multiples contenant du bouillon MacConkey (ou du bouillon au Vert Brillant). Cette deuxième série de tubes est alors mise en culture à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (premier test confirmatif).

Parallèlement, on inocule par une goutte (provenant des tubes positifs du test présomptif) une troisième série de tubes multiples contenant de l'eau tryptonée. Cette série de tubes est mise en culture à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ et constitue le second test confirmatif.

Le nombre et l'emplacement des tubes positifs déterminent le nombre le plus probable (NPP) de coliformes fécaux dans l'échantillon homogénéisé.

5. APPAREILS ET VERRERIE

5.1 Mallettes isothermiques (type camping) avec sachets réfrigérants ou équipement similaire pour transporter et garder vivants les coquillages.

5.2 Etuves humides à $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ et à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

5.3 Autoclave, électrique ou à gaz, maximum 2 atmosphères.

5.4 Stérilisateur à vapeur sèche à 160°C pour la verrerie et les instruments.

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

5.6 Pinces en acier inoxydable.

5.7 Balance pour la préparation des milieux, précision ± 10 mg.

5.8 Réfrigérateur, $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

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

5.10 Flacons de type Erlenmeyer en verre borosilicaté pour la préparation des milieux, volume 1 et 2 litres.

5.11 Tubes de culture de bactériologie en verre borosilicaté avec portoirs autoclavables.

5.12 Petits tubes en verre borosilicaté (tubes de Durham).

5.13 Pipettes de 1, 5, 9 et 10 ml, en verre borosilicaté et à écoulement total pour le transfert des milieux de culture dans les tubes. Boîtes métalliques en acier inoxydable pour leur stérilisation.

REMARQUE: Des pipettes de 9 ml sont utiles mais pas nécessaires.

5.14 Bêchers gradués en verre borosilicaté de capacité 100, 500 et 1000 ml avec un bouchon ayant une membrane.

5.15 Homogénéisateur en acier inoxydable ou mixeurs à lames stérilisables (5.4) ou autoclavables (5.3).

5.16 Brosse pour le nettoyage des coquilles des mollusques.

5.17 Scalpels de chirurgien ou couteaux similaires pour ouvrir les coquillages.

6. MILIEUX DE CULTURE ET PRODUITS CHIMIQUES

REMARQUE: La composition de ces milieux est basée sur des solutions de 1 litre ou d'unité de même ordre. Avant de préparer les milieux, il faut établir la nature et la quantité des divers ingrédients entrant dans chaque préparation.

6.1 Bouillon lactosé

	concentration normale	concentration double
Extrait de boeuf	3,0 g	6,0 g
Peptone	5,0 g	10,0 g
Lactose	5,0 g	10,0 g
Eau distillée (6.7)	1,0 litre	1,0 litre

Préparation: Dissoudre les ingrédients dans l'eau distillée (6.7). Le pH devra être de l'ordre de 6,8 à 7,0 et de préférence 6,9 après la stérilisation (5.7).

Placer dans un portoir autoclavable 3 rangées de 5 tubes de culture propres (5.11, 9.1) si l'on présume une pollution forte, on placera plus de 3 rangées. Dans chaque tube de culture, placer un tube de Durham en position inversée (5.12) puis répartir dans chaque tube le bouillon lactosé de manière à recouvrir partiellement le tube de Durham. Ces tubes de Durham vont piéger une grosse bulle d'air qui disparaîtra lors de l'autoclavage. Dans la première rangée de tubes de culture, il faut verser du bouillon lactosé doublement concentré (6.1). Dans la deuxième et la troisième rangée (et les suivantes si

nécessaire), on utilise du bouillon lactosé à concentration normale. Obturer tous les tubes avec des bouchons de coton. Autoclaver (5.3) à 121°C pendant 15 minutes les tubes. Vérifier si le pH se situe entre 6,8 et 7,0. Dans la négative, réajuster le pH du bouillon et préparer une nouvelle série de tubes.

REMARQUE: Le bouillon lactosé doublement concentré n'est nécessaire que dans la première rangée de tubes où l'on versera 10 ml de la solution à tester (homogénat). Si l'on teste un volume d'homogénat plus élevé que 10 ml, il faudra préparer un bouillon lactosé encore plus concentré et cela de manière à éviter une trop grande dilution du bouillon lactosé.

