

Programme à long terme de surveillance et de recherche
sur la pollution dans la Méditerranée
(MED POL Phase II)

LES METHODES MICROBIOLOGIQUES DE SURVEILLANCE
DE LA QUALITE DES EAUX COTIERES



Troisième rapport publié sous le patronage conjoint
du Programme des Nations Unies pour l'environnement
et de l'Organisation mondiale de la santé



ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
Bureau régional de l'Europe
Copenhague, 1985



Programme à long terme de surveillance et de recherche
sur la pollution dans la Méditerranée
(MED POL Phase II)

LES METHODES MICROBIOLOGIQUES DE SURVEILLANCE
DE LA QUALITE DES EAUX COTIERES

Troisième rapport sur une réunion mixte OMS/PNUE

Tunis
12-16 novembre 1984

SOMMAIRE

| | <u>Page</u> |
|---|-------------|
| Préface | 1 |
| 1. Ouverture de la réunion | 2 |
| 2. Portée et objectifs de la réunion | 3 |
| 3. Election du bureau | 3 |
| 4. Adoption de l'ordre du jour | 3 |
| 5. Organisation du programme des travaux | 3 |
| 6. Discussion générale sur les paramètres bactériologiques utilisés pour la surveillance de la qualité sanitaire des eaux de mer et sur les méthodes applicables à leur détermination et à leur interprétation | 3 |
| 7. Examen des résultats des réunions antérieures | 3 |
| 8. Analyse des résultats du présent exercice | 3 |
| 9. Action future et recommandations | 4 |
| Annexe 1 : La comparabilité des méthodes de culture sur membranes filtrantes (MF) et des tubes multiples (MPN) avec la détermination des concentrations des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer | 5 |
| Annexe 2 : Organisation des travaux pratiques | 13 |
| Annexe 3 : Résultats de l'exercice d'interétalonnage | 16 |
| Annexe 4 : Liste des participants | 21 |

PREFACE

Dans le cadre du Plan d'action pour la Méditerranée, adopté à Barcelone, en février 1975, par les Etats riverains de la Région, et plus particulièrement en vertu de l'article 10 de la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution, les parties contractantes ont entrepris d'établir, en étroite collaboration avec les organismes internationaux compétents, un système de surveillance de la pollution pour la région de la mer Méditerranée.

Les détails de ce programme de surveillance ont été adoptés par les parties contractantes à leur deuxième réunion ordinaire (Cannes, 2-7 mars 1981), dans le cadre du programme à long terme de surveillance et de recherche sur la pollution dans la Méditerranée (MED POL Phase II), adopté à la même réunion. La plupart des pays méditerranéens ont déjà présenté leurs programmes nationaux de surveillance, ou sont en train d'achever la préparation de ces programmes qui comprennent la surveillance de certains paramètres bactériologiques dans les eaux côtières à usage récréatif, ainsi que dans les eaux affectées à la conchyliculture.

En vue de normaliser au maximum la méthodologie et d'assurer la compatibilité des résultats, plusieurs méthodes de référence pour l'échantillonnage et l'analyse ont été élaborées à l'usage des laboratoires méditerranéens participant à ce programme. L'Organisation mondiale de la santé et le Programme des Nations Unies pour l'environnement ont établi, examiné et revu les modalités de la détermination des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer, par la méthode des membranes filtrantes (méthode MF) et du dénombrement des coliformes fécaux dans les bivalves par la méthode des tubes multiples (MPN) (ou méthode du nombre le plus probable - NPP). Les méthodes de référence pour la détermination des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la méthode des tubes multiples sont à présent en cours de préparation et seront bientôt disponibles.

Pour vérifier, une fois de plus, la comparabilité des résultats et des opérations de contrôle de la qualité, une série d'exercices d'interétalonnage ont été entrepris en 1983, après un exercice préparatoire tenu à Rome en 1982. A ces exercices participent les spécialistes des laboratoires du pays hôte chargés du programme de surveillance, ainsi que quelques laboratoires d'autres pays. Ces activités sont organisées alternativement en anglais et en français et sont combinées avec des réunions de consultation permettant d'analyser les résultats obtenus et de discuter de questions en rapport avec le programme MED POL.

Le premier exercice de la série (en français) a eu lieu à Barcelone du 7 au 11 novembre 1983 et le deuxième (en anglais) s'est tenu à Athènes du 25 au 29 juin 1984. Le présent exercice (en français) a été organisé par l'OMS et le PNUE, en collaboration avec l'Institut Pasteur de Tunis, dans le cadre de la Phase II du programme MED POL et du programme de surveillance tunisien. Cet exercice, comme les précédents, a principalement pour objectif de permettre aux participants de procéder à la détermination des paramètres bactériologiques d'échantillons identiques d'eau de mer en appliquant les méthodes recommandées, définitivement mises au point à la suite de la réunion tenue à Rome, en novembre 1982, à savoir :

- détermination des coliformes totaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes (PNUE/OMS, méthodes de référence pour les études de pollution marine, N° 2/Rev.1);
- détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes (PNUE/OMS, méthodes de référence pour les études de pollution marine, N° 3/Rev.1);
- détermination des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes (PNUE/OMS, méthodes de référence pour les études de pollution marine, N° 4/Rev.1);
- détermination des coliformes fécaux dans les bivalves par le test des tubes multiples (PNUE/OMS, méthodes de référence pour les études de pollution marine, N° 5/Rev.1).

Vu que les deux principales méthodes d'analyse bactériologique utilisées ont été la méthode de culture sur membranes filtrantes (MF) et celle des tubes multiples (ou du nombre le plus probable - NPP) et afin d'effectuer une comparaison réciproque exhaustive entre ces deux méthodes, le présent exercice a eu aussi pour objectif la détermination en parallèle des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer, par les deux méthodes, en utilisant les mêmes échantillons.

La réunion de consultation se proposait, en outre, les objectifs suivants :

- examiner les résultats du dernier exercice, ainsi que des exercices précédents de la série;
- débattre des paramètres microbiologiques utilisés pour la surveillance de la qualité sanitaire des eaux de mer côtières et des méthodes applicables à leur détermination et à leur interprétation;
- formuler des recommandations utiles pour les exercices ultérieurs de la série;
- proposer des recommandations sur les aspects pertinents du programme à long terme de surveillance et de recherche.

Des représentants des instituts tunisiens participant à la surveillance microbiologique dans le cadre de MED POL Phase II et à d'autres programmes de surveillance tunisiens ont été invités à prendre part à l'exercice d'interétalonnage et à la consultation, de même que des représentants de certains instituts d'autres pays méditerranéens (Algérie, France, Italie, Maroc et Yougoslavie) participant à MED POL Phase II. Afin de faciliter l'application éventuelle des méthodes de référence à d'autres régions, des représentants de deux instituts non méditerranéens, situés respectivement au Portugal et en Afrique de l'Ouest, ont également été conviés à prendre part à l'exercice et à la consultation.

Les organisations et institutions suivantes ont aussi été invitées à se faire représenter : Organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture (UNESCO), Commission océanographique intergouvernementale (COI), Organisation météorologique mondiale (OMM) et Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA).

1. Ouverture de la réunion (point 1 de l'ordre du jour)

La consultation et l'exercice d'interétalonnage ont été organisés par l'OMS et le PNUE, en collaboration avec l'Institut Pasteur de Tunis, du 12 au 16 novembre 1984. Y ont participé 26 conseillers temporaires, venant d'instituts tunisiens, d'autres pays méditerranéens et du Portugal. Le Bureau régional de l'Europe de l'OMS avait aussi envoyé un représentant. On trouvera en annexe une liste des participants (Annexe 3).

Le Dr L.J. Saliba, spécialiste scientifique principal, Unité de coordination du Plan d'action pour la Méditerranée, Bureau régional de l'OMS pour l'Europe, a ouvert la consultation au nom du Dr Leo A. Kaprio, directeur régional de l'OMS pour l'Europe, ainsi qu'au nom du Dr M. El Gezairy, directeur régional de l'OMS pour la Méditerranée orientale. Après avoir brièvement exposé les activités menées dans le cadre du programme MED POL qui ont abouti au présent exercice, il s'est félicité des activités entreprises et des locaux fournis par l'Institut Pasteur. Il s'est plu à faire remarquer que cet exercice organisé dans le cadre du programme MED POL était le premier à avoir lieu dans un pays d'Afrique du Nord et que, pour la première fois aussi, une réunion pouvait s'honorer d'avoir été accueillie par le ministre de la santé en personne.

