

BAIGNADES ET RISQUES INFECTIEUX

DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES - FONDEMENTS DU CONTROLE DES EAUX

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

PAR

CATHERINE OGER, JEAN-FRANCOIS HERNANDEZ, ERIC OUDART, JEAN-MARIE DELATTRE

SERVICE DES EAUX

INSTITUT PASTEUR DE LILLE
369 rue Jules Guesde
59650 VILLENEUVE D'ASCQ

JUIN 1983

AVANT-PROPOS

Cette étude a été réalisée à la demande de l'Agence Financière de Bassin Nord / Artois - Picardie. Le Littoral de la Région Nord de la France est en effet d'une qualité stable mais médiocre au regard des normes réglementaires de qualité microbiologique des plages. Et sans que cela retarde les actions d'amélioration par l'assainissement, il était logique de faire le point des connaissances sur l'impact possible sur la santé.

Cette étude est une synthèse bibliographique et non le compte rendu d'une enquête régionale sur la santé des baigneurs. Centrée au départ sur les baignades en mer, elle a été étendue aux baignades en milieu ouvert d'eaux douces, mais reste limitée aux régions tempérées. Elle n'aborde donc pas les questions liées aux baignades en piscines, au contact avec les eaux usées ou avec les eaux tropicales.

Par ailleurs elle est limitée aux aspects liés à la pollution des eaux et notamment aux problèmes infectieux. Elle n'aborde pas les aspects physiologiques (hydrocution, ...), allergiques (méduses, eaux rouges...).

Enfin, le bien-fondé du classement sanitaire des zones de baignade tient autant au niveau des normes et aux méthodes imposées pour le contrôle qu'à la définition des paramètres du risque sanitaire. Ces aspects ont paru indissociables des données de l'épidémiologie, d'où les deux premiers chapitres sur les indicateurs de risque, leur mesure, et la réglementation.

SOMMAIRE

	PAGES
CHAPITRE I LE SUPPORT BACTERIOLOGIQUE DES NORMES	3
A <u>LES GERMES INDICATEURS</u>	4
. Introduction - les flores fécales	4
. 1 <u>Escherichia coli</u> et les coliformes	7
. 2 les streptocoques	12
. 3 <u>Clostridium</u>	16
. 4 autres anaérobies	19
. 5 bactériophages	20
B <u>LES GERMES INDIQUES</u>	23
C <u>LES NON-INDIQUES</u>	25
CHAPITRE II LES NORMES EN VIGUEUR ET LES METHODES DE MESURES PRECONISEES	27
A <u>NORMES EN VIGUEUR</u>	28
B <u>ANALYSE CRITIQUE DES NORMES</u>	33
1 Harmonisation internationale	33
2 Représentativité de l'échantillonnage et interprétation des résultats	34
C <u>METHODES DE MESURES : FILTRATION OU NPP ?</u>	37
1 Filtration	37
2 NPP	38
3 Critiques	39
4 Coliformes	41
5 Streptocoques	53
CHAPITRE III L'EPIDEMIOLOGIE, UN NOUVEAU SUPPORT POUR LES NORMES	57
A <u>EPIDEMIES REPERTORIEES ET ENQUETES RETROSPECTIVES</u>	59
B <u>ENQUETES PROSPECTIVES (EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE)</u>	62
1 Enquêtes avant 1973	62
2 Enquêtes après 1973 - Conduite des enquêtes	63
3 Analyse des données	65
4 Résultats : New York	65
5 Alexandrie	69
6 Pontchartrain	70
7 Boston	71
8 Keystone	71
9 Espagne	72
10 France	72
C <u>CRITIQUES SUR L'EPIDEMIOLOGIE : Avant 1973</u>	73
Après 1973	74
CONCLUSION GENERALE	80
BIBLIOGRAPHIE	84

CHAPITRE I

LE SUPPORT BACTERIOLOGIQUE DES NORMES

A LES GERMES INDICATEURS

Au début du siècle, après les grandes épidémies d'origine hydrique, le contrôle de l'eau s'est organisé puis intensifié. Les principales maladies d'origine hydrique étant la conséquence de la contamination fécale de l'eau par l'homme ou l'animal, c'est donc cette contamination fécale que l'on essaya de mettre en évidence. La composition des flores fécales est rapportée dans les tableaux 1 à 4.

Les germes pathogènes eux-mêmes (Salmonella, Shigella, virus..) ne pouvant, à l'époque, être recherchés par des techniques simples et fiables, ce sont des "indicateurs" de ces pathogènes, germes toujours présents et en grand nombre dans les matières fécales, qui en seront les témoins.

Dès 1945, on les appelle indicateurs de santé ou de qualité et ce sont :

- Escherichia coli
- Streptococcus faecalis
- Clostridium perfringens

Peu à peu cependant, la recherche de ces 3 espèces bien définies va se transformer en la recherche de trois groupes :

- Escherichia coli deviendra Coliformes totaux puis fécaux
- Streptococcus faecalis deviendra Entérocoques puis Streptocoques fécaux
- Clostridium perfringens deviendra Sulfito-réducteurs puis spores d'anaérobies sulfito-réducteurs

La plupart du temps ce changement se fera à l'occasion de la mise au point ou du "lancement" d'un nouveau milieu de culture, d'une nouvelle technique plus rapides toujours, moins chers souvent !

TABLEAU 1

Composition microbiologique de la flore fécale humaine.
Données de Rosebury revues par Geldreich, 1978 (A)