6.2 Bouillon de MacConkey

6.2.1 Composition du milieu

Taurocholate de sodium	5,0 g
Lactose	10,0 g
NaCl	5,0 g
Peptone	20,0 g
Eau distillée (6.7)	1,0 litre

Préparation: Dissoudre les ingrédients en remuant. Ajuster le pH à 7,1 ± 0,1 avec de l'HCl ou du NaOH dilués. Ajouter 2 ml de la solution de pourpre de bromocrésol (6.2.2) au bouillon de MacConkey.

Placer dans un portoir autoclavable 3 rangées (ou plus si l'on présume une forte pollution) de 5 tubes de culture propres (5.11, 9.1). Dans chaque tube de culture, introduire un petit tube (5.12) en position renversée, puis répartir dans chaque tube de culture le bouillon de MacConkey, obturer les tubes de culture avec un bouchon de coton et autoclaver (5.3) à 121°C pendant 15 minutes. Vérifier si le pH est entre 7,0 et 7,4. Dans la négative, réajuster le pH du bouillon restant et préparer une nouvelle série de tubes.

6.2.2 Solution de pourpre de bromocrésol

Préparation: Dissoudre 1 g de pourpre de bromocrésol dans 99 ml d'une solution d'éthanol à 95% (6.9).

6.3 Bouillon au Vert Brillant Bilié

Oxgall en poudre	20,0 g
Lactose	10,0 g
Peptone	10,0 g
Vert Brillant	13,3 mg
Eau distillée (6.7)	1,0 litre

Préparation: Dissoudre dans 1 litre d'eau distillée les ingrédients en remuant. Dans chaque tube de culture propre (5.11, 9.1) introduire un petit tube de Durham (5.12) en position renversée et verser dans chaque tube de culture une quantité suffisante de bouillon au Vert Brillant de manière à

recouvrir partiellement les tubes de Durham. Le tube de Durham piègera une grosse bulle d'air qui disparaîtra lors de la stérilisation. Obturer les tubes de culture avec un bouchon de coton. Stériliser en autoclavant à 121°C (5.9), de préférence 12 minutes et pas plus de 15 minutes. Le pH final devra être de $7,2 \pm 0,2$. Avant utilisation de ce bouillon, faire un essai en utilisant une souche bactérienne de collection (6.10).

6.4 Eau tryptonée

Tryptone	10,0 g
NaCl	5,0 g
Eau distillée (6.7)	1,0 litre

Préparation: Dissoudre les ingrédients dans de l'eau distillée (6.7).

Répartir dans chacun des 5 tubes des trois rangées (ou plus de rangées si l'on présume un taux élevé de coliformes fécaux) 10 ml d'eau tryptonée. Autoclaver (5.3) à 121°C pendant 15 minutes. Le pH final devra être entre 7,2 et 7,4. Si nécessaire, réajuster le pH avant la stérilisation.

6.5 Solutions pour les dilutions

6.5.1 Tampon phosphate (pH 7,2) pour les dilutions

K_2HPO_4	3,0 g
KH_2PO_4	1,0 g
Eau distillée (6.7)	1,0 litre

Préparation: Dissoudre les ingrédients et répartir par 9 ml dans chaque tube utilisé pour les dilutions en séries (9.3) puis autoclaver à 121°C pendant 15 minutes.

6.5.2 Eau peptonée pour les dilutions

Préparation: Dissoudre une quantité suffisante de peptone dans de l'eau distillée de manière à obtenir une solution de peptone à 0,1 pour cent. Répartir 9 ml de cette solution pour chaque tube utilisé pour les dilutions en séries (9.3) et autoclaver (5.3) 15 minutes à 131°C.

6.6 Réactif de Kovac pour la recherche de l'Indole

Paradiméthyl-amino-benzaldéhyde	5,0 g
Amyl alcool	75,0 ml
HCl concentré	25,0 ml

Préparation: Dissoudre le benzaldéhyde dans l'amy l alcool et dans l'acide chlorhydrique. Le réactif deviendra jaune.

6.7 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 coliformes. Avant d'utiliser une telle eau, sa toxicité devra être testée avec une souche de E. coli de collection (6.10).

6.8 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 E. coli comme bio-test (6.10).