Le professeur A. Chadli, directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, a souhaité la bienvenue aux participants. Il a fait remarquer que cette réunion marquait un jalon important dans la lutte livrée par de nombreux pays contre la pollution des mers, en général, et de la Méditerranée, en particulier. Par sa présence, M. M. Mzali, Premier ministre de Tunisie et ministre de l'intérieur, qui avait accepté de présider le comité d'honneur de la réunion, manifestait l'intérêt qu'il portait à ces préoccupations. Après avoir rappelé que le bien-être du peuple tunisien et sa santé physique et morale étaient l'un des soucis majeurs du chef de l'Etat tunisien, le professeur Mzali a rapidement évoqué les caractéristiques de la mer Méditerranée et de la situation actuelle concernant sa pollution, puis il a décrit les activités que mène l'Institut Pasteur de Tunis dans le domaine de la santé publique, en général, et dans le cadre du projet MED POL en particulier, en collaboration souvent avec d'autres instituts tunisiens. Enfin, il a souhaité à l'exercice d'interétalonnage tout le succès que l'on était en droit d'espérer.

Mme S. Lyagoubi-Ouahchi, ministre de la santé publique, a également souhaité la bienvenue aux participants et souligné l'heureuse initiative qui consistait à organiser pour la première fois une telle réunion dans un pays d'Afrique du Nord, et à choisir pour le cadre de cet exercice l'Institut Pasteur de Tunis qui participe régulièrement et activement, depuis 1976, aux réunions tenues dans les divers pays de la région de la Méditerranée. Elle a remercié l'OMS et le PNUE de l'assistance qu'ils apportaient à ces rencontres et fait remarquer que ce choix concrétisait les efforts que le gouvernement tunisien ne cessait de déployer afin que s'instaure une collaboration à double sens entre les deux rives de la Méditerranée dans le domaine de la recherche scientifique, pour le plus

grand bien de tous. En tant que ministre de la santé publique, elle se préoccupait aussi des problèmes environnementaux et le gouvernement tunisien attachait la plus grande importance à un développement sanitaire général résolument engagé dans la voie du progrès pour une protection efficace de la santé de tous les tunisiens car l'être humain constituait l'élément essentiel de la politique nationale de développement. En terminant, le ministre de la santé a remercié le professeur Chadli et son équipe d'avoir organisé cet exercice à l'Institut et formé des vœux pour le plein succès des travaux.

2. Portée et objectifs de la réunion (point 2 de l'ordre du jour)

Le Dr L.J. Saliba a exposé brièvement la portée et les objectifs de l'exercice et de la réunion.^a Il a souligné qu'il importait de suivre les instructions préparées pour la détermination des divers paramètres, de manière à assurer la comparabilité des résultats obtenus.

3. Election du bureau (point 3 de l'ordre du jour)

Le professeur A. Chadli a été élu à la présidence tandis que le Dr A. Nejjar était élu vice-président et le Dr P. Bernard rapporteur. Le Dr L.J. Saliba a fait fonction de secrétaire de la réunion.

4. Adoption de l'ordre du jour (point 4 de l'ordre du jour)

L'ordre du jour provisoire a été adopté à l'unanimité.

5. Organisation du programme des travaux (point 5 de l'ordre du jour)

Le président a expliqué le programme des travaux pratiques. Les instructions données aux participants concernant l'organisation de ces travaux figurent en annexe (Annexe 2).

6. Discussion générale sur les paramètres bactériologiques utilisés pour la surveillance de la qualité sanitaire des eaux de mer et sur les méthodes applicables à leur détermination et à leur interprétation (point 6 de l'ordre du jour)

Le professeur Jekov a présenté un document sur "la comparabilité des méthodes de culture sur membranes filtrantes (MF) et de culture en tubes multiples (MPN) avec la détermination des concentrations des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer". Cette étude, qui a été très appréciée par l'ensemble des participants, est reproduite en annexe (Annexe 1).

7. Examen des résultats des réunions antérieures (point 7 de l'ordre du jour)

Les rapports des exercices d'interétalonnage, organisés à Rome du 22 au 26 novembre 1982 et à Barcelone du 7 au 11 novembre 1983, ont été soumis aux participants sous leur forme définitive. Le rapport sommaire de l'exercice organisé à Athènes du 25 au 29 juin 1984 a également été soumis aux participants. Les résultats obtenus lors de ces exercices ont été expliqués brièvement.

8. Analyse des résultats du présent exercice (point 8 de l'ordre du jour)

Les résultats de l'exercice sont présentés plus loin (Annexe 3).

La comparaison de l'analyse de la concentration bactérienne d'une même eau (trois types d'eau de mer ont été analysés) par les deux méthodes MF et NPP a été jugée satisfaisante par l'ensemble des participants, compte tenu des facteurs humains. Toutefois, il est délicat de comparer une méthode testée 24 fois au cours du présent exercice (méthode NPP) et une méthode testée 8 fois (méthode MF).

Les résultats de la méthode MF appliquée à une même eau de mer sont similaires pour l'ensemble des groupes de participants. Toutefois, deux d'entre eux ont obtenu des résultats dissemblables en ce qui concerne les coliformes totaux et les streptocoques fécaux, variation sans doute due au facteur individuel.

La reproductibilité de la méthode NPP a été jugée tout à fait satisfaisante.

^a Document ICP/CEH 001/m03/2

Lors de l'exercice, les participants ont formulé les remarques suivantes :

- la lecture et l'interprétation des colonies de coliformes totaux sur gélose Endo et le dénombrement des streptocoques fécaux sur gélose Enterococcus Agar par la méthode MF soulèvent certaines difficultés;
- la méthode des tubes multiples (NPP) est plus facile à interpréter que la méthode des membranes filtrantes (MF);
- les membranes filtrantes sont d'un coût élevé pour certains pays;
- un mois avant l'exercice, l'OMS et le PNUE devraient communiquer les méthodes de référence aux laboratoires concernés ainsi que les compte-rendus des exercices précédents.

9. Action future et recommandations (point 9 de l'ordre du jour)

En plus des recommandations formulées dans le cadre des divers points de l'ordre du jour, les participants ont émis les recommandations ci-après :

- 1) Les exercices d'interétalonnage des méthodes de référence en microbiologie pour la surveillance des eaux côtières doivent être poursuivis de manière régulière. Un nouveau programme doit être établi pour le début de 1986. Ce programme devrait inclure d'autres indicateurs microbiologiques de pollution.
- 2) Sur la base des résultats obtenus durant les deux derniers exercices d'interétalonnage (Athènes, 25-29 juin 1984, et Tunis), une concordance significative a été mise en évidence entre la méthode des membranes filtrantes (MF) et celle des tubes multiples (NPP). La méthode NPP devrait donc être également recommandée comme méthode de référence pour déterminer la pollution des eaux côtières. A ce sujet, les versions définitives des méthodes de référence pour la détermination des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la méthode des tubes multiples (NPP) devront être achevées aussitôt que possible.
- 3) Il est souhaitable que d'autres méthodes soient élaborées pour la détermination des germes pathogènes et des germes indicateurs de pollution dans les eaux usées.
- 4) Dans la partie recherche du programme MED POL Phase II, les activités concernant les études épidémiologiques traitant de la qualité bactériologique de l'eau de mer et de son impact sur la santé devront être étendues. A ce sujet, les participants ont noté l'intention de l'OMS et du PNUE d'organiser une réunion consultative sur ce thème en 1985, en insistant sur la nécessité de mettre au point un protocole standard de manière à rendre comparable les travaux futurs qui devraient être effectués sur une base aussi large que possible.

Annexe 1

LA COMPARABILITE DES METHODES DE CULTURE SUR MEMBRANES FILTRANTES (MF)
ET DES TUBES MULTIPLES (MPN) AVEC LA DETERMINATION DES CONCENTRATIONS
DES COLIFORMES TOTAUX, DES COLIFORMES FECAUX
ET DES STREPTOCOQUES FECAUX DANS L'EAU DE MER

par le
professeur S. Jekov
Institut Pasteur, Tunis

Avant d'exposer les éléments de base pour la comparaison de deux méthodes, la "culture par filtration sur membrane" (MF) et la "culture en tubes multiples" (MPN) (ou méthode du nombre le plus probable - NPP), pour la détection et l'énumération simultanée des coliformes et des entérocoques (streptocoques fécaux) dans l'eau de mer, il est nécessaire d'évoquer, dans un ordre historique, certaines notions de colimétrie notamment :

- l'utilisation de ces germes comme marqueurs de la pollution fécale;
- la diversité des concepts sur l'interprétation sanitaire, voire les valeurs significatives en pronostic épidémiologique, des différentes espèces taxonomiques de coliformes;
- le choix judicieux de la méthode la mieux adaptée aux objectifs de la colimétrie en milieu marin.

