UNEP WG.91

MERS REGIONALES

PROGRAMME DES NATIONS UNIES POUR L'ENVIRONNEMENT 31 Octobre 1983

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

METHODES DE REFERENCE POUR LES ETUDES DE POLLUTION MARINE

No. 3 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 l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Référence pour les études de pollution marine No. 3 Rev. 1, PNUE 1983.

MERS REGIONALES

PROGRAMME DES NATIONS UNIES POUR L'ENVIRONNEMENT 31 Octobre 1983

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

METHODES DE REFERENCE POUR LES ETUDES DE POLLUTION MARINE

No. 3 Rev. 1

*Préparé en coopération avec*

OMS

PNUE 1983

# 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 dévelopement 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 cetter 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 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 pout 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 etudes des mers regionales, No. 1.

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

SOMMAIRE


| | | Page |
|---|---|---|
| 1. | Portée et champs d'application | 1 |
| 2. | Références | 1 |
| 3. | Définition | 2 |
| 4. | Principes | 2 |
| 5. | Appareils et verrerie | 2 |
| 6. | Milieux de culture et produits chimiques | 5 |
| 7. | Prélèvement | 8 |
| 8. | Mode opératoire d'une analyse | 9 |
| 9. | Expression des résultats | 14 |
| 10. | Rapport d'analyse | 16 |

## 1. PORTEE ET CHAMP D'APPLICATION

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

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

Les coliformes fécaux présentent une corrélation positive hautement spécifique avec la contamination fécale engendrée par les animaux à sang chaud, et est donc un bon indicateur de la qualité sanitaire des eaux côtières. Puisque les coliformes fécaux meurent dans les heures qui viennent lorsqu'ils sont exposés aux rayonnements solaires à une température au-dessus de + 4°C en eau de mer, leur présence en mer n'indique qu'une contamination récente par des matières fécales. Leur taux de mortalité (T-90) dépend de la salinité, de la temperature, du rayonnement solaire, etc., et il doit être pris en considération lors de l'interprétation des résultats.

## 2. REFERENCES

APHA (1981) Standard methods for the examination of water and waste water. American Public Health Association, Washington D.C. (15th edition).

OMS/PNUE (1983) Réunion de travail sur les méthodes pour la surveillance de certains polluants dans les eaux d'effluents et dans les eaux balneaires. Rome 24-26 Novembre 1982. OMS Bureau Régional pour l'Europe. Copenhague.

PNUE/OMS (1983) Détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer par la méthode fermentative des tubes multiples (NPP). Méthodes de Référence pour les Etudes de Pollution Marine No. 22, PNUE, Genève.

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

## 3. DEFINITION

Les coliformes fécaux sont des bactéries Gram-négatives aerobies et anaerobies facultatives, en forme de bâtonnets, ne sporulant pas et fermentant le lactose en produisant du gaz lors en moins de 24 heures lors de leur croissance à 44,5°C. Ils produisent de l'indole en eau tryptonée sans tryptophane en culture à 44,5°C. D'après les conditions de culture décrites dans cette méthode de référence, les coliformes fécaux se développent sous forme de colonies bleues.

## 4. PRINCIPES

A partir d'échantillons d'eau de mer pris en conditions stériles, une série de dilutions est effectuée selon la quantité de coliformes fécaux estimée dans le prélèvement d'eau. Des quantités aliquotes de cette série de dilutions sont filtrées à travers des membranes filtrantes de porosité 0,45 u. Ces membranes de filtrations sont déposées à la surface de la Gélose m-FC coulée en boîtes de Petri et mises en cuture à 44,5 $\pm$ 0,2°C pendant 24 heures. La fermentation du lactose provoquera chez les colonies de coliformes fécaux l'apparition d'une couleur caractéristique bleue.

Le chlore résiduel, si présent, peut être neutralisé par ajout de thiosulfate dans la flacon de prélèvement avant l'autoclavage.

On peut rechercher chez les colonies suspectes et douteuses l'apparition d'acide et de gaz en utilisant un test confirmatif: le test du Bouillon de MacConkey ou bien le test du Bouillon au Vert Brillant. Dans les zones où les usines rejettent des polysaccharides (papetteries, usines de betteraves à sucre, etc.) des tests confirmatifs par la recherche de l'indole peuvent être nécessaires.