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

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

6.10 Souche de collection de E. coli.

7. PRELEVEMENT

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

8. PREPARATION DE L'ECHANTILLON (homogénat de bivalve)

Peser le réservoir de l'homogénéisateur (ou mixeur à lame) (9.2.1). Choisir 10 bivalves au hasard, pour chaque station (7), parmi les exemplaires récoltés. Exemple: Une moule de 4 cm contient environ 0,5 g (poids frais) de chair. Dix moules de cette taille représenteront environ 5 g de chair en poids frais. Avant d'ouvrir les deux valves de la moule, la brosser soigneusement avec une brosse propre (5.16) et de l'alcool (6.9). Puis passer rapidement à la flamme la moule en la tenant avec une pince stérile (9.2.3) de manière à sécher la coquille.

Ouvrir la moule avec un couteau ou un scalpel stérilisé (5.17, 9.2.3). Pour ce faire, introduire la lame dans l'ouverture par où sort le byssus et couper le muscle adducteur postérieur comme indiqué dans la figure 1. Puis retourner la lame, couper en direction opposée le muscle antérieur et ouvrir la moule avec des pinces stériles (9.2.3).

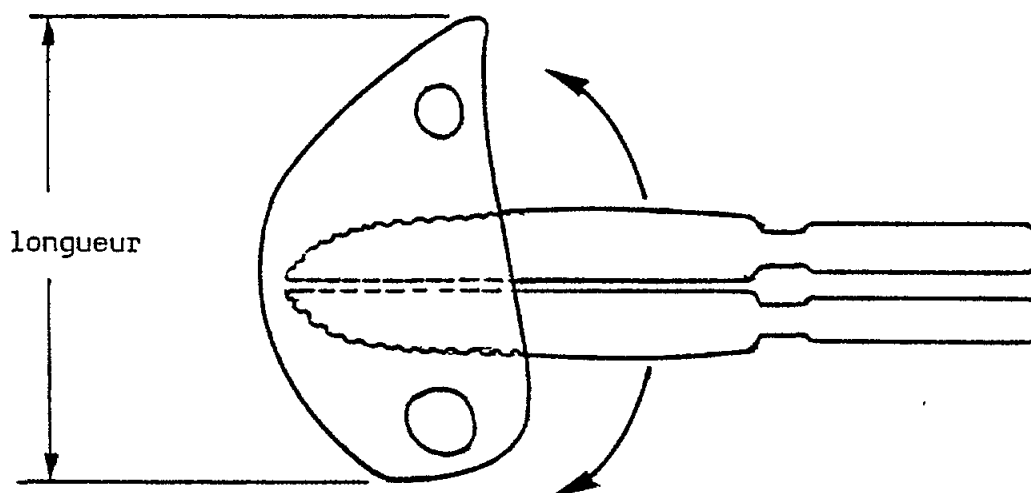


FIGURE 1 : OUVERTURE D'UNE MOULE PAR SECTION DES MUSCLES ADDUCTEURS

Ne pas essayer de casser la moule avec un couteau pour l'ouvrir. Si les deux muscles sont coupés, elle s'ouvrira facilement.

Recueillir le liquide des valves et le jeter de manière à ce qu'il ne soit pas analysé. Déposer la chair (parties molles) dans le réservoir de l'homogénéisateur (9.2.1) à l'aide de pinces stériles (9.2.3). Après avoir transféré la chair des 10 spécimens dans le réservoir, peser ce dernier et déterminer le poids frais des tissus par soustraction. Noter le poids de chair fraîche des 10 moules dans tableau 1, alinéa 5. Puis, (de manière à obtenir une

concentration finale de 1 g/10 ml) diluer les tissus avec 9 fois leur poids d'eau en utilisant du tampon phosphate (6.5.1) ou de l'eau peptonée (6.5.2). (Dans notre exemple, l'échantillon contenu dans le réservoir sera composé de 5 g de chair (poids frais) plus 45 ml de tampon ou d'eau peptonée. Le résultat sera 50 ml d'une solution homogénéisée de tissus.

Homogénéiser les tissus pendant 2 minutes. L'homogénat contient maintenant 1 g (poids frais) d'échantillon dans 10 ml ou 0,1 g (PF)/ml.

Cet homogénat représente l'échantillon à tester ou encore la dilution D-1.

9. MODE OPERATOIRE D'UNE ANALYSE

9.1 Lavage de la verrerie et des instruments

Toute la verrerie et tous les instruments (5) seront lavés avec des détergents non toxiques (6.8), d'abord rincés minutieusement à l'eau chaude du robinet, ensuite au moins trois fois rincés à l'eau distillée (6.7).