Autrefois, l'origine microbienne des maladies infectieuses restait encore inconnue, mais l'on savait déjà que la pollution fécale des cours d'eau contribuait à la propagation des épidémies de choléra et de la typhoïde parmi les populations riveraines.

Plus tard, une fois connu le processus naturel de minéralisation de la matière organique et son aboutissement (nitrites, nitrates, chlorures), il a été admis que les chercheurs pouvaient se servir de marqueurs spécifiques de la pollution fécale pour mettre en évidence l'insalubrité de l'eau. Simultanément, des procédés de laboratoires propres à la détection de ces paramètres chimiques ont été élaborés et mis en application lors du contrôle sanitaire.

En 1881, T. Escherich isole des selles d'adultes et d'enfants un germe qu'il appelle "Bacterium coli commune".

Ce germe ayant été détecté régulièrement et en grand nombre dans les selles humaines et les excréments des animaux à sang chaud, il a été conclu que, dans la nature, seuls les organismes humains et animaux l'hébergeaient.

B. coli commune fut donc considéré comme un bio-marqueur de la pollution fécale, le premier par sa spécificité et sa sensibilité aux paramètres chimiques sus-mentionnés.

En plus de ces deux critères (spécificité et sensibilité), il importe que le germe marqueur soit doté d'une survie plus longue que celle des germes pathogènes éventuellement présents dans les matières fécales à l'origine de la pollution de l'eau.

A l'époque, la survie de B. coli commune n'était comparée qu'à celle de certaines souches de Shigella, de Salmonella et de vibrions. Il était admis que ce germe survivait dans l'eau plus longtemps que les germes pathogènes. Donc, en plus de son utilité comme marqueur de la pollution fécale, B. coli commune était considéré, dans un sens plus général, comme l'indicateur indirect de la présence éventuelle de germes pathogènes dans l'eau polluée.

Vincent (1889), Eijkman (1904) et Bulir (1907) ont alors mis au point des procédés de culture en tubes multiples (Vincent utilisait pour les coliformes un bouillon sélectif additionné à 0,85% d'acide phénique) pour la détermination de B. coli commune dans l'eau douce.

Cependant, dans les années qui ont suivi, d'autres chercheurs (U. Levine, 1921, et S. Koser, 1926) ont trouvé dans le sol, même dans des plantes, des bactéries identiques à B. coli commune par leur morphologie et d'après les critères biochimiques utilisés par T. Escherich.

Selon ces chercheurs, B. coli commune s'avérait ubiquitaire dans la nature; il n'y avait donc aucune raison de le considérer comme marqueur spécifique de la pollution fécale.

Après l'introduction de nouveaux paramètres différentiels, les souches isolées du sol et identifiées comme B. coli commune soumises à l'épreuve du test de "citrate", se sont avérées citrates-positives, tandis que celles provenant des selles humaines restaient constamment citrates-négatives.

La faculté des germes à utiliser les citrates introduits dans les milieux de cultures (bouillon de Koser, gélose de Simmons) comme seule source de nutrition carbonée a servi de critère pour répartir ultérieurement les souches de B. coli commune en deux catégories : les "coliformes citrates-négatifs" habituels de la microflore intestinale, donc significatifs de la pollution fécale, et les "coliformes citrates-positifs", propres à la microflore habituelle de l'environnement et, par conséquent, sans aucune signification sanitaire.

Cette répartition en deux catégories - "citrate-négatifs" et "citrate-positifs" - représente un premier essai de classification sanitaire des coliformes. Après mise à l'épreuve d'une gamme plus élargie de critères biochimiques dont, en premier lieu, les tests IMVIC,^a l'étude a montré qu'à l'intérieur de ces deux catégories il existe différents biotypes de coliformes se distinguant nettement les uns des autres.

Sur le plan taxonomique, les coliformes sont inclus dans la famille des entérobactéries. Ils constituent la tribu des Eschericheae, au sein de laquelle ils sont répartis en genres (Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Levinea (non admis par tous)), puis en espèces.

Pendant, cette classification est soumise aux modifications sans cesse apportées aux dénominations taxonomiques et à la distribution des coliformes en genres et en espèces. Ces imprécisions sont à l'origine de confusions survenant lors de l'interprétation sanitaire des coliformes. Les différents principes sur lesquels sont fondées les techniques de laboratoire en usage contribuent également à ces confusions.^b

En ce qui concerne la colimétrie, rappelons que le vocable "coliformes" n'est pas un terme taxonomique. Il est utilisé couramment pour désigner l'ensemble des entérobactéries rapportées à la tribu Eschericheae et qui ont pour caractères communs d'être des bacilles gram-négatifs, non sporulés, le plus souvent mobiles, métabolisant le lactose avec dégagement de gaz à 37 °C.

Sur le plan pratique, devant la diversité taxonomique des coliformes, il faut également retenir comme repères les espèces Escherichia coli (B. coli commune découvert par T. Escherich), Citrobacter freundii, Enterobacter aerogenes.

En dehors des classifications taxonomiques des coliformes, la surveillance sanitaire, qui s'intéresse exclusivement à eux en tant que marqueurs de la pollution fécale, utilise pour ses besoins une classification dite "sanitaire", dont la première version (susmentionnée) distinguait deux catégories de coliformes, les citrates-négatifs (représentés par E. coli et ses biotypes) d'origine fécale et les citrates-positifs dont l'environnement est le seul habitat.

A l'heure actuelle, après des recherches approfondies et des dizaines d'années de discussions passionnées entre les chercheurs, la classification sanitaire des coliformes reste encore réduite à deux catégories ou, plus exactement, à deux tests, notamment pour les coliformes "fécaux" et les coliformes "totaux" répartis, comme dans la première classification, sur la base d'un seul critère, leur faculté de faire fermenter le lactose à 44,5 °C.

Il est admis (selon l'école américaine) que les coliformes, dont l'espèce représentative est Escherichia coli, sont incontestablement d'origine fécale. Les coliformes fécaux ont été définis^c comme ayant pour caractères communs d'être des "bactéries gram-négatives", aérobies et

^a Les tests IMVIC (I=indol, M=rouge de méthyle, V=Voges-Proskauer, IC=citrate de soude) ne peuvent, à l'heure actuelle, servir à identifier que les genres et non les espèces coliformes.

^b Peut-être les études en cours sur la classification des coliformes sur la base de nouveaux critères et de méthodes plus élaborées, voire d'une taxonomie numérique, génétique et moléculaire, arriveront-elles à mettre au point une classification mieux fondée, plus adaptée aux objectifs de la surveillance en milieu marin et globalement concordante.

^c PNUE. Détermination des coliformes fécaux dans les bivalves par le test des tubes multiples, Méthodes de référence pour les études de pollution marine, N° 5, Rev.1, 1983 (en coopération avec l'OMS).

anaérobies facultatives, en forme de bâtonnets, ne sporulant pas et fermentant le lactose en produisant du gaz en moins de 24 heures, en culture à 37 °C et 44,5 °C.^a Ils produisent de l'indole en eau tryptonée (contenant du tryptophane) en culture à 44,5 °C. Dans la pratique de routine de certains laboratoires, les coliformes indole-négatifs à 44,5 °C^b sont également considérés comme "fécaux". D'autres laboratoires considèrent les termes "E. coli" et "coliformes fécaux" comme synonymes. Selon notre expérience personnelle, s'il est besoin de différencier les E. coli, il faut recourir aux tests IMVIC et la production d'indole à 44,5 °C doit être obligatoire.

Le test des "coliformes totaux" met en évidence à la fois les coliformes fécaux et les coliformes dépourvus de la faculté de fermenter le lactose à 44,5 °C. Mais en ce qui concerne son interprétation sur le plan sanitaire, les chercheurs n'étaient pas unanimes.

Afin de concilier les définitions et les interprétations en cours qui sont souvent fort différentes, les auteurs des "Normes internationales appliquées à l'eau de boisson" (OMS, Genève, 1962) ont proposé d'admettre que tous les coliformes peuvent être d'origine fécale^c; leur présence est donc considérée comme indiquant une pollution.