Species or Group	Occurrence (%)	Density Range per gram
Aerobic Bacteria		
Cocci (gram positive)		
<i>Staphylococcus</i> , coagulase (-)	31-59	10^2 - 10^4
<i>Staphylococcus</i> , coagulase (+)	10-93	-
<i>Streptococcus salivarius</i>	0-16	<1 - 10^5
<i>Streptococcus bovis</i>	none	<1
<i>Streptococcus equinus</i>	0-0.6	<1 - 10^4
<i>Streptococcus faecalis</i> var. <i>liquefaciens</i>	26	10^4 - 10^5
Enterococcus	74-76	10^5 - 10^6
Fecal streptococcus	100	10^5 - 10^6
Bacilli (gram positive)		
Aerobic Corynebacteria	6-21	-
<i>Mycobacterium</i> (acid fast)	43	5-60
Bacilli (gram negative)		
Total coliforms	87-100	10^7 - 10^9
<i>Escherchia coli</i>	87-100	10^7 - 10^9
Intermediate coliform types	0-72	<1 - 10^6
<i>Enterobacter-Klebsiella</i> strains	0-98	<1 - 10^9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	26-30	10^6 - 10^8
Fecal coliforms	96-100	10^6 - 10^9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3-15	10^3 - 10^5
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0.2-0.7	-
<i>Alcaligenes fecalis</i>	0-2	-
<i>Proteus mirabilis</i>	5-53	10^6
Anaerobic Bacteria (or microaerophilic)		
Bacilli (gram positive)		
<i>Bifidobacterium</i> (<i>Lactobacillus</i>)		
<i>bifidus</i>	-	10^8 - 10^9
<i>Clostridium perfringens</i>	13-35	10^6 - 10^7
<i>Clostridium tetani</i>	1-35	-
<i>Lactobacilli</i>	66	10^7 - 10^{10}
<i>Actinomyces bifidus</i>	15-90	10^7 - 10^{11}
Bacilli (gram negative)		
<i>Bacteroides fragilis</i>	100	10^7 - 10^{10}
Spirillum		
<i>Borrelia refringes</i> and <i>Treponema dentium</i>	18-28	-
Enteroviruses^b		
Polioviruses 1,3	0-70	0 - 10^7 (PFU)
Coxsackievirus	0-88	-
Echovirus	0-43	0 - 10^8 (PFU)
Adenovirus	0-77	-
Fungi		
<i>Candida albicans</i>	14-31	<1 - 10^4
<i>Candida</i> species	1-12	-
Protozoa		
<i>Entamoeba coli</i>	3-32	-
<i>Endolimax nana</i>	9-16	-
<i>Dientamoeba fragilis</i>	0.2-6	-
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1.4-5	-
<i>Trichomonas hominis</i>	0.3-4	-
<i>Giardia lamblia</i>	3-15	-
<i>Chilomastix mesnili</i>	0.4-6	-
<i>Enteromonas hominis</i>	0.1-3	-
<i>Retortomonas intestinalis</i>	0.1-1.3	-

^aData expanded and revised from Rosebury.

^bSeasonal viral occurrences primarily in young children.

Flore fécale humaine (30 adultes). Données qualitatives et quantitatives.
D'après Leclerc et al 1977 (B)

Species or Genus	Number of Positive		Frequency
	Samples / 30	Presence, %	
Aerobic bacteria gram-negative			
<i>Escherichia coli</i>	30	100	constant
<i>Citrobacter-Levinea</i>	20	66	high
<i>Klebsiella</i>	15	50	medium
<i>Enterobacter</i>	3	10	rare
Aerobic bacteria gram-positive			
<i>Staphylococcus</i>	15	50	medium
<i>Enterococcus</i>	30	100	constant
<i>Bacillus</i>	28	93	constant
Anaerobic bacteria gram-negative			
<i>Lactobacillus</i>	30	100	constant
<i>Bacteroides</i>	30	100	constant
Anaerobic bacteria gram-positive			
<i>Clostridium</i>	23	76	high
Yeasts	20	66	high
Moulds	16	53	medium

Species	Average cfu/g ^a	Number of Samples Where the Species is Found / 30
Total bacteria	1.5 × 10 ¹¹	24
Total aerobic bacteria	7 × 10 ⁸	30
Aerobic bacteria gram-negative		
<i>E. coli</i>	4 × 10 ⁸	30
<i>Citrobacter-Levinea</i>	1 × 10 ⁸	20
<i>Klebsiella</i>	5 × 10 ⁷	14
<i>Enterobacter</i>	1 × 10 ⁷	3
Aerobic bacteria gram-positive		
<i>Enterococcus</i>	2 × 10 ⁸	30
<i>Staphylococcus</i>	8 × 10 ⁷	15
<i>Bacillus</i>	3 × 10 ⁷	28
Anaerobic bacteria gram-negative		
<i>Bacteroides</i>	1 × 10 ¹⁰	30
<i>Lactobacillus</i>	1 × 10 ⁹	30
Anaerobic bacteria gram-positive		
<i>Clostridium</i>	4 × 10 ⁸	23
Yeasts	5 × 10 ⁷	20
Moulds	4 × 10 ⁷	16

^acfu = colony forming units.

TABLEAU 4

Composition microbiologique de la flore fécale animale. Geldreich 1978 (A)

Animal Group	Fecal	Fecal	<i>C. perfringens</i>	<i>Bacteroides</i>	Lactobacilli
	Coliforms	Streptococci			
(Average Density per Gram)					
Farm Animals					
Cow	230,000	1,300,000	200	<1	250
Pig	3,300,000	84,000,000	3,980	500,000	251,000,000
Sheep	16,000,000	38,000,000	199,000	<1	79,000
Horse	12,600	6,300,000	<1	<1	10,000,000
Duck	33,000,000	54,000,000	-	-	-
Chicken	1,300,000	3,400,000	250	<1	316,000,000
Turkey	290,000	2,800,000	-	-	-
Animal Pets					
Cat	7,900,000	27,000,000	25,100,000	795,000,000	630,000,000
Dog	23,000,000	980,000,000	251,000,000	500,000,000	39,600
Wild Animals					
Mice	330,000	7,700,000	<1	795,000,000	1,260,000,000
Rabbits	20	47,000	<1	396,000,000	<1
Chipmunk	148,000	6,000,000	-	-	-
Human	13,000,000	3,000,000	1,580	5,000,000,000	630,000,000

Peu à peu, dans les écrits puis dans les normes ces groupes vont s'imposer et l'on oubliera que les germes appartenant à ces groupes ne sont pas tous d'origine fécale et que l'on possède en 1983 des techniques simples et fiables pour mettre en évidence :

- Escherichia coli
- Streptococcus faecalis
- Clostridium perfringens

dont l'origine fécale reste incontestée.

Dans ce chapitre sur les indicateurs de qualité des eaux de baignade nous aborderons donc ces trois indicateurs de santé, leur groupe. Nous verrons ensuite d'autres indicateurs de contamination fécale découverts plus tardivement et difficiles à mettre en évidence mais toujours présents et en grand nombre dans les matières fécales :

- Les anaérobies : bifides, bactéroïdes
- Les bactériophages fécaux

Nous ferons la liste de tous les germes pathogènes présents de façon intermittente dans les matières fécales et ayant provoqué des maladies par transmission hydrique - c'est à dire tous les germes pathogènes "indiqués" par les cinq groupes de germes précédents.

Nous examinerons s'il est suffisant pour être indicateur de qualité d'eau de baignade d'être toujours présent et en grand nombre dans les matières fécales.

Enfin, nous verrons que des germes pathogènes non fécaux peuvent être véhiculés par l'eau et quels risques ils représentent.

1° Escherichia coli et les coliformes

a) Le groupe des coliformes totaux

Ce sont, selon la définition usuelle (1) des bacilles Gram-
 - ne formant pas de spores,
 - ne possédant pas d'oxydase,
 anaérobies facultatifs et fermentant le lactose avec gaz en 48h. à 35°C.

De nombreux genres bactériens répondent à cette définition et les progrès réalisés en taxonomie en allongent la liste tous les ans (2-3-4). Cependant, l'on sait déjà que certains n'ont aucun intérêt en tant qu'indicateurs de santé par exemple : Erwinia, Serratia (5) Rahnella, et que d'autres comme les Citrobacter et Enterobacter (6,7,8) ont une origine fécale controversée de même que les Klebsiella (9,10). Seul, Escherichia reste d'origine fécale exclusive et incontestée.