## 5. APPAREILS ET VERRERIE

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

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

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

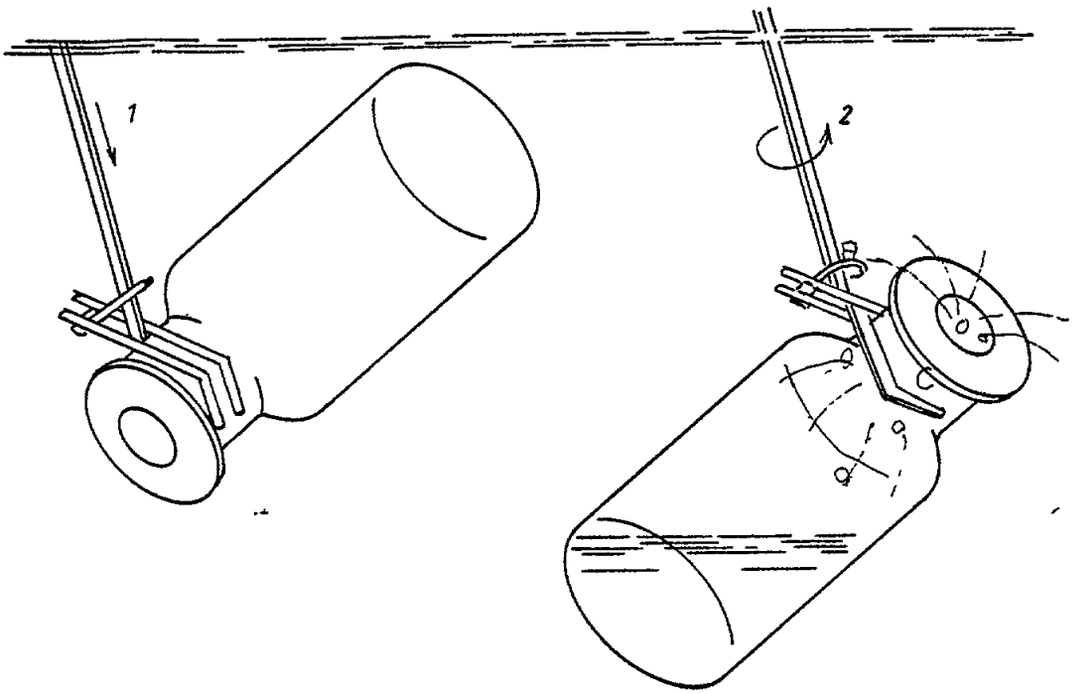



FIGURE 1 : PRELEVEMENT EN SURFACE AU MOYEN D'UN BRAS EXTENSEUR

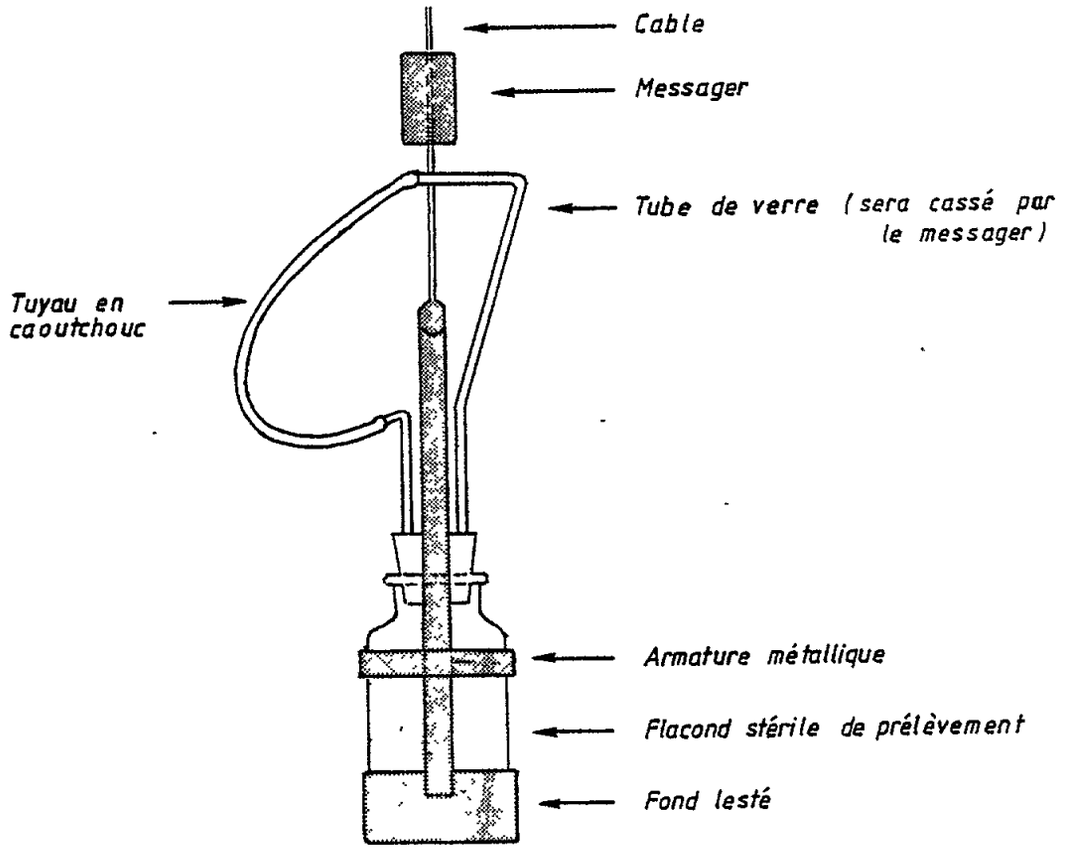



FIGURE 2 : FLACON POUR LES PRELEVEMENTS STERILES AU-DESSOUS DE LA SURFACE

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

5.5 Thermomètre gradué de 0 à 50°C ayant une précision de ± 1°C, de préférence incassable (plastique), à utiliser pour noter la température dans les malettes (5.4).

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

5.7 Etuve humide à 44,5 ± 0,2°C.

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

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

5.10 Stérilisateur à vapeurs sèches à 160°C.

5.11 pHmètre, précision ± 0,1 unité pH.

5.12 Pinces en acier inoxydable.

5.13 Balance de précision à ± 1 mg.

5.14 Réfrigérateur à 4 ± 0,5°C.

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

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

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

5.18 Tubes de culture de bactériologie en verre borosilicaté.

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

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

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

5.21 Petits tubes, 6 x 50 mm, en verre borosilicaté ("tubes de Durham") servant à être mis en position renversée dans certains tubes de culture.

5.21 Petits tubes, 6 x 50 mm, en verre borosilicaté ("tubes de Durham") servant à être mis en position renversée dans certains tubes de culture.

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

5.23 Papier épais d'emballage.

5.24 Papier d'aluminium (qualité ménage).

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

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

5.26 Boîtes métalliques étanches appropriées à l'incubation des boîtes de Petri dans le bain-marie (5.7).

5.27 Papier filtre.

5.28 Bain-marie à 44,5 $\pm$ 0,2°C.

## 6. MILIEUX DE CULTURE ET PRODUITS CHIMIQUES

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