Dans le cadre de cette proposition, on peut citer H. Leclerc (1984) qui précise que les tests "haute température" appliqués pour mettre en évidence une population ou un groupe de germes significatifs sur le plan de l'hygiène sont :

- a) significatifs, en ce sens que les bactéries mises en évidence (à 44 °C) sont le plus souvent des E. coli ou des bactéries sûrement d'origine fécale;
- b) restrictifs et relatifs, en ce sens que de nombreuses entérobactéries fécales ne sont probablement pas capables de se multiplier à cette température, c'est-à-dire que l'on admet l'existence de coliformes privés de la faculté de se reproduire à 44 °C, sans contester leur origine fécale.

Selon Farmer (1977), parmi les entérobactéries d'origine fécale, 20% seulement peuvent être identifiées à une espèce décrite et 30% à un genre donné, sans préciser l'espèce, tandis que 50% échappent à toute classification.

Les coliformes soumis au test des "coliformes totaux" et dont l'origine fécale est contestée, à l'heure actuelle sont attribués à une contamination fécale ancienne et moins importante du point de vue du "prognostic épidémiologique", tandis que les coliformes fécaux sont considérés plus spécialement comme les marqueurs d'une contamination fécale récente ou, plus exactement, d'une contamination par des matières fécales fraîches^d.

Colimétrie en milieu marin

Les notions théoriques, les méthodes d'analyse, les normes d'interprétation sanitaire des coliformes, servant d'indicateurs de la pollution fécale, constituent un domaine particulier de la microbiologie du milieu (microbiologie sanitaire), notamment la "colimétrie".

L'objectif, au départ, était de contribuer à l'amélioration du contrôle sanitaire et ces méthodes ont été conçues et expérimentées en eau douce.

^a Dans la méthode de la "culture sur membrane filtrante", le critère différentiel des coliformes (dégradation du lactose, manifestée par acidification suivie de dégagement de gaz) est réduit au paramètre "acidification".

^b Modification des tests thermophiles à 46 °C d'Eijkman.

^c Une telle proposition trouve confirmation dans notre expérience car, dans les selles qui nous parviennent au laboratoire pour examens de routine, nous avons décelé, parallèlement aux E. coli, la présence de coliformes citrates-positifs dans 40% des échantillons.

^d Dans la méthode de "culture sur membrane filtrante", telle qu'elle est habituellement appliquée, il est justifié de définir les deux tests comme suit : nombre total des coliformes/100 ml à 37 °C pour le test des "coliformes totaux" et nombre total des coliformes/100 ml à 44 °C pour le test des "coliformes fécaux".

Plus tard, ces principes et ces tests, mis au point pour la colimétrie des eaux douces, ont été appliqués directement en milieu marin, sans tenir compte du fait que celui-ci constitue un écosystème très dynamique et très diversifié et qu'il n'y a pas de comparaison possible avec le biotope humain des coliformes, ni avec les conditions de vie que ceux-ci trouvent dans l'environnement continental.

Il existe donc certains points faibles dans la colimétrie telle qu'elle est actuellement appliquée à la surveillance du milieu marin, notamment des eaux de mer à vocation balnéaire.

Introduits dans le milieu marin, les coliformes, pour survivre, doivent s'adapter à des conditions tout à fait différentes de celles de leur habitat naturel et modifier leur métabolisme pour l'équilibrer à l'écosystème marin. On peut alors voir se manifester de nouvelles facultés ou disparaître une ou plusieurs facultés considérées comme spécifiques de l'espèce; c'est le cas, par exemple, de la perte (par *E. coli*) de la faculté de fermenter le lactose et de produire de l'indole à 44 °C.^a Ces adaptations sont provisoires et, tôt ou tard, ces germes finissent par dégénérer et périr. Peut-être pourrait-on expliquer ainsi la variabilité et l'instabilité des caractères biochimiques des souches coliformes immédiatement isolées du milieu marin.

Etant donné aussi qu'elle était basée à l'époque sur la survie en eau douce et que les comparaisons se bornaient à certains microorganismes du genre *Shigella* ou *Salmonella* et à certains vibrions, l'interprétation dans un but sanitaire et épidémiologique n'est plus conforme non plus aux connaissances contemporaines en épidémiologie et en microbiologie.

On sait maintenant que la contamination fécale introduit dans le milieu marin non seulement des entérobactéries pathogènes, mais aussi les agents de plusieurs maladies virales (*Poliovirus*, virus de l'hépatite infectieuse B, *Coxsackie virus*, etc.) et parasitaires, dont la survie est incontestablement plus longue que celle d'*E. coli*, espèce de coliformes reconnue aujourd'hui comme indicateur de la pollution fécale. Donc l'absence d'*E. coli* et de coliformes fécaux, en général, (sur le plan de la surveillance sanitaire) ne signifie nullement que l'eau de mer est exempte d'agents pathogènes et la recherche d'*E. coli*, y compris le test des "coliformes fécaux", ne s'avère pas, en sensibilité et spécificité, meilleur, pour la mesure de la qualité de l'eau de baignade, que le test des "coliformes totaux".

Selon notre expérience, les échantillons d'eau de mer prélevés en des points éloignés de toute source de pollution se sont révélés exempts de coliformes,^b ce qui revient à dire que si l'on trouve des coliformes dans l'eau de mer, leur présence doit être considérée, quelle que soit l'espèce, comme l'indice d'une pollution d'origine tellurique; nous entendons par ce terme la pollution du milieu marin par les eaux usées, dans un sens plus large que la contamination fécale. La transmission des coliformes en milieu marin se fait, en effet, par l'intermédiaire des eaux usées (eaux d'égout, eaux des rivières réceptrices d'eaux usées, eaux de ruissellement des zones urbaines) qui véhiculent, en même temps que les germes pathogènes, des polluants physiques et chimiques. Il convient de noter que les voyageurs et les navigants peuvent être à l'origine d'une certaine charge du milieu marin en matières fécales. Cette charge peut cependant être évaluée, sur la base du nombre des voyageurs, par le test "équivalent/habitant/jour".

Etant donné qu'à l'heure actuelle, les déchets industriels sont collectés et le plus souvent évacués selon le système du "tout à l'égout", par les réseaux publics d'égout, il est justifié d'utiliser les coliformes non seulement pour évaluer les risques de maladies infectieuses transmises par l'eau de mer, mais également sur le plan du "génie sanitaire", car ils peuvent aider à mieux connaître la diffusion des eaux usées et à suivre et établir le trajet de propagation des contaminants chimiques apportés avec les eaux usées. La colimétrie peut aider à évaluer la capacité de l'autoépuration du milieu marin ou à choisir judicieusement l'emplacement d'un déversoir et peut aussi servir de paramètre esthétique.

Ces différentes applications de la détermination des coliformes amènent à demander lequel des deux indices (NPP/100 ml) (coliformes "totaux" ou coliformes "fécaux") est l'indicateur le plus spécifique et le plus sensible pour les objectifs susmentionnés.

^a Cette faculté n'est pas suffisamment étudiée pour le moment. Il faut la considérer comme une faculté d'adaptation. On a découvert (H. Leclerc) des *Escherichia coli* psychrophiles qui peuvent croître même à 4 °C.

^b Un certain nombre de poissons pêchés au large et dont on a étudié la microflore viscérale se sont révélés exempts de coliformes.

Avant de parler des priorités et d'évoquer les inconvénients propres aux deux méthodes à comparer, il faut noter qu'à l'heure actuelle la méthode de culture en tubes multiples (NPP) n'est pas appliquée de manière standard. Il existe diverses modifications de cette méthode qui diffèrent par leur sensibilité. Il est donc indispensable de savoir au préalable laquelle de ces modifications sera comparée à la méthode de la culture sur membranes filtrantes (MF). En premier lieu, il faut noter que la méthode NPP, dans sa phase présomptive, fait appel à différents bouillons lactosés, dont trois sont plus particulièrement recommandés : le bouillon lactosé (Lactose Broth), exempt de composantes inhibitrices, le bouillon de Mac Conkey (Mac Conkey Broth), additionné de taurocholate de sodium comme inhibiteur et le bouillon au vert brillant bilié (Green Brilliant Lactose Bile Broth), la bile et le vert brillant étant ajoutés comme inhibiteurs. Ces deux derniers milieux sont donc considérés comme sélectifs pour les coliformes.

Nous avons déjà mentionné que le milieu marin n'est pas favorable à la survie des coliformes. Progressivement leur vitalité diminue et les moins résistants entrent en état de "stress". En culture dans les bouillons au vert brillant et aux sels biliaires, les concentrations des inhibiteurs s'avèrent également inhibitrices pour eux (tableau 2), tandis que le bouillon lactosé offre aux coliformes en "stress" des conditions de réanimation à l'image de l'eau tryptonée, utilisée comme milieu de préenrichissement dans les techniques d'analyse des denrées alimentaires.