D'un point de vue technique, il faut signaler que la recherche des coliformes totaux était et reste le plus souvent l'étape préalable à la mise en évidence des Escherichia coli. Ceci explique donc en partie pourquoi certains n'ont pas hésité à supprimer la seconde étape malgré le peu de signification sanitaire de certains coliformes pour utiliser comme indicateurs les "coliformes totaux".

C'est aussi en essayant de simplifier la technique de dénombrement des coliformes que l'on a oublié une partie de la définition des coliformes : l'absence d'oxydase. Dans les cultures bactériennes, les Aeromonas ressemblent en tous points aux coliformes (11,12) mais ils présentent une oxydase et dans les eaux douces ou eaux de mer leur présence non décelée peut faire surestimer d'un facteur 10 le nombre de coliformes réellement présents (13). (Tableau 5)

TABLEAU 5

Effet des vérifications (oxydase,...) sur le nombre le plus probable de coliformes totaux dans des eaux de mer. D'après Cabelli, in (E).

MPN Procedure	Geometric mean/100 ml	
	R.I. ^a	N.Y. ^b
Confirmed	1995	415
Completed	1449	362
Modified completed	1021	252

^a 26 samples (Rhode Island)

^b 38 samples (New York)

^c MPN tubes containing only lactose-positive isolates; oxidase-positive isolates eliminated

Les textes officiels français (JO 15 mars 1960) et européens (Directive 8/12/75) demandent d'identifier leurs colonies mais les normes AFNOR (T90 413 - T90 414) et les Standard Methods américaines négligent cette étape quoique les techniques, et les milieux de culture en particulier, soient les mêmes.

Par ailleurs, les Aeromonas sont des pathogènes opportunistes pour l'homme mais ne sont pas des bactéries fécales constantes et ne peuvent être considérés comme des indicateurs.

En résumé, le groupe des Coliformes totaux est considéré par la plupart des hygiénistes et des microbiologistes comme beaucoup trop large et de peu de signification sanitaire (même quand les Aeromonas en sont bien distingués).

b) Le groupe des coliformes "fécaux"

Dès 1960, apparaît aux USA le terme de "coliformes fécaux" de Clark et Kabler (14) regroupant des souches des matières fécales et celles des eaux ayant même profil biochimique (*). Très rapidement, un milieu de culture sera mis au point (appelé mFC) pour la mise en évidence en une seule étape de ces bactéries. Ce milieu qui semblait porter tous les espoirs a été et est toujours largement utilisé dans le monde. Quant au terme de "coliformes fécaux" décrit à cette occasion il a souvent remplacé celui d'Escherichia coli voire de Coliformes totaux.

Par exemple, aux USA les normes anciennes exprimées en "Coliformes totaux" ont été transformées à l'aide ou non d'un coefficient (selon les états) en normes relatives aux "Coliformes fécaux". En France, toutes les recherches d'Escherichia coli sont devenues "recherches de Coliformes Fécaux" alors qu'aucun changement n'était intervenu au niveau des techniques ou des milieux de culture.

* 5 tests biochimiques (IMVIC) permettaient d'identifier la plupart des germes connus alors dans le groupe des "Coliformes Totaux".

Hélas, ce milieu de culture et ce nouveau groupe qui lui était associé n'auront duré qu'une vingtaine d'années. Le milieu mFC en effet a dû être modifié car il était trop inhibiteur même pour certaines souches d'Escherichia coli (15). Par contre, l'on sait maintenant que des Klebsiella cultivaient sur ce milieu, qui n'étaient pas toutes d'origine fécale. (Tableau 6).

TABLEAU 6

Vérification des colonies cultivant sur milieu mFC
à partir d'effluents de papeteries.

D'après Bauer RR 1972 in "The Significance of Fecal Coliforms in Industrial Wastes".

Colony Description	No. Organisms	Lactose Fermentation (%)	EC+ (%)	<i>E. coli</i> Type 1 (%)
All blue	71	94	83	60
Blue centers	16	81	12	9
Light purple center	11	100	27	0

En effet, si Klebsiella pneumoniae provoque des infections bien connues en milieu hospitalier, on ne sait si leur présence en grand nombre dans les eaux est un facteur de dissémination de maladies ou non. Les Klebsiella sont parfois présentes dans les matières fécales (Tab. 7 et 8) mais elles sont surtout nombreuses dans les rejets organiques et industriels et particulièrement les rejets de papeteries (Tableaux 9,10,11). Il existerait donc des souches d'origine humaine et des souches de l'environnement. Quoiqu'il en soit Klebsiella ne peut-être considéré comme un indicateur de contamination fécale mais peut être comme un indicateur d'eaux usées industrielles riches en matières organiques.

Ceci nous ramène donc presque un demi-siècle en arrière avec comme seule espèce réellement et uniquement fécale : Escherichia coli. Certains auteurs américains comme Cabelli n'hésitent pas en 1983 à abandonner le terme de "Coliformes Fécaux" pour reparler d'Escherichia coli : même si leur dénombrement dans l'eau est un peu plus long, leur caractère fécal est garanti.

Distribution des coliformes dans la flore fécale animale.
D'après Dufour 1977 (B)

Animal	Number of Animals Examined	Number of Colonies Examined	Percent of Total Coliforms		
			<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> species	<i>Enterobacter</i> / <i>Citrobacter</i>
Chicken	11	201	90	1	9
Cows	15	264	99.9	...	0.1
Sheep	10	192	97	...	3
Goats	8	129	92	8	...
Pigs	15	399	83.5	6.8	9.7
Dogs	9	233	91	...	9
Cats	7	185	100
Horses	3	24	100
Totals	78	1627	94	2	4

TABLEAU 8

Distribution des coliformes dans la flore fécale humaine.
D'après Dufour 1977 (B)

Study Year	Number of Samples	Number of Colonies Examined	Percent of Coliforms		
			<i>E. coli</i>	<i>Klebsiella</i> species	<i>Enterobacter</i> / <i>Citrobacter</i>
1975	13	438	99.99	0.01	...
1976	15	285	89	5	6
Totals	28	723	96.8	1.5	1.7

TABLEAU 9

Bactéries présentes avant et après traitement dans divers effluents industriels.
D'après Herman DL in "The significance of Fecal Coliforms in Industrial Wastes 1972".