### 6.1 Gélose m-FC (m-FC Agar)

| | |
|---|---|
| Tryptose | 10,0 g |
| Protéose peptone no. 3 | 5,0 g |
| Extrait de levures | 3,0 g |
| NaCl | 5,0 g |
| Lactose | 12,5 g |
| Sels biliaires no. 3 | 1,5 g |
| Bleu d'aniline | 0,1 g |
| Agar | 15,0 g |
| Eau distillée (6.7) | 1.0 litre |

Préparation: Dissoudre les ingrédients de cette gélose dans 1 litre d'eau distillée (6.7). Chauffer et faire bouillir jusqu'à ce que les divers composés soient complètement dissous. Ajouter 10 ml d'une solution d'acide rosalique à 1 pour cent (6.1.2), laisser bouillir un peu plus d'une minute et laisser

refroidir. La préparation achevée doit avoir un pH de 7,4 ± 0,1; si nécessaire, ajuster le pH avec de l'HCl dilué de grande pureté. Laisser refroidir jusqu'à 45°C et verser 4 à 5 ml chaque boîte de Petri. Dès que la gélose s'est solidifiée dans les boîtes, retourner les boîtes de Petri et les stocker au réfrigérateur. Les boîtes préparées avec ce milieu peuvent être conservées 7 jours au réfrigérateur.

REMARQUE: L'addition d'acide rosalique est facultative mais elle doit être faite, si nécessaire, de manière à éviter la prolifération de coliformes non fécaux.

REMARQUE: Ne pas autoclaver ce milieu.

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

6.1.2 Acide rosalique

Préparer une petite quantité de solution d'acide rosalique en faisant une solution à 1 pour cent d'acide rosalique dans du NaOH à 0,2 N.

REMARQUE: L'acide rosalique (initialement sous forme de poudre) doit être mis en solution juste avant son addition à la gélose. La solution d'acide rosalique ne doit pas être autoclavée.

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 dilué, puis ajouter la solution de pourpre de bromocrésol (6.2.2). Dans chaque tube de culture propre (5.18, 8.1), introduire un petit tube de Durham en position renversée (5.21) et une quantité de bouillon de MacConkey de manière à recouvrir au moins partriellement le tube de Durham lequel piège une grosse bulle d'air qui disparaitra lors de l'autoclavage. Obturer les tubes de culture avec un bouchon de coton. Autoclaver les tubes de culture à 121°C pendant 15 minutes.