Afin d'étudier lequel de ces trois milieux liquides rend la méthode NPP la plus sensible, dans le cadre du projet MED POL II, en 1982, nous avons cherché le NPP/100 ml des coliformes totaux, des coliformes fécaux et d'E. coli en utilisant simultanément les trois bouillons sus-mentionnés.

L'étude a porté sur 72 échantillons d'eau de mer, répartis en trois groupes de 24 échantillons prélevés dans trois stations (une dont l'eau est fortement polluée par les déversements d'eaux usées, la deuxième moyennement polluée et la troisième supposée relativement propre). Le choix a été fait sur la base des données de la surveillance de routine.

Les échantillons ont été ensemencés dans des séries de 5 tubes de 10 ml, 1 ml et 0,1 ml pour chacun des trois bouillons lactosés, dans la phase présomptive de la méthode NPP (dans la phase confirmative, on a effectué des cultures à 44 °C sur bouillon lactosé bilié au vert brillant et en eau tryptonée).

En comparant les valeurs des NPP des coliformes ("totaux", "fécaux" et "E. coli") propres à chacun des trois bouillons lactosés pour chaque échantillon, on peut répartir les bouillons lactosés en trois niveaux de sensibilité : "élevée", "moyenne" et "limitée".

Le niveau de sensibilité le plus élevé a été attribué au bouillon lactosé (Lactose Broth)^a pour lequel les NPP ont été les plus élevés, c'est-à-dire qui s'est avéré le plus sensible.

Les résultats de cette évaluation sont consignés dans les tableaux 1 et 2. Selon ces tableaux, les pourcentages pour le niveau dit de "sensibilité élevée" pour les coliformes totaux, les coliformes fécaux et E. coli sont significativement plus élevés dans le cas du bouillon lactosé. Celui-ci est donc plus sensible et qualitativement supérieur aux deux autres bouillons. Les pourcentages présentés au tableau 2 concernant le bouillon lactosé bilié au vert brillant montrent nettement son effet inhibiteur sur les coliformes.

Dans une seconde phase de notre étude, nous avons comparé la sensibilité de la technique des tubes multiples utilisant le bouillon lactosé avec celle de la culture sur membrane filtrante utilisant la gélose m.FC. Nos observations sont présentées au tableau 3.

Les résultats obtenus semblent montrer que la méthode NPP utilisant le bouillon lactosé est plus efficace pour déterminer la pollution fécale d'une zone marine.

Les méthodes relatives aux paramètres bactériologiques ont été déjà discutées au cours de l'exercice d'interétalonnage et de la consultation tenus à Rome (OMS/PNUE, 22-26 novembre 1982). Sur le plan de la comparabilité des deux méthodes (MF et NPP) qui a été également discutée, aucune des deux méthodes n'a été déclarée comme supérieure à l'autre. Il a été constaté que l'une et l'autre présentaient à la fois des avantages et des inconvénients. Les données de la littérature pertinente ne vont pas à l'encontre de cette constatation.

^a En colimétrie du milieu marin, nous utilisons le bouillon lactosé (Lactose Broth) additionné de bleu de bromothymol comme Ph indicateur d'une acidification du lactose sans dégagement de gaz. Ce milieu qui nous a donné des résultats très encourageants présente l'avantage de permettre de profiter des cultures de la phase présomptive de la méthode NPP pour déterminer le NPP/100 ml des streptocoques fécaux en faisant des réensemencements sur la gélose de Slanets ou sur une gélose au tellurite de potassium (en phase confirmative).

Tableau 1. Comparaison de la sensibilité (en %) des trois bouillons lactosés dans la détermination de la concentration d'Escherichia coli dans les échantillons analysés

| Type de bouillon utilisé | NPP/100 ml de coliformes totaux | NPP/100 ml de coliformes fécaux | NPP/100 ml d'Escherichia coli |
|--------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Lactose | 79,41 | 71,01 | 76,81 |
| Mac Conkey | 41,17 | 49,27 | 46,37 |
| Bouillon vert brillant | 19,11 | 30,43 | 40,57 |

Tableau 2. Comparaison de la sensibilité (en %) de la technique des tubes multiples selon le type de bouillon lactosé utilisé pour la détermination du nombre le plus probable (NPP) de coliformes

| Type de bouillon lactosé | Degré de sensibilité | | | | | | | | |
|--------------------------|---------------------------------|-------|--------|---------------------------------|-------|--------|-------------------------------|-------|--------|
| | NPP/100 ml de coliformes totaux | | | NPP/100 ml de coliformes fécaux | | | NPP/100 ml d'Escherichia coli | | |
| | élevé | moyen | limité | élevé | moyen | limité | élevé | moyen | limité |
| Lactose | 79,41 | 14,71 | 5,88 | 71,01 | 24,63 | 2,89 | 76,81 | 20,27 | 2,89 |
| Mac Conkey | 41,17 | 47,11 | 11,76 | 49,27 | 28,98 | 21,73 | 46,73 | 33,33 | 20,28 |
| Bouillon vert brillant | 19,11 | 45,58 | 35,29 | 30,43 | 47,82 | 21,73 | 40,57 | 43,47 | 15,98 |

Note : un même échantillon a été étudié sur les trois bouillons lactosés et comparé en 3 NIP obtenus par rapport à chaque test.

Tableau 3. Comparaison de la sensibilité (en %) des deux techniques par rapport aux nombres d'échantillons analysés

| Point de prélèvement | Technique des tubes multiples supérieure à celle de la membrane filtrante | Technique de la membrane filtrante supérieure à celle des tubes multiples | Egalité |
|----------------------|---|---|---------|
| Propre | 42,8 | 33,33 | 23,8 |
| Contaminé | 70,58 | 29,41 | 0 |
| Pollué | 87,5 | 12,5 | 0 |

Les données des exercices d'interétalonnage tenus à Rome (1982) et à Barcelone (1983)^a ne peuvent pas non plus servir pour étudier la comparabilité des deux méthodes (MF et NPP).

Lors de la détermination des concentrations de coliformes et d'entérocoques dans les trois types d'échantillons d'eau de mer (A1, B1 et C1) les différents groupes de travail ont appliqué la méthode MF. Donc les résultats obtenus ne sont significatifs que pour vérifier l'exactitude et la sensibilité de la technique propre à la méthode MF, appliquée simultanément à un même échantillon par différents groupes de travail.

En ce sens, les intervalles des concentrations en colonies par 100 ml, dans l'exercice d'étalonnage de Rome et surtout dans celui de Barcelone (75 000 000 - 45 000 pour les coliformes totaux, 4 000 000 - 12 900 pour les coliformes fécaux et 1 730 000 - 57 000 pour les entérocoques), à condition que la méthode soit correctement appliquée par tous les chercheurs, montrent que la méthode MF n'est pas suffisamment exacte. Pour pouvoir comparer l'exactitude des deux méthodes, un étalonnage similaire portant sur la méthode NPP est évidemment nécessaire.

Inconvénients et avantages de la méthode NPP (culture en tubes multiples, sur bouillon lactosé) par rapport à la méthode MF

1. Inconvénients

La méthode NPP a été conçue, dans le temps, pour évaluer le test du "colititre" - le plus petit volume d'eau analysée dans lequel on décèle la présence de coliformes.

Cette méthode a été, par la suite, artificiellement adaptée au test NPP (Most Probable Number - MPN) par transformation mathématique des données du colititre à l'aide de tables statistiques^b déterminant le NPP en fonction des résultats observés.

Donc la méthode MF offre la possibilité de déterminer directement la concentration des coliformes en dénombrant les colonies, tandis que, par la méthode NPP, cette concentration est évaluée statistiquement.

En cas de contrôle systématique des eaux de mer prélevées dans des secteurs connus exempts de pollution fécale et de matières en suspension, la méthode NPP est techniquement moins rapide et exige plus de matériel, d'espace (étuve, paillasse, etc.) et de personnel que la méthode MF.