Waste	Organisms (%)							
	Before Treatment				After Treatment			
	<i>E. coli</i> type 1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> type 1	<i>K. pneumoniae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Salmonella</i>
Canning and food processing	35.0	55.0	3.3	0.7	32.1	42.9	5.0	10.7
Beverage	5.6	68.0	15.0	4.4	20.6	67.0	4.7	1.9
Potato	0.9	81.1	9.4	1.6	15.5	60.1	8.9	15.5
Meat and slaughter	56.9	21.5	13.8	7.3	65.8	24.1	6.9	2.3
Paper and pulp	4.4	85.0	9.5	0.3	0.4	92.3	6.7	0.008

TABLEAU 10

Nombre moyen d'Indicateurs présents dans des effluents de papeteries.
D'après Bauer RR, 1972, *ibidem*

Source	Organisms/100 ml			
	Total Count	Fecal Coliforms	Fecal Streptococci	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Mill Effluent #1 ^a	92	<2	<7	70
Mill Effluent #2	2,500	33	<10	1,400
Mill Effluent #3	354	<10	<7	<340
Mill Effluent #4	136,000	3,800	<8	52,500
Mill Effluent #5	68,000,000	1,440,000	23,000	49,700,000

^aProcesses: Mill #1 - bleached sulfite, ammonia base;
Mill #2 - unbleached sulfite, ammonia base;
Mill #3 - bleached Kraft;
Mill #4 - ground wood, unbleached sulfite, magnesium base;
Mill #5 - ground wood, unbleached sulfite, magnesium base.

2° LES STREPTOCOQUES

Leur présence et plus particulièrement celle de Streptococcus faecalis est connue dans les eaux contaminées depuis 1900 (16).

Cependant, les différentes espèces connues ne sont pas toutes en proportions identiques dans les matières fécales de tous les animaux. C'est la raison pour laquelle la recherche de ces bactéries appartenant pourtant toutes au même genre n'a réellement débuté que 50 ans plus tard après un regroupement d'espèces réalisé par Sherman (17). Sur la base de critères biochimiques d'abord il a séparé les Entérocoques (fécaux) des autres (non fécaux). Plus tard, le groupe a été élargi à Streptococcus bovis et Streptococcus equinus avec comme point commun leur identité sérologique au Groupe D (18) .

Actuellement, les Streptocoques fécaux regroupent non seulement les Streptocoques du Groupe D mais aussi Streptococcus avium, Streptococcus mitis et Streptococcus salivarius. (19-20-21-22).

FIGURE 1

Définition des termes "Entérocoques, Streptocoques du Groupe D, Streptocoques fécaux.

D'après Levin etal, 1975 Appl. Microbiol 30 -66-71

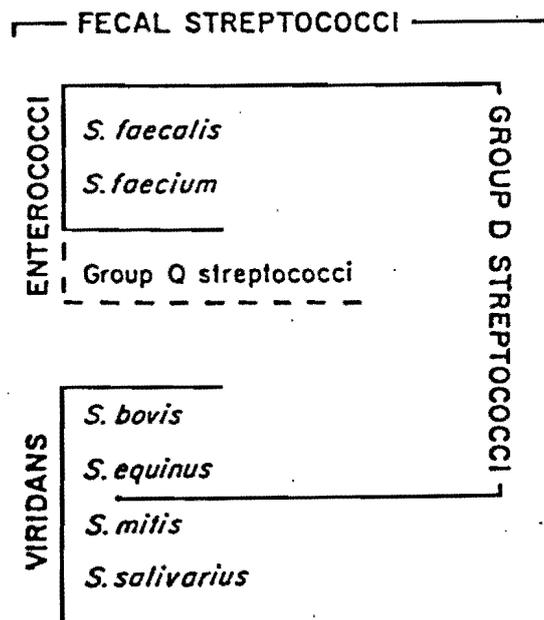


TABLEAU 11

Klebsiella dans les effluents d'une usine textile.
D'après Dufour et Cabelli 1976, JWPCF 48 : 872.

13

Location	Cells/100 milliliters	
	Total coliforms	<i>Klebsiella</i>
Above outfall	300	130
At outfall	2.3×10^8	1.3×10^{8a}
Below outfall	3.7×10^6	1.7×10^{6a}

^aAbout 50% of *Klebsiella* isolates were thermotolerant

TABLEAU 12

Distribution des Streptocoques fécaux dans les matières fécales.

D'après Kenner BA 1978 (A)

Fecal Sample Source	No. of Fecal Samples	Total No. of Strains Identified	<i>S. faecalis</i> var. ^a	<i>S. faecalis</i> Biotypes ^a	No. of Pep-tonizing <i>S. faecalis</i> Varieties and Biotypes ^b	Range of Pep-tonizing Strains in Individual Samples(%)	<i>S. durans</i> ^a	<i>S. bovis</i> ^a	<i>S. equinus</i> ^a	<i>S. salivarius</i> ^a	Atypical Streptococcus ^d
Human	22	1,065	940(88)	34(3)	264(27)	0-100	13(1)	0(0)	0(0)	76(7)	0(0)
Cattle	12	438	97(22)	74(17)	23(13)	0-75	13(3)	212(48)	41(9)	1(0.2)	0(0)
Sheep	10	372	142(38)	54(14)	37(19)	0-100	6(2)	154(41)	14(4)	1(0.3)	0(0)
Figs	10	360	194(54)	106(29)	10(3)	0-7	2(0.6)	32(9)	26(7)	0(0)	0(0)
Chickens	10	368	223(61)	143(39)	85(23)	0-96	1(0.3)	0(0)	1(0.3)	0(0)	0(0)
Turkeys	9	349	249(71)	94(27)	76(22)	0-96	0(0)	5(1)	1(0.3)	0(0)	0(0)
Ducks	8	318	130(41)	52(16)	0(0)	0	0(0)	126(39)	10(3)	0(0)	0(0)
Cats	10	239	205(86)	24(10)	21(9)	0-35	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	10(4)
Dogs	27	626	168(27)	106(17)	86(31)	0-100	8(1)	107(17)	0(0)	0(0)	237(38) ^e
Rodents ^c	23	622	367(59)	196(31)	238(42)	0-100	0(0)	36(6)	0(0)	0(0)	21(3)
	147	4,757	2,715	883	840		43	672	93	78	268

^aPercentage in parentheses of total number of strains identified.

^bPercentage in parentheses of *S. faecalis* var. and *S. faecalis* biotypes that peptonized litmus milk.

^cRodent feces: wild and domestic rabbits, 11 samples; rats, 7 samples; guinea pigs, 2 samples; raccoon, 1 sample; and chipmunk, 2 samples.

^dStarch-hydrolyzing types usually found on decaying vegetation. Also included here are a few untypable strains (28 strains in dog feces, no growth in 40% bile broth).

^eOnly 240 strains could be typed.

TABLEAU 13

Influence des Milieux de culture sur le rapport
Escherichia coli / Streptocoques fécaux dans l'eau.