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 les ingrédients en remuant. Dans chaque tube de culture propre (5.18, 8.1) introduire un petit tube de Durham (5.21) 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 de coliforme de collection (6.10).

6.4 Solutions pour la recherche de l'Indole

6.4.1 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 5 ml dans chaque tube de test (5.18) et autoclaver (5.9) à 121°C pendant 15 minutes. Le pH final devrait être de l'ordre de 7,0 à 7,4. Si nécessaire, réajuster le pH avec du NaOH dilué avant la stérilisation.

6.4.2 Réactif de Kovac pour la recherche de l'Indole

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

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

6.5 Tampon Phosphate (pH = 7,2)

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

6.5.1 Tampon Phosphate pour filtrations

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

6.5.2 Tampon Phosphate pour dilutions

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

6.6 Solution de thiosulfate

Préparation: Préparer une solution de thiosulfate de sodium à 10% avec de l'eau disitillée (6.7), (pour stériliser la solution préparée, filtrez-la à travers une membrane filtrante stérile (8.2.4, 8.2.5)).

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, fair 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).

7.1 Prélèvement en surface

Attacher un flacon (bocal ou bouteille) de prélèvement (8.2.1) propre et stérilisé à la barre de prélèvement (5.2) (bras extenseur). Oter le bouchon sans toucher avec les mains le col du flacon. Immerger le flacon à l'avant du

bateau ou du côté du vent lorsque le bateau avance lentement. Pousser le flacon à l'aide du bras extenseur à 25 cm sous la surface de l'eau, le flacon étant renversé verticalement de manière à éviter les contaminations dûes à la surface de l'eau. Retourner alors le bocal de prélèvement et recueillir l'échantillon d'eau (figure 1). Pour prélever, on peut aussi immerger à la main le flacon.

Retirer le flacon et jeter un peu d'eau, si nécessaire, de manière à ce qu'il reste un peu d'air dans le flacon fermé. Ce volume d'air est nécessaire pour pouvoir homogénéiser l'eau prélevée lors de sa réception au laboratoire. Replacer le bouchon et conserver les flacons dans une mallette isothermique propre (5.4) contenant des sachets réfrigérants, à environ 4°C, en évitant une exposition à plus de 10°C. Les flacons de prélèvement seront séparés les uns des autres par du papier d'emballage propre (5.23) de manière à éviter la casse. Noter la température à l'aide d'un thermomètre (5.5) toutes les trois heures. Noter les anomalies dans le rapport d'analyse. Etiqueter les flacons de prélèvement en indiquant la station de prélèvement, la durée de prélèvement et les autres paramètres relatifs à l'interprétation des résultats.

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

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

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

## 8. MODE OPERATOIRE D'UNE ANALYSE

### 8.1 Lavage de la verrerie et des instruments

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

### 8.2 Stérilisation de la verrerie et des instruments

8.2.1 Flacons d'echantillon pour la surface (5.1). Sécher et stériliser des flacons de prélèvement propres (8.1) au stérilisateur à vapeurs sèches (5.10) pendant trois heures à 160°C. Avant la stérilisation, placer un morceau

de papier filtre (5.26) dans le col de la bouteille de manière à ce que le bouchon ne se coince pas lors du refroidissement. Après refroidissement et lorsque le stérilisateur a atteint la température ambiante, ôter les morceaux de papier filtre avec une pince stérile (8.2.6) et replacer le bouchon sur le col du flacon de prélèvement. Placer les flacons dans les mallettes isothermes nettoyées (5.4). Séparer les flacons les uns des autres avec du papier filtre ou du papier d'emballage propre (5.23) de manière à éviter la casse.

REMARQUE: Si des résidus chlorés sont suspectés dans l'eau échantillonnée, ajouter, aseptiquement, 0,1 ml d'une solution de thiosulfate à 10 pour cent (6.6) par 100 ml d'eau échantillonnée dans les flacons de prélèvement et ceci avant stérilisation. Cette quantité est suffisante pour neutraliser environ 15 mg de chlore résiduel par litre.

8.2.2 Prélèvement au-dessous de la surface (5.3). Nettoyer le flacon pour le prélèvement en profondeur (8.1) avec un détergent (6.7), rincer à l'eau du robinet puis à l'eau distillée (6.5). Envelopper chaque flacon dans du papier d'emballage épais (5.23) ou dans du papier d'aluminium (5.24) et stériliser à autoclave (5.9) 15 minutes à 121°C.