2. Avantages

- Possibilité de déterminer, à partir de la phase présomptive, simultanément les trois tests NPP : coliformes totaux, coliformes fécaux et E. coli;
- possibilité d'effectuer la détermination des NPP par des volumes constants à ensemercer (5 x 10 ml, 5 x 1 ml et 5 x 0,1 ml), indépendamment du degré supposé de pollution fécale de l'eau de mer à analyser;
- spécificité plus grande sur le plan technique, cette méthode étant fondée sur la faculté propre aux coliformes, notamment de dégrader le lactose avec dégagement de gaz, tandis que la méthode MF est uniquement fondée sur l'acidification du lactose;
- meilleure "régénération" des cellules bactériennes (coliformes en "stress");
- analyse des eaux de mer riches en matières en suspension plus facile;
- application possible dans tous les laboratoires : l'appareillage et la verrerie (étuve, portoirs, pipettes graduées, tubes à essai, etc.) sont disponibles dans tout laboratoire fonctionnel;
- application possible sans importation de matériel spécialisé (membranes filtrantes, appareillage approprié, etc.);

^a Voir "Rapport sur une réunion mixte OMS/PNUE", Barcelone, 1983.

^b Ces tables présentent des lacunes puisqu'elles ne prévoient pas de résultats pour un certain nombre de combinaisons dites "cas paradoxaux" ou "fausses réactions".

- lecture plus facile et plus standardisée des résultats. Cette méthode exige aussi moins de temps, surtout en cas d'échantillons prélevés dans des secteurs du littoral où se déversent des eaux usées et où l'on est obligé d'utiliser plusieurs membranes;
- moindre coût, surtout pour les pays qui doivent importer les membranes filtrantes. "L'emploi de la méthode NPP s'impose en raison principalement de la méconnaissance que l'on a du niveau de pollution et donc du nombre élevé de membranes qu'il conviendrait d'utiliser" (H. Leclerc, 1984).^a

CONCLUSION

En surveillance sanitaire, le fait de constater une pollution fécale n'est qu'une étape pré-somptive, un signal d'alarme, qui oblige ultérieurement à continuer la recherche afin de dépister l'origine de cette pollution, de révéler les mécanismes de sa transmission, d'établir son trajet et sa survie afin qu'on puisse préciser et planifier les mesures propres à "assainir" le milieu marin.

La présence d'E. coli caractérisée par une courte survie et, en général, le test NPP/100 ml aux coliformes fécaux ne peuvent pas satisfaire à ces objectifs.

L'indice NPP/100 ml des coliformes totaux nous paraît le mieux adapté pour dépister et évaluer la contamination tellurique. Dans un tel choix, il n'est pas nécessaire de différencier les coliformes entre eux, car toutes les espèces, indépendamment des polémiques sur leur origine fécale ou non, auraient une même valeur indicatrice d'une contamination tellurique, étant donné que les divers coliformes que l'on trouve en milieu marin proviennent tous du déversement des effluents.

Donc en colimétrie du milieu marin, le test NPP/100 ml des coliformes totaux doit être préféré.

La méthode de NPP, celle de la culture en tubes multiples sur bouillon lactosé, appliquée en colimétrie du milieu marin, que ce soit pour une surveillance de routine ou pour la recherche, est plus valable que la méthode MF ou culture par filtration sur membrane.

^a Lors de l'exercice d'étalonnage de Barcelone (1983), la colimétrie par la méthode MF comportait la filtration de 5 à 20 ml de chacune des six dilutions de l'eau de chaque type d'échantillon, ce qui fait un nombre important de membranes à utiliser. Geldreich (1975) réduit ce nombre à trois, correspondant à trois volumes différents choisis selon le degré de pollution supposé.

Annexe 2

ORGANISATION DES TRAVAUX PRATIQUES

1. Groupes de travail

Les participants seront répartis en groupes de trois. Chaque groupe sera désigné par un numéro en chiffre romain (groupe I, groupe II, groupe III, etc.). A l'intérieur de chaque groupe les participants seront distingués à l'aide de numéro en chiffres arabes 1, 2 et 3. Les numéros de la place et du groupe des participants indiqués sur les paillasse ne devront pas être modifiés pendant toute la durée de l'exercice.

2. Echantillons

Chaque participant trouvera sur sa paillasse trois flacons vissés de un litre contenant trois échantillons d'eau côtière graduellement polluée :

- un échantillon "A" (étiquette rouge) d'eau côtière fortement polluée;
- un échantillon "B" (étiquette jaune) d'eau côtière moyennement polluée;
- un échantillon "C" (étiquette blanche) d'eau côtière faiblement polluée.

Chaque groupe trouvera également sur sa paillasse un échantillon de bivalves, clovisse (tapes decussatus).

3. Matériel de laboratoire

Chaque participant aura sur sa paillasse, ou dans son casier, le matériel ci-dessous, destiné à la détermination du test NPP par la méthode de culture en tubes multiples :

- 3 portoirs identiques de 15 tubes chacun : 5 tubes de bouillon lactosé concentré et 10 tubes de bouillon lactosé simple;
- 3 portoirs identiques de 15 tubes chacun : 5 tubes de Rothe concentré et 10 tubes de Rothe simple.

Ces tubes serviront à l'analyse des trois échantillons d'eau côtière A, B et C : détermination des NPP des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux (phase présomptive).

- Un portoir de 15 tubes : 5 tubes de bouillon lactosé concentré et 10 tubes de bouillon lactosé simple.

Ces tubes serviront à la détermination du NPP des coliformes fécaux dans l'échantillon de bivalves.

- 10 pipettes stériles graduées de 10 ml;
- 10 pipettes stériles graduées de 1 ml;
- 1 lot de tubes de bouillon lactosé bilié au vert brillant;
- 1 lot de tubes d'eau peptonée;
- 1 flacon de réactif de Kovacs.

L'ensemble de ce matériel servira pour la phase confirmative des coliformes fécaux.

- Un lot de tubes de milieu de Litsky;
- un lot de boîtes de Pétri contenant de la gélose pour entérocoques (Enterococcus agar) pour la phase confirmative des streptocoques fécaux;
- un lot de boîtes de Pétri contenant de la gélose Endo pour la phase confirmative des coliformes totaux;
- des pipettes Pasteur pour le repiquage; 1 pot pour les 2 groupes d'une table paillasse.

Chaque groupe disposera du matériel ci-dessous destiné au dénombrement des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans les échantillons A, B et C, par la méthode de la filtration sur membrane :

- un équipement de filtration sur membrane : pompe à vide et deux unités de filtration (entonnoir, support de membrane);

- des membranes filtrantes stériles, conditionnées séparément;
- des pipettes graduées stériles (3 pipettes de 50 ml, 3 pipettes de 20 ml; 20 pipettes de 10 ml);
- 60 boîtes de Pétri contenant différents types de gélose : 20 boîtes de gélose "Endo" pour la culture sur membrane filtrante des coliformes totaux, 20 boîtes de gélose "FC" pour la culture sur membrane filtrante des coliformes fécaux et 20 boîtes de gélose "Enterococcus agar" pour la culture sur membrane filtrante des streptocoques fécaux;
- 24 flacons de 90 ml chacun d'eau tamponnée (étiquette verte) à utiliser pour la préparation des dilutions décimales (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) des eaux à analyser.

4. Etiquetage

Chaque participant marquera sur les tubes de milieux liquides et sur les boîtes de milieux gélosés :

- son numéro de groupe en chiffre romain (de I à VIII);
- son numéro de place en chiffre arabe (1, 2 ou 3);
- l'indication de l'échantillon : A, B, C ou bivalves;
- le volume en ml d'eau filtrée non diluée 50, 20 et 5 ml;
- ou le volume d'eau diluée : 20 et 5 ml en indiquant également le degré de dilution : 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .

5. Répartition des manipulations

Lundi 12 novembre 1984 : soir

Les participants procéderont à la détermination des tests NPP des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux par la méthode de culture en tubes multiples dans les trois échantillons A, B et C. Ils détermineront également le NPP des coliformes fécaux dans l'échantillon de bivalves.

Mardi 13 novembre 1984 : matin

Chaque groupe procédera au dénombrement des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux par la méthode de la filtration sur membrane (MF) dans les échantillons A et B selon le schéma suivant :

| | | |
|----------------------|---------------|----------------------|
| Dans chaque groupe : | | |
| participant 1 | échantillon B | coliformes totaux |
| participant 2 | échantillon B | coliformes fécaux |
| participant 3 | échantillon B | streptocoques fécaux |
| Dans chaque groupe : | | |
| participant 1 | échantillon A | coliformes fécaux |
| participant 2 | échantillon A | streptocoques fécaux |
| participant 3 | échantillon A | coliformes totaux |

Mardi 13 novembre 1984 : soir

| | | |
|----------------------|---------------|----------------------|
| Dans chaque groupe : | | |
| participant 1 | échantillon C | streptocoques fécaux |
| participant 2 | échantillon C | coliformes totaux |
| participant 3 | échantillon C | coliformes fécaux |

Pour les journées du mercredi 14 et du jeudi 15, chaque participant est prié de se référer au programme général.