9.2 Stérilisation de la verrerie et des instruments

9.2.1 Stériliser le réservoir de l'homogénéisateur (5.15) par chauffage à 160°C pendant 3 heures au stérilisateur à vapeurs sèches (5.4) ou par autoclavage (5.3) pendant 15 minutes à 121°C.

9.2.2 Placer les pipetter propres (5.13) avec leur coton au col, dans des boîtes en acier inoxydable et les stériliser, vapeurs sèches (5.4) pendant 3 heures à 160°C.

9.2.3 Stériliser les pinces (5.6) et les couteaux ou scalpels (5.17) en les trempant dans de l'éthanol à 95 pour cent puis en les flambant.

9.3 Culture en bouillon lactosé à 36 ± 1°C pendant 48 heures (test présomptif)

L'échantillon original (homogénat ou dilution D-1) doit être vigoureusement agité avant la prise des aliquots pour les dilutions, ceci pour garantir une bonne représentativité des aliquots.

Utiliser des pipettes stériles (9.2.2) pour transférer 10 ml de l'échantillon homogénéisé (8) dans 5 tubes de culture contenant du bouillon stérilisé à double concentration de lactose (6.1). Cette rangée de tubes contient maintenant 1 g de tissus frais par tube (figure 1).

Puis transférer stérilement à la pipette (9.2.2) 1 ml de l'homogénat (D-1) (8) dans cinq tubes de culture contenant du bouillon lactosé stérilisé à la concentration normale (6.1). Cette rangée de tubes contiendra maintenant 0,1 g (PF)/tube.

Pour la préparation des dilutions ultérieures, transférer à l'aide d'une pipette stérile (9.2.2) 1 ml de la dilution D-1 dans un tube contenant 9 ml de tampon phosphate (6.5.1) ou d'eau peptonée (6.5.2). Mélanger vigoureusement à la main ou à l'agitateur électrique (5.13). On obtient ainsi la dilution D-2. Transférer stérilement (9.2.2) 1 ml de la dilution D-2 dans chacun des cinq tubes de cultures contenant du bouillon lactosé à concentration normale (6.1). Cette rangée de tubes contient maintenant 0,01 g (poids frais) de chair par tube. C'est la dilution D-3, etc.

Si nécessaire, pour des dilutions plus fortes, transférer 1 ml de la dilution D-2 dans un tube contenant 9 ml de tampon phosphate (6.5.1) ou d'eau peptonée (6.5.2) de manière à obtenir la dilution D-3.

Mettre en culture ces séries de tubes soit dans une étuve sèche, soit dans une étuve humide (5.2) pendant 48 heures à 36 ± 1°C.

Après 24 heures, rechercher la formation de gaz. La production de gaz se manifeste par l'apparition d'un trouble dans le bouillon. L'observation de la formation de gaz dans les tubes de Durham peut être facilitée en tapotant la paroi des tubes de cultures. Une bulle d'air ne doit pas être confondue avec la production de gaz. Si le gaz résulte d'une fermentation, le bouillon doit être floconneux. Une fermentation active de gaz peut être mise en évidence par la formation de petites bulles de gaz sur la paroi du tube lorsqu'on le secoue.

Noter le nombre de tubes produisant du gaz (formation de gaz après 24 heures de culture) dans la tableau 2, alinéa 7, colonne la.

Après 48 heures, rechercher de nouveau la formation de gaz dans les tubes et noter les résultats dans le tableau 2, alinéa 7, colonne lb.

9.4 Culture en bouillon de MacConkey ou en bouillon au Vert Brillant pendant 48 heures à 44°C (Premier test confirmatif)

Après 24 heures de culture en bouillon lactosé à 36°C (9.3), un deuxième test de séries de tubes (6.2.1) est préparé par transfert à la pipette stérile (9.2.2) d'une goutte prise dans chaque tube lactosé positif que l'on inocule à chaque tube de position similaire dans le portoir de bouillon MacConkey (6.2) ou dans le portoir de bouillon au Vert Brillant (6.3).