D'après Kenner BA, 1978 (A)

Ohio River Station	Miles	Total ^a Coliforms	Fecal ^b Coliforms	Coliforms		Fecal Streptococci			
				% Fecal	TC:FC ^c	M-KF ^d	M-enterococcus	FC:FS(KF) ^e	KF:M-E ^f
Ironton, OH	654	9,600 ^g	510 ^g	5.3	18.8	280 ^g	180 ^g	1.82	1.56
Greenup Dam	640	7,500	590	7.9	12.7	480	150	1.23	3.20
Portsmouth, OH	626	84,000	4,800	5.7	17.5	4,300	980	1.12	4.39
Maysville, KY	572	5,800	380	6.6	15.3	420	130	0.90	3.23
Meldahl Dam	546	3,100	100	3.2	31.0	200	200	0.50	-
Cinn, OH intake	518	11,000	510	4.6	21.6	320	60	1.59	5.33
Anderson Ferry, OH	502	230,000	4,800	2.1	47.9	5,400	860	0.89	6.28
Miami Fort, OH	491	100,000	2,200	2.2	45.5	3,400	720	0.65	4.72
Markland Dam	450	27,000	460	1.7	58.7	480	150	0.96	3.20
Madison, IN	421	62,000	600	1.0	103.3	940	170	0.64	5.53

^aM-Endo MF.

^bM-FC.

^cTotal coliforms:fecal coliforms.

^dM-KF Streptococcus agar.

^eFecal coliform:fecal streptococci (KF streptococci medium).

^fFecal streptococci (KF streptococcus agar):fecal streptococci (M-enterococcus agar).

^gAll bacterial counts expressed per 100 ml

Cependant, cette nouvelle définition qui date des années 65-70 n'est pas universellement admise et les termes d'entérocoques, Streptocoques du Groupe D, et Streptocoques fécaux sont couramment utilisés l'un pour l'autre, pas toujours à bon escient (Fig. 1 Tableau 12).

Une fois encore, les problèmes techniques et surtout ceux de mise en oeuvre des milieux de culture sont les sources essentielles de confusion.

Des milieux de culture liquides et solides existent pour la recherche et le dénombrement des Entérocoques. Ils sont bien sélectifs et largement utilisés en particulier en France et dans la CEE.

Par contre, peu de milieux (23-24) permettent la mise en évidence de tous les Streptocoques fécaux et certains (25-26) contestent leur aptitude à laisser développer Streptococcus bovis et Streptococcus equinus. Cependant, depuis une dizaine d'années ils tendent à se généraliser.

Quel est donc le meilleur indicateur : Streptocoques fécaux ? ou Streptocoques du Groupe D ? ou Streptococcus faecalis ? ou Entérocoques ? Les avantages des Entérocoques en tant qu'indicateurs sont connus depuis 1943 (27) et sont nombreux :

- Ils sont en grand nombre dans les matières fécales et plus nombreux que les pathogènes.
- Ils sont en grand nombre dans les eaux contaminées, absents des eaux pures.
- Ils persistent dans l'environnement sans se multiplier.
- Ils sont très résistants dans l'eau quelles que soient la saison, sa composition (eau douce, eau salée, eau dure) et sont plus résistants que les coliformes vis à vis des toxiques ou du chlore (les références sont nombreuses).

Mais l'on sait actuellement que tous ces avantages sont partagés aussi par les 5 nouvelles espèces composant le groupe des Streptocoques Fécaux qui apparait donc être un aussi bon indice, meilleur même, car l'identification des espèces de ce groupe pourrait permettre dans une certaine mesure d'identifier l'origine de la pollution (animale ou humaine)*

* Quant au rapport Coliformes Fécaux/Streptocoques Fécaux nous ne ferons que le citer ici. Il diffère selon les auteurs (Tableau 13.) et surtout selon les milieux de culture utilisés aussi bien pour les Coliformes Fécaux que pour les Streptocoques Fécaux; il ne faut donc pas en attendre des informations permettant de déceler l'origine de la contamination.

Les Streptocoques Fécaux mieux que les Entérocoques pourraient donc être l'indicateur idéal mais les progrès de la taxonomie font découvrir actuellement un certain nombre de sous espèces :

Streptococcus faecalis sous espèce liquefaciens

Streptococcus faecium sous espèce casseliflavus

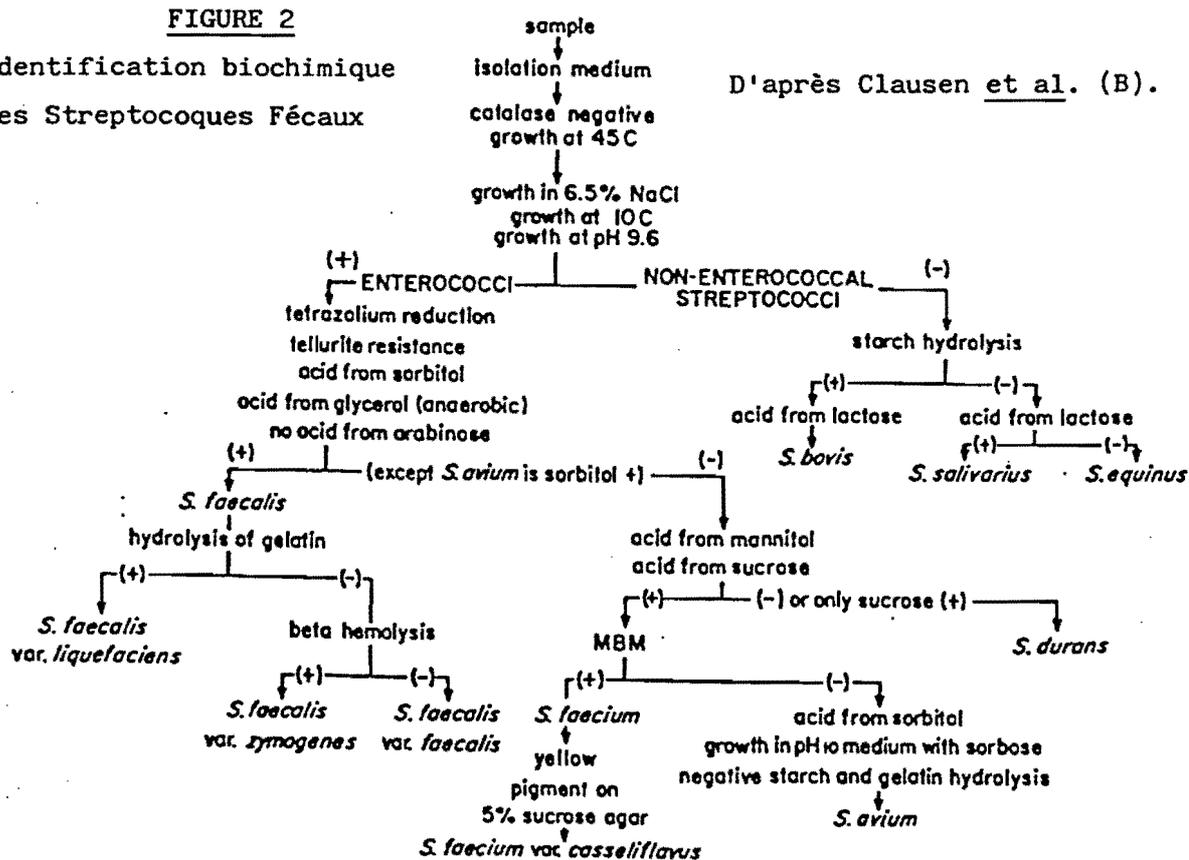
qui ne semblent pas d'origine fécale mais plutôt végétale.