6. Inscription des résultats

Les participants disposeront, pour l'inscription des résultats, des deux formulaires suivants ainsi que d'une table pour le calcul du NPP par 100 ml d'eau côtère :

- formulaire 1 pour l'enregistrement des données concernant la méthode de culture en tubes multiples;

- formulaire 2 pour l'enregistrement des données concernant la méthode de filtration sur membrane.

Le schéma des manipulations à suivre pour la détermination du NPP des coliformes fécaux dans les échantillons de bivalves se trouve dans le fascicule 5 Rev.1, page 10.

La table pour le calcul du NPP par 1 g de chair de bivalves se trouve dans le fascicule 5 Rev.1, page 12.

7. Recommandations importantes

Les participants sont invités à consulter attentivement, avant le début des manipulations, les fascicules N° 2 Rev.1, N° 3 Rev.1, N° 4 Rev.1, N° 5 Rev.1 de "Mers régionales", édités par le PNUE en 1983. Ces fascicules sont inclus dans leur porte-documents.

A la fin de chaque séance de travaux pratiques, les participants sont priés de déposer à la laverie du laboratoire les tubes et les boîtes de culture utilisés.

Annexe 3

RESULTATS DE L'EXERCICE D'INTERETALONNAGE

Introduction

L'objectif de l'exercice a été de permettre aux participants de réaliser des déterminations de paramètres bactériologiques en utilisant des échantillons identiques d'eau de mer et en appliquant des méthodologies uniformes et de comparer les résultats obtenus a) entre les individus pour chaque paramètre, et b) entre les deux méthodes (membranes filtrantes et nombre le plus probable) appliquées pour les paramètres relatifs.

Organisation et méthodologie

Les participants ont été répartis en huit groupes de trois. Trois échantillons d'eau de mer ont été analysés par la méthode des membranes filtrantes (MF) qui a été utilisée par chaque groupe, et par la méthode du nombre le plus probable (NPP) qui a été utilisée par chaque participant individuellement : échantillon "A" d'eau côtière fortement polluée, échantillon "B" d'eau côtière moyennement polluée et échantillon "C" d'eau côtière faiblement polluée. Chaque échantillon a été analysé pour la détermination des coliformes totaux (CT), des coliformes fécaux (CF) et des streptocoques fécaux (SF). En outre, la méthode NPP a été utilisée par chaque groupe pour l'analyse d'un échantillon de bivalves (clovisses tapes decussatus) provenant d'un environnement fortement pollué.

Pour les déterminations des concentrations microbiennes dans l'eau de mer avec la méthode MF et dans les bivalves avec la méthode NPP, les participants ont utilisé les méthodes de référence PNUE/OMS, N° 2, 3, 4 et 5. Pour les déterminations dans l'eau de mer avec la méthode NPP, les participants ont utilisé les méthodes préparées par l'Institut, sur la base de la 13ème édition de "Standard methods for the examination of water and wastewater" (Association américaine de la santé publique).

Résultats et discussion

Les résultats obtenus par les participants, pour les déterminations des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans les échantillons d'eau de mer, sont présentés ci-après sous forme de tableau (tableau 1). En général, la comparabilité des chiffres obtenus entre les individus peut être considérée comme satisfaisante. La variation entre les chiffres obtenus par certains participants ou certains groupes de participants et les moyennes enregistrées s'explique sans doute par le degré d'expérience de chacun. Quelques participants, en fait, utilisaient la méthode MF pour la première fois. Une autre source possible de variation pourrait être les légères, mais néanmoins évidentes, différences de pression d'évacuation entre les appareils utilisés par les différents groupes.

La comparabilité des résultats obtenus pour les échantillons identiques avec les deux méthodes (MF et NPP) peut être également considérée comme satisfaisante, particulièrement vis-à-vis de l'interprétation de ces résultats.

Pour les bivalves qui étaient fortement pollués, tous les participants ont obtenu des résultats identiques, avec un nombre de coliformes fécaux de 2400 ou plus par 100 grammes.

Tableau 1. Nombre par 100 ml d'eau de mer

| Groupe | Coliformes totaux | | | | Coliformes fécaux | | | | Streptocoques fécaux | | | |
|----------------------|-------------------|------|------|------|-------------------|------|------|------|----------------------|------|------|-----|
| | MF | | NPP | | MF | | NPP | | MF | | NPP | |
| | 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | | 1 | 2 | 3 | |
| <u>Echantillon A</u> | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 1200 | 1600 | 2400 | 2400 | 446 | 920 | 350 | 1600 | 50 | 240 | 17 | 540 |
| 2 | 2500 | 2400 | 2400 | 2400 | 500 | 2400 | 2400 | 2400 | 150 | 240 | 350 | 350 |
| 3 | 1250 | 2400 | 2400 | 2400 | 400 | 350 | 1600 | 1600 | 0 | 240 | 350 | 34 |
| 4 | 3200 | - | 2400 | 1600 | 900 | - | 2400 | 1600 | 500 | 170 | 280 | 927 |
| 5 | 1275 | 2400 | 2400 | 2400 | 400 | 2400 | 2400 | 2400 | 2000 | 1600 | 540 | 540 |
| 6 | 3300 | 920 | 920 | 350 | 500 | 920 | 920 | 200 | 350 | 920 | 2400 | 34 |
| 7 | 5400 | 1600 | 2400 | 1600 | 167 | 1600 | 1600 | 1600 | 258 | 350 | 540 | 350 |
| 8 | 2150 | 2400 | 350 | 350 | 1200 | 2400 | 350 | 350 | 0 | 540 | 12 | 170 |
| <u>Echantillon B</u> | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 1100 | 130 | 220 | 350 | 180 | 33 | 94 | 130 | 50 | 5 | 4 | 4 |
| 2 | 850 | 70 | 79 | 79 | 60 | 31 | 49 | 49 | 35 | 4 | 4 | 4 |
| 3 | 250 | 110 | 130 | 110 | 60 | 79 | 7 | 33 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | 740 | - | 130 | 240 | 35 | - | 49 | 79 | 5 | 2 | 2 | 4 |
| 5 | 620 | 79 | 130 | 180 | 106 | 49 | 130 | 33 | 33 | 6 | 4 | 34 |
| 6 | 800 | 94 | 70 | 49 | 100 | 24 | 70 | 22 | 160 | 4 | 4 | 6 |
| 7 | 3460 | 130 | 110 | 356 | 105 | 130 | 49 | 79 | 7 | 2 | 2 | 4 |
| 8 | 660 | 220 | 350 | 350 | 375 | 110 | 26 | 33 | 0 | 4 | 2 | 4 |
| <u>Echantillon C</u> | | | | | | | | | | | | |
| 1 | 35 | 11 | 14 | 140 | 9 | 8 | 2 | 21 | 3 | 2 | 2 | 2 |
| 2 | 14 | 17 | 23 | 17 | 0 | 2 | 5 | 11 | 5 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 2 | 17 | 23 | 17 | 0 | 13 | 2 | 7 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| 4 | 8 | - | 27 | 13 | 2 | - | 2 | 0 | 0 | - | 2 | 2 |
| 5 | 523 | 170 | 9 | 11 | 97 | 130 | 9 | 6 | 57 | 2 | 2 | 2 |
| 6 | 150 | 17 | 33 | 17 | 15 | 13 | 13 | 5 | 12 | 2 | 2 | 2 |
| 7 | 30 | 11 | 11 | 23 | 0 | 7 | 4 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| 8 | 24 | 17 | 17 | 22 | 10 | 5 | 2 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 |