Mettre cette deuxième série de tubes en culture dans une étuve humide (5.2) pendant 24 heures à $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Après 24 heures, noter le nombre de tubes montrant une réaction positive dans le tableau 2, alinéa 7, colonne 2a. Les coliformes dégageront du gaz qui sera piégé dans le tube de Durham (bouillon au Vert Brillant) et l'acide produit changera la couleur originelle brun violet du bouillon MacConkey en jaune.

Après 48 heures de culture à 36°C en bouillon lactosé (9.3), on prélève une goutte dans les tubes négatifs à 36 heures puis positifs à 48 heures. Le transfert se fait dans les tubes en position similaire du portoir de bouillon de MacConkey (6.2) ou de bouillon de Vert Brillant (6.3).

Après 24 heures, on note le nombre de tubes montrant une réaction positive (production d'acide et production de gaz) dans le tableau 2, alinéa 7, colonne 2b.

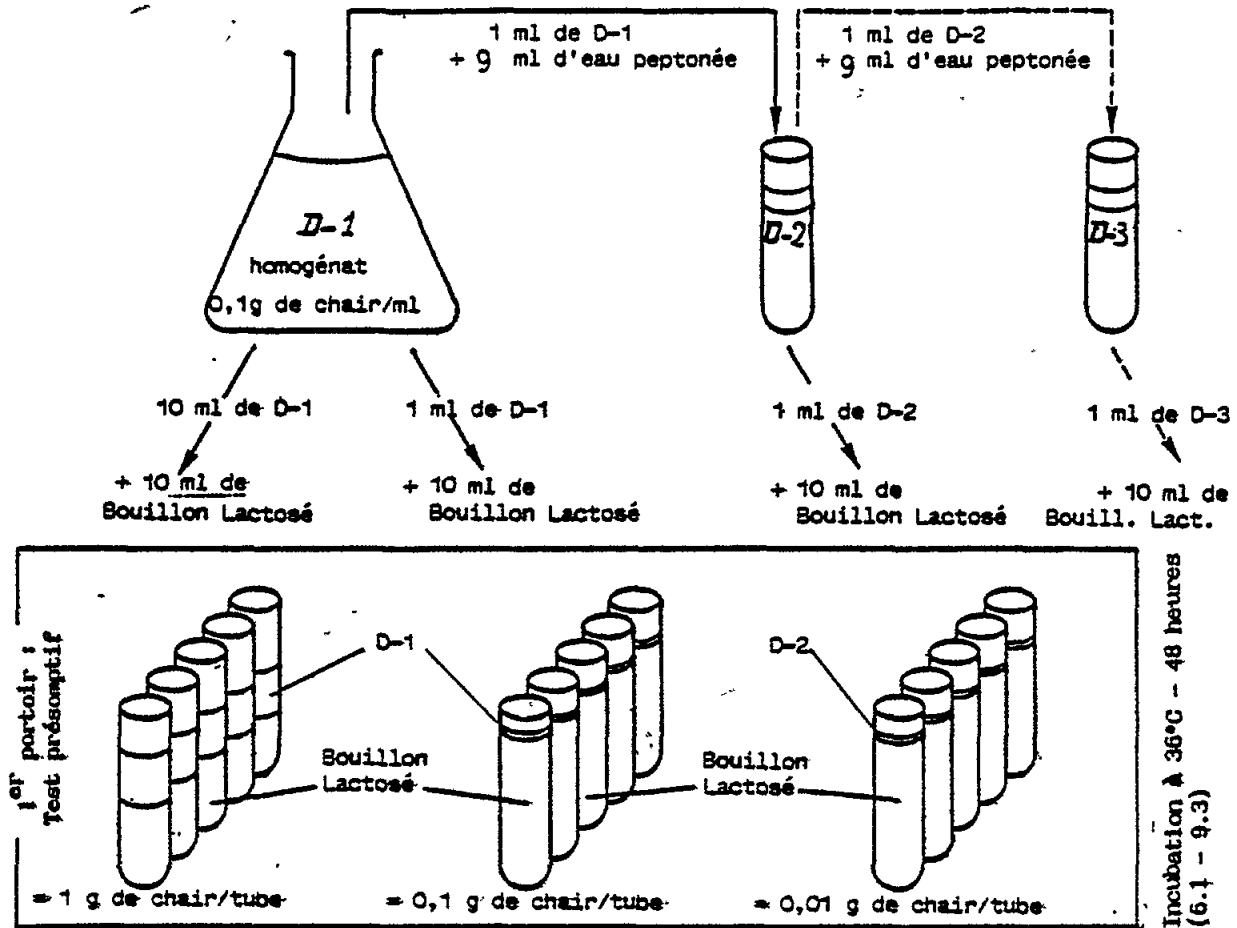
9.5 Culture en eau tryptonée pendant 24 heures à 44,5°C (Deuxième test confirmatif)