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

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

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

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

REMARQUE: Des membranes filtrantes pré-stérilisées sont commercialisées.

8.2.6 Pinces (5.12). Stériliser les pinces en les trempant dans de l'alcool éthylique (éthanol) à 95 pour cent (6.9) puis les flamber de suite.

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

Les membranes filtrantes devraient présenter idéalement entre 20 et 80 colonies après leur incubation. Si des expériences antérieures pour déterminer

le type de dilution en eau de mer non polluée ne sont pas disponibles, filtrer les volumes suivants pour l'eau de mer non diluée: 100 ml, 10 ml, 1 ml et 0,1 ml (figure 3). Pour les eaux polluées, les dilutions doivent être plus élevées.

8.4 Préparation des séries de dilution

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

Préparer les séries de dilution en prélevant 1 ml d'eau à analyser avec une pipette stérilisée (8.2.3) (figure 3, dilution: D-0) après avoir vigoureusement agité l'échantillon (7) et verser ce 1 ml dans un tube de culture propre et stérilisé (6.5.2) de manière à obtenir 10 ml correspondant à la première dilution (D-1). Agiter le tube à l'aide d'un agitateur électrique (5.15) ou en le tournant par rotation du poignet. Poursuivre la suite de la série de dilutions en prélevant 1 ml de la première dilution (D-1) et en plaçant ce ml dans 9 ml de tampon phosphate (6.5.2) et en agitant de manière à obtenir la deuxième dilution (D-2), etc.