Tableau 2. Table pour le calcul des tests NPP/100 ml dans l'eau côtière

| Nombre de tubes présentant une réaction positive, sur | | | Indice NPP pour 100 ml | Limites de confiance de 95% | | Nombre de tubes présentant une réaction positive, sur | | | Indice NPP pour 100 ml | Limites de confiance de 95% | |
|---|------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|------|---|------------------|--------------------|------------------------|-----------------------------|------|
| 5 de 10 ml chacun | 5 de 1 ml chacun | 5 de 0,1 ml chacun | | Inf. | Sup. | 5 de 10 ml chacun | 5 de 1 ml chacun | 5 de 0,1 ml chacun | | Inf. | Sup. |
| 0 | 0 | 0 | < 2 | | | 4 | 2 | 1 | 26 | 9 | 78 |
| 0 | 0 | 1 | 2 | < 0,5 | 7 | 4 | 3 | 0 | 27 | 9 | 80 |
| 0 | 1 | 0 | 2 | < 0,5 | 7 | 4 | 3 | 1 | 33 | 11 | 93 |
| 0 | 2 | 0 | 4 | < 0,5 | 11 | 4 | 4 | 0 | 34 | 12 | 93 |
| 1 | 0 | 0 | 2 | < 0,5 | 7 | 5 | 0 | 0 | 23 | 7 | 70 |
| 1 | 0 | 1 | 4 | < 0,5 | 11 | 5 | 0 | 1 | 31 | 11 | 89 |
| 1 | 1 | 0 | 4 | < 0,5 | 11 | 5 | 0 | 2 | 43 | 15 | 110 |
| 1 | 1 | 1 | 6 | < 0,5 | 15 | 5 | 1 | 0 | 33 | 11 | 93 |
| 1 | 2 | 0 | 6 | < 0,5 | 15 | 5 | 1 | 1 | 46 | 16 | 120 |
| | | | | | | 5 | 1 | 2 | 63 | 21 | 150 |
| 2 | 0 | 0 | 5 | < 0,5 | 13 | | | | | | |
| 2 | 0 | 1 | 7 | 1 | 17 | 5 | 2 | 0 | 49 | 17 | 130 |
| 2 | 1 | 0 | 7 | 1 | 17 | 5 | 2 | 1 | 70 | 23 | 170 |
| 2 | 1 | 1 | 9 | 2 | 21 | 5 | 2 | 2 | 94 | 28 | 220 |
| 2 | 2 | 0 | 9 | 2 | 21 | 5 | 3 | 0 | 79 | 25 | 190 |
| 2 | 3 | 0 | 12 | 3 | 28 | 5 | 3 | 1 | 110 | 31 | 250 |
| | | | | | | 5 | 3 | 2 | 140 | 37 | 340 |
| 3 | 0 | 0 | 8 | 1 | 19 | | | | | | |
| 3 | 0 | 1 | 11 | 2 | 25 | 5 | 3 | 3 | 180 | 44 | 500 |
| 3 | 1 | 0 | 11 | 2 | 25 | 5 | 4 | 0 | 130 | 35 | 300 |
| 3 | 1 | 1 | 14 | 4 | 34 | 5 | 4 | 1 | 170 | 43 | 490 |
| 3 | 2 | 0 | 14 | 4 | 34 | 5 | 4 | 2 | 220 | 57 | 700 |
| 3 | 2 | 1 | 17 | 5 | 46 | 5 | 4 | 3 | 280 | 90 | 850 |
| 3 | 3 | 0 | 17 | 5 | 46 | 5 | 4 | 4 | 350 | 120 | 1000 |
| 4 | 0 | 0 | 13 | 3 | 31 | | | | | | |
| 4 | 0 | 1 | 17 | 5 | 46 | 5 | 5 | 1 | 240 | 68 | 750 |
| 4 | 1 | 0 | 17 | 5 | 46 | 5 | 5 | 2 | 350 | 120 | 1000 |
| 4 | 1 | 1 | 21 | 7 | 63 | 5 | 5 | 3 | 540 | 180 | 1400 |
| 4 | 1 | 2 | 26 | 9 | 78 | 5 | 5 | 4 | 920 | 300 | 3200 |
| 4 | 2 | 0 | 22 | 7 | 67 | 5 | 5 | 5 | 1600 | 640 | 5800 |
| | | | | | | | | | ≥ 2400 | | |

Source : APHA-AWWA-WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. Treizième édition. Washington, D.C., 1971.

Formulaire 1

Exercice d'interétalonnage OMS/PNUE

Date :

RESULTATS
(NPP/100 ml)

Echantillon :

Groupe N° :

Participant N° : ...

| Etapas | Volumes | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Phase présomptive (bouillon lactosé) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Confirmation sur gélose "Endo" à 37 °C | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Confirmation sur bouillon vert brillant à 44 °C | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Confirmation indole/eau peptonée à 44 °C | | | | | | | | | | | | | | | | |

- a) NPP/100 ml des coliformes totaux : (formule des cultures positives)
 b) NPP/100 ml des coliformes fécaux : (formule des cultures positives)

Symboles à utiliser pour inscrire les résultats :

- o Croissance avec dégagement de gaz
- + Croissance (trouble) sans dégagement de gaz
- x Culture stérile (pas de trouble)
- Δ Culture indole positive
- Culture indole négative

Formulaire 2

Exercice d'interétalonnage OMS/PNUE

Date :

RESULTATS
(membranes filtrantes)

Echantillon :

Groupe N° :

Participant N° : ...

| Volume d'eau filtrée en ml | Dilutions utilisées | Nombre de colonies par membrane | | |
|--|---------------------|---------------------------------|-------------------|----------------------|
| | | Coliformes totaux | Coliformes fécaux | Streptocoques fécaux |
| 50 | 1 | | | |
| 20 | 1 | | | |
| 5 | 1 | | | |
| 20 | 10 ⁻¹ | | | |
| 5 | 10 ⁻¹ | | | |
| 20 | 10 ⁻² | | | |
| 5 | 10 ⁻² | | | |
| 20 | 10 ⁻³ | | | |
| 5 | 10 ⁻³ | | | |
| Concentration microbienne en colonies/100 ml | | | | |

Observations :

Formulaire 3

Exercice d'interétalonnage OMS/PNUE

Date :

RESULTATS
(NPP/100 ml)

Echantillon :

Groupe N° :

Participant N° : ...

| Etapas | Volumes | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------|----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Phase présomptive (milieu de Rothe) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Confirmation (milieu de Litsky) | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Confirmation gélose "Enterococcus agar" | | | | | | | | | | | | | | | | |

NPP/100 ml de streptocoques :

Formule des cultures positives :

Annexe 4

LISTE DES PARTICIPANTS

Représentants des laboratoires participant à l'exercice

- Mme D. Barbato
Societa Laziomare, Latina (Italie)
- Dr M. Belemlih
Institut agronomique et vétérinaire Hassan II, Laboratoire d'hygiène et industrie des denrées alimentaires d'origine animale, Rabat (Maroc)
- M. R. Ben Aissa
Institut Pasteur, Tunis (Tunisie)
- M. L. Ben Larbi
Laboratoire central, Tunis (Tunisie)
- Dr P. Bernard
INSERM, Contrôle et information de la pollution marine, Nice (France)
- Dr A. Boudabous
Laboratoire de microbiologie, Faculté des sciences de Tunis (Tunisie)
- Dr B. Carcassonne
Préfecture des Bouches-du-Rhône, Laboratoire départemental de santé publique, Marseille (France)
- Professeur A. Chadli
Institut Pasteur, Tunis (Tunisie)
- M. S. Fatnassi
Office du thermalisme, Tunis (Tunisie)
- M. A.H. Gharbi
Laboratoire régional, Nabeul (Tunisie)
- M. M. Hassine
Laboratoire de santé publique de Gabès (Tunisie)
- Dr A. Idrissi
Institut national d'hygiène, Rabat (Maroc)
- M. Jaaibi
Laboratoire de bactériologie alimentaire, Institut national de la nutrition, Tunis (Tunisie)
- M. M. Jabry
Laboratoire de contrôle de la qualité des eaux, Rabat (Maroc)
- Professeur S. Jekov
Institut Pasteur, Tunis (Tunisie)
- M. F. Khemiri
Institut Pasteur de Tunis (Tunisie)
- Dr N. Krstulovic
Institut de l'océanographie et des pêches, Split (Yougoslavie)
- M. B. Langar
Laboratoire d'hygiène de la ville de Tunis (Tunisie)
- Dr H. Louzir
Institut Pasteur, Tunis (Tunisie)

Mme D. Mazzarella
Societa Laziomare, Latina (Italie)

Mme J. Monteiro-Fevereiro
Département de contrôle de la pollution hydrique, Lisbonne (Portugal)

M. A. Nejjar
Centre international de génie sanitaire, Rabat (Maroc)

M. L. Razgallah
Institut national de la normalisation et de la propriété industrielle, Tunis (Tunisie)

Mme C. Skabic
Institut de protection sanitaire, Pula (Yougoslavie)

Mme M. Trad
Centre de recherche du génie rural, Laboratoire de microbiologie, Ariana (Tunisie)

Mme M.M. Valente
Département de contrôle de la pollution hydrique, Lisbonne (Portugal)

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

Bureau régional de l'Europe

Dr L. Saliba
Spécialiste scientifique principal, Plan d'action pour la Méditerranée, Athènes (Grèce)