Au même moment que le premier test confirmatif (9.4) est préparé, transférer stérilement (9.2.2) à partir des tubes donnant une réaction positive après 24 heures de culture à 36°C en bouillon lactosé (9.4), une goutte dans la troisième série de tubes contenant de l'eau tryptonée (6.4). Les tubes prélevés et les tubesensemencés sont situés en position identique dans les portoirs.

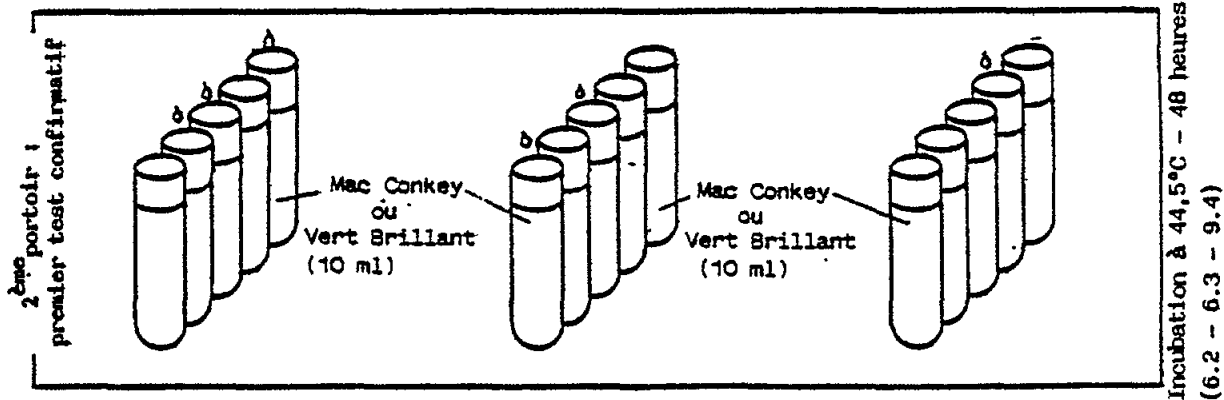
Mettre en culture cette troisième série dans une étuve humide (5.2) à $44,5 \pm 0,2^\circ\text{C}$ pendant 24 heures.

Après 24 heures, ajouter environ 1 ml du réactif de Kovac (6.6) dans chaque tube et les agiter. Dans les 10 minutes, une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rouge de l'amyl alcool à la surface du tube. Noter les résultats dans le tableau 2, alinéa 7, colonne 2c.

Effectuer la même opération (9.5) à partir des tubes du premier test (test présomptif, 9.3) pour les tubes qui sont devenus positifs entre 24 et 48 heures. Noter les résultats dans le tableau 2, alinéa 7, colonne 2d.



Après 24^h - 48^h transférer 1 goutte de chaque tube positif du 1^{er} portoir dans chaque tube en position identique dans le 2^{ème} portoir (9.4), soit :



Après 24^h - 48^h transférer 1 goutte de chaque tube positif du 1^{er} portoir dans chaque tube identique du 3^{ème} portoir (9.5), soit :