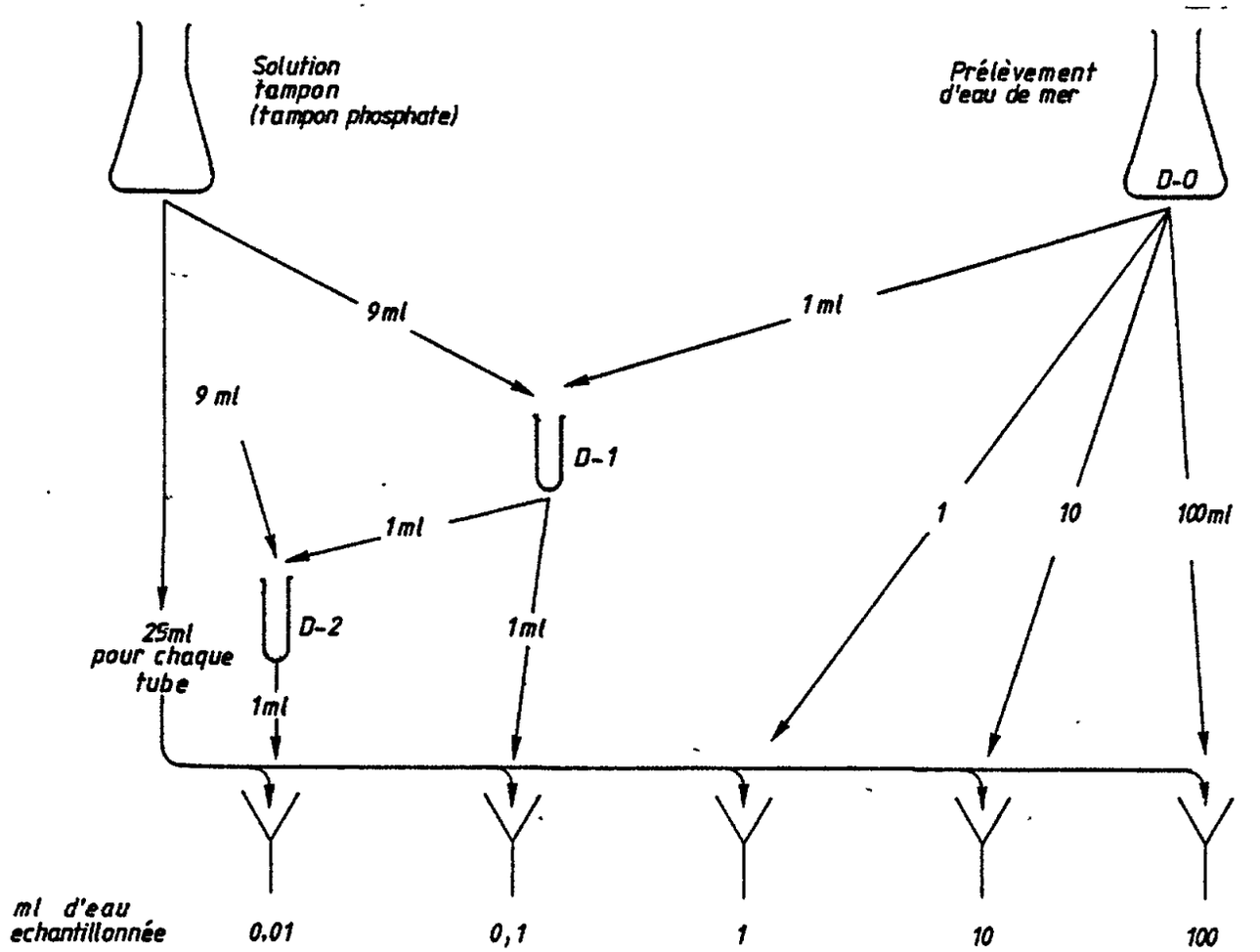



FIGURE 3 : SCHEMA DE LA PREPARATION D'UNE SERIE DE DILUTION ET SCHEMA DE FILTRATION

8.5 Filtration

Commencer par filtrer la dilution la plus élevée (c'est-à-dire D-2), afin d'éviter des contaminations. Utiliser un réservoir de filtration stérilisé (8.2.4) pour chaque série de dilutions. Placer une membrane filtrante, stérilisée (8.2.5) avec une pince stérilisée à la flamme (8.2.6), sur le plateau poreux de la rampe de filtration (8.2.4). Déposer soigneusement le réservoir sur le réceptacle (le visser éventuellement). Verser dans le réservoir 20 ml environ de tampon phosphate stérile (6.5.1). A l'aide d'une pipette stérile (8.2.3), verser 1 ml de la dilution la plus élevée (ici D-2) dans la solution tampon contenue dans le réservoir. Filtrer sous vide partiel par trompe à vide ou moteur électrique. Rincer le réservoir deux ou trois fois avec la solution tampon (6.5.1) puis filtrer de nouveau. Débloquer (ou dévisser) le réservoir, retirer immédiatement la membrane filtrante avec les pinces stérilisées à la flamme (8.2.6) et placer cette membrane sur la gélose coulée dans la boîte de Pétri (6.1.1), ceci avec un mouvement tournant de manière à éviter la formation de bulles d'air entre la membrane et la gélose. Avant de filtrer la dilution suivante (D-1) par une opération semblable, filtrer 20 ml de solution tampon (6.4.1) à travers l'unité de filtration.

8.6 Incubation

Les boîtes de Petri contenant les membranes filtrantes sur la gélose (8.5) sont fermées et placées horizontalement à l'intérieur de boîtes métalliques propres. Les boîtes de métal sont alors placées au bain-marie (5.7) et incubées immédiatement à 44,5 $\pm$ 0,2°C pendant 24 heures. Effectuer un test de stérilité en incubant également un témoin (sans membrane de filtration); c'est-à-dire une boîte de Petri ne contenant que la gélose (6.1).

REMARQUE: Les boîtes métalliques doivent être suffisament lestées pour les empêcher de flotter.

8.7 Interprétation

Ne compter, avec un microscope stéréoscopique ou un appareil similaire (5.8), que les colonies qui se présentent sous forme de points roses à rouge foncé avec des reflets métalliques (modorés) et dont la taille varie d'une tête épingle à celle d'une colonie bien formée. Si le nombre des colonies douteuses est plus gand que 10 pour cent du total des colonies présentes sur la membrane, tester les colonies douteuses soit par le test de bouillon de MacConkey (8.9.1), soit par le test du bouillon au Vert Brillant Bilié (8.9.2).

Dans les zones où les usines déversent des polysaccharides (usines de pâte à papier, usines de traitement de la betterave à sucre, etc.) il est nécessaire d'effectuer des tests confirmatifs en recherchant la production d'indole (8.9.3).

REMARQUE: Les colonies formées par les coliformes fécaux sont bleues. Les colonies de coliformes non fécaux sont grises ou de couleur crème. Les couleurs sur la membrane de filtration peuvent varier du jaune crème au bleu

pâle selon la fraîcheur de l'acide rosalique. Normalement, très peu de colonies de coliformes non fécaux se développeront sur la gélose m-FC et ceci à cause de l'action sélective de la température élevée d'une part, et d'autre part à cause des sels sélectifs de l'acide rosalique.

8.8 Estimation de la précision

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

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

Calculer la concentration totale de coliformes totaux de l'échantillon d'origine (prélèvement non dilué) pour chacune des membranes, selon le paragraphe 9.3 et noter le résultat dans le rapport d'analyse (alinéa 10 dans le tableau 2).