Ainsi Mundt (30) a montré que 58,5% des échantillons de plantes contenaient des Entérocoques mais leur origine est très controversée, l'on pense que Streptococcus faecium sous espèce casseliflavus (31-32-33) est plus fréquent chez les plantes et les insectes que dans les matières fécales et est capable de se multiplier sur les plantes. L'origine de Streptococcus faecalis sous espèce liquefaciens est aussi indéterminée. Geldreich (34) en trouve dans le sol et chez les insectes, d'autres dans 5 à 14% des échantillons d'eaux usées (35). Mais l'on ne peut pas dire avec certitude si cette variété est ubiquiste ou non. Certains comme Kenner et Geldreich (36) ne le pensent pas et considèrent même que Streptococcus faecalis variété liquefaciens peut être même considéré comme un indicateur de contamination fécale.

FIGURE 2

Identification biochimique
des Streptocoques Fécaux

D'après Clausen et al. (B).



En résumé, les appellations "Streptocoques Fécaux", "Streptocoques du groupe D" et "Entérocoques" ne recouvrent pas strictement les mêmes germes. Les 3 groupes sont cependant d'origine fécale, à l'exception de 2 sous espèces :

Streptococcus faecalis sous - espèce liquefaciens

Streptococcus faecium sous - espèce casseliflavus

(parties intégrantes des 3 groupes).

3° CLOSTRIDIUM

Clostridium perfringens est considéré depuis le début du siècle comme un indicateur de contamination fécale parce qu'il est présent de manière constante dans les matières fécales et survit dans l'environnement, même aérobie, par ses spores.

Cependant, depuis 1940, il n'est plus utilisé aux USA et seules la France et l'Allemagne gardent cet indicateur dans leurs normes de potabilité - et encore - sous la forme du groupe des "anaérobies sulfito-réducteurs formant des spores".

Rechercher les Clostridium dans l'eau est facile et rapide, mais il y en a actuellement 56 espèces, et l'identification de Clostridium perfringens est longue et difficile. C'est pourquoi elle a été remplacée par la recherche directe des sulfito-réducteurs (présence d' H_2S). Cependant, 22 à 30 espèces produisent de l' H_2S - pas toutes par réduction des sulfites - et elles ne sont pas toutes fécales.

TABLEAU 14

Confirmation comme Clostridium perfringens de souches isolées par Bonde (37)

Sample Source	Pasteurized			Unpasteurized		
	No. of Colonies	Confirmation, %		No. of Colonies	Confirmation, %	
		a	b		a	b
Feces	19	100.0	100.0	20	100.0	30.0
Raw sewage	90	99.1	88.9	131	98.0	24.4
Sludge	157	99.0	81.5	381	95.5	60.9
Treated sewage	119	92.9	73.1	257	96.1	39.7
Receiving water	40	37.5	30.0	266	75.6	54.1

^aConfirmed by typical morphology and stormy fermentation of milk.

^bConfirmed by typical morphology, stormy fermentation of milk, and no fermentation of mannitol.

Quand on ne recherche que les spores la mise en évidence des sulfito-réducteurs est un bon test présomptif de Clostridium perfringens; pour Bonde (37), suivant l'origine du prélèvement, 79 à 100% des souches sont des Clostridium perfringens.

Par contre, lors du dénombrement des formes végétatives il serait utile d'identifier Clostridium perfringens parmi les sulfito-réducteurs. Mais cette technique est longue, nécessite des conditions d'anaérobiose et pour certains auteurs, dont Levine, (38) est inutile, car :

- la constance des Clostridium perfringens dans les matières fécales humaines reste controversée (39) (40) (41) ;

- les taux dans les eaux usées et les matières fécales sont faibles, par rapport à Escherichia coli ;

- la présence de spores est un facteur très limitant qui rend ce germe ubiquiste et peut-être plus résistant que les pathogènes aux toxiques (chlore en particulier) ou autres facteurs de stress, etc...

Dans l'environnement, et pour la baignade en particulier, il est bien clair que les Clostridium perfringens et à plus forte raison les "spores de sulfito-réducteurs" ne sont pas un bon indicateur de santé.

En effet les spores s'accumulent dans les sédiments, sont remises en suspension par les tempêtes, les vagues, le surf, les bateaux (42-43) et ne peuvent être corrélées avec les Escherichia coli ou la proximité d'égouts (44). En bord de mer, il semblerait que seul le rapport spores/formes végétatives de Clostridium perfringens augmente avec la distance du point de pollution (45).

Cependant, les Clostridium perfringens peuvent dans certains cas servir de traceurs du fait de leur résistance particulière (spores). Ils peuvent être utilisés comme un indicateur de la pollution passée.

Ils sont utiles en cas d'antagonismes microbiens : des Salmonella et des Clostridium perfringens ont été retrouvés dans certaines eaux en absence de Coliformes (46).

TABLEAU 15

Teneurs en Clostridium perfringens dans des eaux de plages à peine acceptables et relativement peu polluées. D'après Cabelli 1978 (A)

18

Trial No.	Barely Acceptable Beach	Relatively Unpolluted Beach
Mean Density/100 ml		
1	66	351
2	24	31
3	5	4
4	10	2
5	10	11
6	47	4
Mean	18.2	12.6

TABLEAU 16

Teneurs en Indicateurs dans divers produits.
D'après Evison, 1973 (A)

Sample	Coliform	<i>E. coli</i>	Fecal Streptococci	Anaerobic Lactobacilli
	MPN/100 ml or /gram of Sample			
	CFU/100 ml or /gram of Sample			
Yoghurt	<1	<1	<1	<1
Sour Milk	<1	<1	1.8×10^5	<1
Garden Soil	4.2×10^3	5.0×10^1	2.3×10^3	<1
Moorland Soil	<1	<1	<1	<1
Garden Compost	9.0×10^3	<1	1.4×10^3	<1
Human Feces	4.3×10^{10}	4.3×10^{10}	5.0×10^{10}	2.6×10^{11}
Pig Waste	3.5×10^7	3.5×10^7	1.1×10^5	2.3×10^7
Poultry Waste	2.8×10^7	2.8×10^7	8.7×10^6	8.1×10^9
Raw Domestic Sewage	1.15×10^9	4.5×10^8	2.5×10^8	3.61×10^7
Settled Sewage	2.25×10^8	1.1×10^6	3.5×10^5	2.9×10^7
Sewage Effluent	1.3×10^5	1.1×10^5	5.5×10^4	3.0×10^5

^aModified.