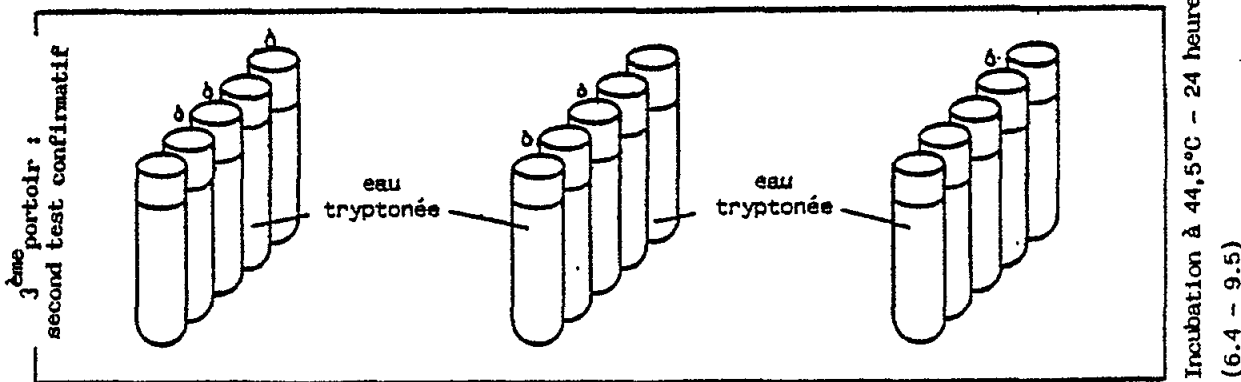


FIGURE 2 : SCHEMA DE LA PREPARATION DES SERIES DE DILUTIONS

10. EXPRESSION DES RESULTATS

10.1 Calcul du nombre de coliformes fécaux par gramme de chair fraîche de bivalves

Si les dilutions de 1 g, 0,1 g et 0,01 g de chair par tube ont été utilisées, il faut choisir le nombre le plus grand lors de la lecture des positifs sur MacConkey ou sur Vert Brillant à 44,5°C (9.4) et sur l'eau tryptonée (9.5), c'est-à-dire la lecture la plus élevée à partir d'une des colonnes 2a, 2b, 2c ou 2d dans le tableau 2, alinéa 7 et à partir de là, trouver dans le tableau 1 le Nombre le Plus Probable existant (NPP).

Lorsque plus de trois dilutions sont employées, les résultats du NPP ne sont donnés que pour trois dilutions (successives). Choisir une dilution de telle manière qu'une rangée de tubes donne des résultats positifs pour tous les cinq tubes (les dilutions les plus basses, exemple D-1, ne doivent pas montrer de tube négatif). Ensuite, prendre les deux dilutions suivantes supérieures à partir de 2a, 2b, 2c ou 2d dans le tableau 2, alinéa 7. Déterminer combien de fois la dilution la plus élevée est plus petite que 1 g. Trouver le NPP correspondant au nombre de tubes positifs dans les trois dilutions et multiplier le NPP trouvé par le facteur de dilution. Noter ce résultat dans le rapport final (tableau 2, alinéa 8).

dilutions choisies
pour la recherche
du NPP:

Exemple: dilution 1 g: 5 tubes positifs
dilution 0,1 g: 5 tubes positifs (X)
dilution 0,01 g: 3 tubes positifs (X)
dilution 0,001 g: 2 tubes positifs (X)
dilution 0,0001 g: 1 tube positif

facteur de dilution : $10/1 = 10$
lecture des positifs 5,3,2 soit 532
détermination du NPP 532 → 14
nombre de coliformes fécaux par gramme de chair fraîche:
 $14 \times \text{facteur de dilution} = 14 \times 10 = 140 \text{ CF/g}$
Intervalle de confiance à 95%:
limite inférieure = $3,7 \times 10 = 37$
limite supérieure = $34 \times 10 = 340$

10.2 Précision des résultats

Déterminer les limites de l'intervalle de confiance à 95% et les noter dans le rapport final (tableau 2, alinéa 8).

Tableau 1: Index du NPP et des limites de l'intervalle de confiance à 95% pour diverses combinaisons de résultats positifs et négatifs quand on utilise 10 ml, 1 ml et 0,1 ml d'homogénat (broyat de chair de moules dilué 10 fois)