Pour chaque dilution dont chacune des trois membranes présente un dénombrement compris entre 20 et 200 colonies de coliformes fécaux, calculer: la moyenne, la valeur maximale et la valeur minimale, la déviation standard et le coefficient de variation. Noter ces résultats dans le rapport d'analyse (alinéa 11 dans le tableau 2).

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

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

8.9 Tests confirmatifs

8.9.1 Test du bouillon de MacConkey: A l'aide d'une anse bactériologique flambée (5.22), transférer une colonie suspecte de la membrane filtrante au tube de culture contenant le bouillon de MacConkey (6.2.1) et mettre en culture à 44,5 $\pm$ 0,2°C pendant 48 heures. Les coliformes dégageront du gaz qui sera piégé sous forme d'une grosse bulle dans les flacons de Durham et l'acide produit fera virer la couleur du bouillon: initiallement violet brun, il deviendra jaunâtre et trouble.

8.9.2 Test du bouillon au Vert Brillant Bilié: A l'aide d'une anse bactériologique flambée (5.22), transférer une colonie suspecte de la membrane filtrante au tube de culture contenant le bouillon de Vert Brillant Bilié (6.3) et mettre en culture à 44,5 ± 0,2°C pendant 48 heures. Les coliformes dégageront du gaz qui sera piégé dans les tubes de Durham.

REMARQUE: Le test du bouillon de MacConkey à la même valeur que le test du bouillon du Vert Brillant Bilié. L'un ou l'autre peut être utilisé comme test confirmatif.

8.9.3 Test de la recherche de l'indole.

A l'aide d'une anse flambée de bactériologie (5.22), transférer une colonie suspecte dans un tube contenant de l'eau tryptonée et incuber à 44,5 ± 0,2°C dans un bain-marie (5.28) pendant 24 heures. Puis ajouter 0,2 à 0,3 ml de réactif de Kovac (6.4.2) pour rechercher l'indole et agiter. Laisser le tube reposer en position verticale pendant 10 minutes et noter le résultat.

Le test de l'indole est positif lorsqu'apparaît un anneau rouge foncé à la surface de l'amyl alcool; dans le cas contraire, le test est négatif. Une couleur orangée indique probablement la présence de skatole et peut être considérée comme une réaction positive.

## 9. EXPRESSION DES RESULTATS

9.1 Compter le nombre de colonies de coliformes sur chaque membrane après complète incubation et après rectifications par les tests complémentaires, si nécessaire. Ne prendre en considération que les membranes présentant entre 20 et 200 colonies (total des colonies incluant coliformes et non coliformes).

Indiquer les résultats obtenus pour chacun des filtres dans le rapport d'analyse (tableau 1, alinéa 9).

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

$$\text{Coliformes fécaux/100 ml d'eau récoltée: } \frac{\text{Nombre corrigé de colonies fécaux de coliformes}}{\text{ml d'eau échantillonnée et filtrée}} \times 100$$

Indiquer dans le rapport d'analyse (tableau 1, alinéa 10) les résultats obtenus séparément pour chaque dilution. Reporter aussi les résultats obtenus

sur membrane lorsqu'il y a moins de 20 colonies par membrane. S'il n'y a aucun coliforme dans 100 ml d'eau, donner comme réponse "< 1 coliforme pour 100 ml".

9.3 Calculer le nombre de coliformes fécaux pour 100 ml d'eau récoltée et le reporter en tant que résultat final (tableau 1, alinéa 11). S'il y a des membranes contenant entre 20 et 200 colonies caractéristiques dans deux dilutions successives, calculer la moyenne sur ces deux dilutions et notez-la sur le rapport final.

9.4 Relever dans le rapport d'analyse (tableau 1, alinéa 12) les anomalies observées lors des différentes phases de l'analyse (croissance confluente de colonies, variations de température lors du stockage ou de l'incubation, etc.).

## 10. RAPPORT D'ANALYSE

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

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

1. Zone de prélèvement

   1.1 pays: _____ 1.2 zone: _____

2. Point de prélèvement (station)

   2.1 numéro de code: _____ 2.2 longitude: _____

   2.3 latitude: _____

3. Date du prélèvement

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

   3.4 année: _____

4. Prélèvement et paramètres divers

   4.1 profondeur du prélèvement: _____ 4.2 flacon no: _____

   4.3 température au point de prélèvement : _____

   4.4 salinité au point de prélevement: _____

   4.5 durée du stockage: _____

   4.6 Se reporter à la rubrique 12 pour les autres facteurs pouvant influencer sur les résultats.

5. Date de la filtration

   5.1 heure: _____ 5.2 jour: _____

6. Début de l'incubation

   6.1 heure: _____ 6.2 jour: _____

7. Fin de l'incubation

   7.1 heure: _____ 7.2 jour: _____

8. Tests de confirmatifs effectués

8.1 MacConkey: _____ 8.2 Vert Brillant: _____

9. Nombre de colonies pour chaque filtre

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

10. Nombre de coliformes fécaux/100 ml d'eau prélevée

| dilutions | n/100 ml |
|---|---|
| _____ | _____ |
| _____ | _____ |
| _____ | _____ |
| _____ | _____ |