TABLEAU 17

Teneurs en Indicateurs dans divers échantillons d'eaux.
D'après Evison 1973 (A)

Fecal Contamination	No. of Samples	MPN/100 ml (Geometric mean)			CFU/100 ml (Geometric mean)
		Coliforms	<i>E. coli</i>	Fecal Streptococci	Anaerobic Lactobacilli
Nil	1	1.0	<1	<1	<1
Slight	1	3.5×10^2	1.0×10^1	1.0	4.6×10^1
Moderate	11	5.2×10^3	3.8×10^2	2.1×10^2	6.2×10^2
Heavy	2	1.4×10^5	1.4×10^4	8.3×10^3	5.4×10^4
Nil	3	1.0	<1	<1	<1
Slight	3	7.3×10^2	2.0×10^1	4.0×10^1	3.0×10^2
Moderate	1	2.5×10^3	5.0×10^1	5.0×10^1	9.2×10^2
Heavy	7	3.4×10^5	2.0×10^4	2.8×10^4	2.4×10^5

^aModified.

Selon Bonde, ils peuvent servir de substitut aux coliformes dans les eaux tropicales par exemple ou encore des eaux riches en toxiques.

4° AUTRES ANAEROBIES

La flore fécale de l'homme et des animaux est dominée par les anaérobies (300 fois plus que d'aérobies) (47-48) c'est pourquoi ils pourraient être de bons indicateurs de la contamination fécale. Cependant, le groupe n'est pas homogène et des problèmes de milieux de culture associés à des problèmes techniques d'anaérobiose ont limité le développement de leur recherche.

a) Les "Bifides"

Ils ont été découverts dans les matières fécales avant 1900 par Tissier (49) et proposés comme indicateurs en 1958 par Mossel (50).

Le genre Bifidobacterium regroupe actuellement 11 espèces dont 3 associées aux insectes et 4 aux mammifères autres que l'homme. Des études réalisées en Angleterre montrent qu'il n'y a pas de source extrafécale et qu'ils sont plus nombreux que les coliformes ou les Streptocoques fécaux dans les matières fécales (51) (Tab. 1 - 2 et 3). Ce n'est que depuis 1965 qu'un milieu de culture existe et a permis de montrer que les Bifides survivent dans l'environnement aussi bien que les coliformes (mais moins que les Streptocoques fécaux). Ils survivent nettement moins bien dans les eaux chlorées et c'est pourquoi il est inutile de recommander la recherche des Bifidobacterium dans l'eau d'alimentation ou en piscines. Par contre, dans l'environnement, pour la baignade ou la pêche ce peut être un indicateur intéressant d'autant que 3 ou 4 tests biochimiques permettent de séparer les Bifides d'origine humaine de ceux d'origine animale. Ce test était irréalisable jusqu'alors.

Il reste que le milieu de culture mis au point en 1965 n'est pas assez sélectif et que la recherche des Bifides dans l'environnement est complexe et longue et reste un obstacle à la généralisation de ce germe en tant qu'indicateur.

b) Les Lactobacilles anaérobies

Ayant la bouche comme origine, ils font partie de la flore fécale, mais leur présence pourrait être liée à celle des caries dentaires (52). Ceci expliquerait peut-être pourquoi 10 à 40% des matières fécales humaines ne contiennent pas de Lactobacilles en grand nombre. Leur utilité comme indicateurs semble donc limitée.

c) Les Bactéroïdes

Bien qu'ils constituent la flore dominante des matières fécales humaines et animales, les bactéroïdes ne sont pas plus utilisés en tant qu'indicateurs parce qu'ils exigent une anaérobiose très stricte. (53). Ces manipulations sont donc très difficiles, et malgré la mise au point d'un milieu de culture amélioré, les colonies doivent être vérifiées à l'aide de tests biochimiques peu simples à réaliser dans ces conditions.

Peu d'intérêt est donc porté à ce germe actuellement mais c'est un indicateur potentiel dont le développement dépendra de l'amélioration des techniques.

5° LES BACTERIOPHAGES

Les bactériophages, virus parasites de bactéries, ont été découverts dans les matières fécales de l'homme (sous le nom de coliphages) par D'Herelle en 1917 (54), puis dans les eaux usées. Dès lors, ils ont été considérés comme un indicateur possible de contamination par les bactéries ou les virus. Ils ont aussi été utilisés comme traceurs lors d'épidémies d'origine hydrique et le sont toujours actuellement.

Il a parfois été écrit qu'en eau de mer, la pauvreté en bactéries fécales était le résultat de la présence des bactériophages fécaux (55). Cependant, ils ne peuvent détruire que des bactéries en cours de division et ils n'ont jamais été mis en évidence loin du littoral. Leur présence est cependant constante le long des côtes et près de l'embouchure des rivières (56) en liaison étroite avec la contamination fécale. Les travaux sont nombreux à ce sujet (57 à 60) ainsi que sur leur survie dans l'environnement. Celle-ci paraît importante : Guelin (61 à 64) les retrouve même après disparition des pathogènes ou des autres indicateurs.

Les coliphages étant les "virus" des coliformes, ils ont souvent été proposés comme mesure indirecte de la présence des virus dans l'eau.

TABLEAU 18

Taux de coliphages et d'Enterovirus dans des eaux usées.

D'après Katt etal 1974 (A)

Type	Virus	Winter	Spring (PFU/100 ml)	Summer	Autumn
Trickling Filter Influent	Coliphages	1.8×10^6	7.6×10^6	8.1×10^6	3.8×10^6
	Enteroviruses	57	54	54	30
Trickling Filter Effluent	Coliphages	9.8×10^5	4.6×10^6	2.6×10^5	1.8×10^5
	Enteroviruses	71	51	60	41
Oxidation Pond Effluent	Coliphages	6.6×10^4	1.6×10^5	1.9×10^4	5.2×10^2
	Enteroviruses	53	46	42	45

^aResults are the arithmetic mean of 4-12 samples in each section.

TABLEAU 19

Recherche de coliphages et d'Enterovirus

D'après Vaugh et Metcalf, 1975 (A)

Month	Coliphages in			Enteric Viruses in			
	Water	Oysters	Mud	Water	Oysters	Mud	
	(Grab)	(Gauze Pad)		(Gauze Pad)			
Total Recovered/Total Number of Samples Tested ^a							
March	0/2	0/1	5/8	NT	1/1	0/8	NT
April	NT	NT	5/6	NT	NT	0/6	NT
May	0/1	NT	NT	0/1	NT	NT	0/1
June	1/22	3/9	16/27	0/4	1/9	2/27	0/4
July	5/66	16/39	33/54	1/22	1/39	4/54	5/22
August	1/4	3/4	8/16	0/7	0/4	4/16	1/7
September	6/27	NT	9/30	0/2	NT	2/30	0/2
October	1/10	NT	4/17	NT	NT	0/17	NT
Totals	14/132	22/53	80/158	1/36	3/53	12/158	6/36
Percent positive	10.6	41.5	50.6	2.8	5.7	7.6	16.7

NT = not tested.