Nombre de tubes positifs			Limites de l'intervalle de confiance à 95%			Nombre de tubes positifs			Limites de l'intervalle de confiance à 95%			
Index NPP pour			Index NPP pour			Index NPP pour			Index NPP pour			
-pour 5 tubes contenant-	0.01 g	0.01 g	1 g	inférieur/supérieur	1 g	inférieur/supérieur	-pour 5 tubes contenant-	0.1 g	0.01 g	1 g	inférieur/supérieur	
0	0	0	<0.2		4		4	2	1	2.6	0.9	7.8
0	0	1	0.2	<0.05	4	0.7	4	3	0	2.7	0.9	8
0	1	0	0.2	<0.05	4	0.7	4	3	1	3.3	1.1	9.3
0	2	0	0.4	<0.05	4	1.1	4	4	0	3.4	1.2	9.3
1	0	0	0.2	<0.05	5	0.7	5	0	0	2.3	0.7	7
1	0	1	0.4	<0.05	5	1.1	5	0	1	3.1	1.1	8.9
1	1	0	0.4	<0.05	5	1.1	5	0	2	4.3	1.5	11
1	1	1	0.6	<0.05	5	1.5	5	1	0	3.3	1.1	9.3
1	2	0	0.6	<0.05	5	1.5	5	1	1	4.6	1.6	12
2	0	0	0.5	<0.05	5	1.3	5	1	2	6.3	2.1	15
2	0	1	0.7	0.1	5	1.7	5	2	0	4.9	1.7	13
2	1	0	0.7	0.1	5	1.7	5	2	1	7	2.3	17
2	1	1	0.9	0.2	5	2.1	5	2	2	9.4	2.8	22
2	2	0	0.9	0.2	5	2.1	5	3	0	7.9	2.5	19
2	3	0	1.2	0.3	5	2.8	5	3	1	11	3.1	25
3	0	0	0.8	0.1	5	1.9	5	3	2	14	3.7	34
3	0	1	1.1	0.2	5	2.5	5	3	3	18	4.4	50
3	1	0	1.1	0.2	5	2.5	5	4	0	13	3.5	30
3	1	1	1.4	0.4	5	3.4	5	4	1	17	4.3	49
3	2	0	1.4	0.4	5	3.4	5	4	2	22	5.7	70
3	2	1	1.7	0.5	5	4.6	5	4	3	28	9	85
3	3	0	1.7	0.5	5	4.6	5	4	4	35	12	100
4	0	0	1.3	0.3	5	3.1	5	5	0	24	6.8	75
4	0	1	1.7	0.5	5	4.6	5	5	1	35	12	100
4	1	0	1.7	0.5	5	4.6	5	5	2	54	18	140
4	1	1	2.1	0.7	5	6.3	5	5	3	92	30	320
4	1	2	2.6	0.9	5	7.8	5	5	4	160	64	580
4	2	0	2.2	0.7	5	6.7	5	5	5	240		

11. RAPPORT D'ANALYSE

Remplir le rapport final (tableau 2) en donnant tous les détails propres à chaque alinéa.

Tableau 2: Rapport final sur les coliformes fécaux dans les bivalves

1. Zone de prélèvement

1.1 pays: _____ 1.2 zone: _____

2. Point de prélèvement (station)

2.1 nature du point de prélèvement (ex. marché de poissons): _____

2.2 description de la localisation du point de prélèvement: _____

2.3 numéro de code: _____ 2.4 longitude: _____

2.5 latitude: _____

3. Date de prélèvement

3.1 heure: _____ 3.2 jour: _____ 3.3 mois: _____ 3.4 année: _____

4. Récolte et conditions de prélèvements

4.1 profondeur de la récolte: _____

4.2 condition de stockage (i.e + 2°C): _____

4.3 durée de stockage: _____ heures

4.4 température à la profondeur du prélèvement: _____ °C

4.5 salinité à la profondeur du prélèvement: _____ ‰

5. Echantillon

5.1 nombre de moules par échantillonnage: _____

5.2 poids des parties molles: _____ g (PF)

6. Cultures

6.1 Lactose à 36°C

Date et heure du début: _____

Date et heure de la fin: _____

6.2 MacConkey à 44,5°C

Date et heure du début: _____

Date et heure de la fin: _____

6.3 Vert Brillant à 44,5°C

Date et heure du début: _____

Date et heure de la fin: _____

6.4 Eau tryptonée à 44,5°C

Date et heure du début: _____

Date et heure de la fin: _____

7. NPP en dilution normale

Aliquots transférés gr	nombre de réactions positives					
	lactose		MacConkey ou Vert Brillant		tryptone	
	24 h (1a)	48 h (1b)	24 h (2a)	48 h (2b)	24 h (2c)	48 h (2d)
1						
0.1						
0.01						
0.001						
0.0001						

8. Résultat des analyses:

NPP après 48 heures en MacConkey, Vert Brillant ou eau tryptonée
à 44,5°C:

_____ coliformes fécaux/g de chair fraîche de bivalves

_____ intervalle de confiance à 95%

9. Anomalies observées durant les analyses:

10. Adresse complète de l'institut chargé des travaux:

11. Nom(s) et signature(s) de la (les) 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 PNUÉ peuvent être obtenus du:

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