11. Résultat de l'analyse: _____ coliformes fécaux/100 ml d'eau

12. Anomalies observées durant les travaux:

_____

_____

_____

_____

_____

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

_____

_____

_____

_____

_____

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

_____

_____

Date: _____

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

1. Zone de récolte

   1.1 pays: _____ 1.2 zone: _____

2. Point de prélèvement (station)

   2.1 numéro de code: _____ 2.2 longitude: _____

   2.3 latitude: _____

3. Date de prélèvement

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

   3.4 année: _____

4. Prélèvement et autres paramètres

   4.1 profondeur du prélèvement: _____ 4.2 flacon no: _____

   4.3 température: _____ 4.4 salinité: _____

   4.5 durée du stockage: _____

   4.6 Se reporter à la rubrique 12 pour les autres facteurs pouvant influencer sur les résultats.

5. Date de filtration

   5.1 heure: _____ 5.2 jour: _____

6. Début de l'incubation

   6.1 heure: _____ 6.2 jour: _____

7. Fin de l'incubation

   7.1 heure: _____ 7.2 jour: _____

8. Tests confirmatifs effectués

   8.1 MacConkey: _____ 8.2 Vert Brillant: _____

9. Nombre de colonies pour chaque filtre

| dilution | ml de l'échantillon original filtré | Nombre de colonies de coliformes fécaux dans trois dilutions identiques | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 1ère membrane | 2ème membrane | 3ème membrane |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |
| | | | | |

10. Nombre de coliformes fécaux dans 100 ml

| dilutions | n/100 ml |
|---|---|
| | |
| | |
| | |
| | |
| | |

11. Résultats de l'analyse (coliformes fécaux/100 ml d'eau récoltée)

| moyenne | dénombrement le plus petit au plus grand | déviation standard | coefficient de variation en % |
|---|---|---|---|
| | | | |

12. Anomalies observées durant les travaux:

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

_____

_____

_____

_____

_____

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

_____

_____

Date: _____

LIST OF REFERENCE METHODS FOR MARINE POLLUTION STUDIES

LISTE DES METHODES DE REFERENCE POUR LES ETUDES DE POLLUTION MARINE

UNEP/WHO : Guidelines for monitoring the quality of coastal recreational waters. (Draft) Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 1, UNEP 1982.

UNEP/WHO : Determination of total coliforms in sea-water by the membrane filtration culture method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 2 Rev. 1, UNEP 1983.

PNUE/OMS : Détermination des coliformes totaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Références pour les études de pollution marine No. 2 Rev. 1, PNUE 1983.

UNEP/WHO : Determination of faecal coliforms in sea-water by the membrane filtration culture method. Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 3 Rev. 1, UNEP 1983.

PNUE/OMS : Détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer par la méthode de culture sur membranes filtrantes. Méthodes de Références pour les études de pollution marine No. 3 Rev. 1, PNUE 1983.

UNEP/WHO : Determination of faecal streptococci in sea-water by the membrane filtration cultrue 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.

UENP/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 prepartion)

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 $BOD_5$ and COD in estuarine waters. (in preparation)

UNEP/UNESCO : Determination of total cadmium in estuarine waters and suspended matter. (in preparation)

UNEP/IOC : Determination of basic oceanographic and meteorological conditions. (in preparation)

UNEP/IOC : Determination of standard physical and chemical parameters. (in preparation)

UNEP/WHO : Statistical methods for the evaluation of results from monitoring the quality of coastal recreational and shellfish-growing waters. (in preparation)

UNEP/WMO : Sampling of aerosols and wet precipitation for analysis of chemical pollutants. (in preparation)

UNEP/IAEA : Determination of selected trace metals in aerosols and in wet precipitation. (in preparation)

UNEP/IAEA : Determination of halogenated hydrocarbons in aerosols and in wet precipitation. (in preparation)

UNEP/WMO : Sampling of dry deposition. (in preparation)

UNEP/IAEA : Determination of total mercury in marine sediments by flameless atomic absorption spectrophotometry. (in preparation)

UNEP/IAEA : Determination of total cadmium in marine sediments by flameless absorption spectrophotometry. (in preparation)

Publié et imprimé par:

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

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

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