Berg (65) a recensé les critères permettant d'étudier la validité de ce modèle et a montré qu'en eau de mer les coliphages étaient aussi résistants que les virus. De même, Katt (66) (Tableau 18), dans une étude plus récente, trouve que les coliphages représentent de façon satisfaisante le niveau de virus dans l'eau.

Cependant, d'autres auteurs ne partagent pas cette opinion, particulièrement Vaughn et Metcalf (67) (Tableau 19) lorsqu'il s'agit d'élevage de poissons ou de coquillages. Les huîtres, par exemple, accumulent 5 à 30 fois plus de coliphages que de virus coxsackie.

De plus, les coliphages sont toujours présents dans les matières fécales mais les virus ont un taux de présence variant de 0 à 100 % selon les épidémies.

Par ailleurs, certains auteurs (68-69) trouvent que les coliphages ne sont pas toujours sélectifs des bactéries de contamination fécale.

En résumé, il faut dire que les techniques de recherche et surtout de dénombrement des coliphages, longues, difficiles et indirectes sont plus complexes que celles des indicateurs classiques et deviennent anachroniques au fur et à mesure que les techniques de recherche des pathogènes s'améliorent.

B LES GERMES INDIQUES

Après avoir étudié les germes normalement présents dans les matières fécales, voyons quels germes pathogènes s'y présentent, de façon constante ou intermittente, et s'ils n'existent que là.

Il s'agit de :

- | | | |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> . <u>Salmonella</u> (70-71-72) . <u>Shigella</u> (73) . virus de l'hépatite A (74) . Leptospires (75) . <u>Vibrio cholerae</u> (76-77-78) | } | <p>responsables d'épidémies
reconnues par baignade
(voir chapitre 3)</p> |
| <ul style="list-style-type: none"> . Divers virus (coxackie du groupe A, rotavirus, réovirus et virus polio) (79-80-81) . <u>Yersinia enterocolitica</u> (très fréquent chez les rongeurs et animaux domestiques) (82 à 85) . <u>Campylobacter jejuni</u> (86) . <u>Candida albicans</u> (87 à 90) . <u>Giardia lamblia</u> (souvent associé à la présence de castors) (91 à 94) | } | <p>de plus en plus souvent cités comme responsables de maladies d'origine hydrique (dont des cas isolés par baignade).</p> |

Pour ces germes, la présence dans les matières fécales n'est donc pas constante mais épisodique. La présence d'indicateurs fécaux ne sera donc qu'une présomption de présence de ces pathogènes, la relation pathogène-indicateur étant d'autant plus aléatoire que le réseau est petit.

La seule source de ces germes est l'intestin animal ou humain. Donc des indicateurs fécaux (Escherichia coli, Streptocoques fécaux,...) les accompagnent toujours, en principe. En fait en quelques occasions on a observé des pathogènes sans indicateurs. En particulier pour certaines petites épidémies de giardiase dues à l'eau de boisson chlorée, aux USA, on a trouvé des kystes de Giardia sans accompagnement de coliformes (95). La relation pathogène/indicateur peut donc être défailante après certains traitements (chloration ou autre), mais c'est dans les eaux de surface naturelles qu'elle a le plus de chances de rester valide.

Une controverse subsiste cependant sur la résistance de certains pathogènes dans les eaux non traitées, notamment à propos des virus (96 à 100) et Salmonella (101,102,103) soupçonnés parfois d'être plus persistants dans l'environnement que certains indicateurs fécaux usuels (coliformes).

Est-il donc suffisant pour être un bon indicateur d'être toujours présent et en grand nombre dans les matières fécale ? Il est clair actuellement que ces 2 conditions sont nécessaires : le rapport indicateur/ pathogène devant être élevé pour une meilleure prévention. Cependant, ce n'est pas suffisant et il faut que cet indicateur survive autant dans l'environnement que les pathogènes qu'il indique et soit facile à mettre en évidence. Ce sont les 4 critères décrits par Cabelli (104).

Nous avons vu que, parmi les 5 groupes d'indicateurs, seules quelques espèces sont d'origine uniquement fécale et peuvent donc répondre aux 2 premières conditions. De plus, toutes ne sont pas faciles à mettre en évidence. Dans ces conditions, trouver parmi celles-ci l'indicateur idéal répondant aux 4 conditions - dont un taux de survie identique à celui de tous les pathogènes indiqués - n'est pas envisageable et la solution la plus raisonnable actuellement reste la recherche de plusieurs indicateurs.

En résumé, quelques catégories de germes intestinaux inoffensifs (notamment Escherichia coli et streptocoques fécaux) peuvent servir d'indicateurs fidèles de contamination fécale, c'est-à-dire indiquer qu'un certain nombre de pathogènes intestinaux peuvent être présents. Que cette présence ne puisse être systématiquement vérifiée ne constitue pas une défaillance des indicateurs. Par contre, certains traitements, plus actifs sur les indicateurs que sur les pathogènes, entraînent des défaillances, réelles celles-là, mais c'est dans les eaux de surface naturelles qu'elles sont le moins à craindre.

Si les pathogènes intestinaux ont donc de bons indicateurs possibles, il convient cependant de se souvenir qu'il existe dans les eaux de baignade des agents pathogènes qui ne sont pas d'origine fécale mais sont soit apportés par les baigneurs (peau et muqueuses), soit originaires du milieu aquatique lui-même : les germes non-indiqués.

C LES GERMES NON INDIQUES

Il s'agit d'Aeromonas hydrophila, Vibrio NAG, V. parahaemolyticus et V. vulnificus, Pseudomonas aeruginosa, certaines Klebsiella, des Staphylocoques et diverses Mycobactéries ainsi que Naegleria fowleri et Legionella pneumophila, ces deux dernières décrites uniquement en eaux douces.

Les infections à Aeromonas sont décrites par divers auteurs (105-106-107-108). Il ne s'agit jamais d'épidémies mais de surinfections de plaies ou de blessures par la bactérie présente dans l'eau.

Quant aux vibrions V. parahaemolyticus (exclusivement marin), V. anguillarum et V. vulnificus, en dehors du fait qu'ils contaminent les crustacés et les poissons, ils provoquent aussi des infections des plaies, des yeux et des oreilles (109). La pathogénicité des vibrions NAG vient également d'être reconnue à l'occasion d'épidémies de diarrhées semblables à celles du choléra et qui semblent de plus en plus fréquentes (110).

En ce qui concerne les infections à Ps. aeruginosa (otites externes et infections de la peau) elles sont essentiellement décrites après baignades en piscines (111) (112) (113) mais aucun cas n'a été décrit en eau douce ou en mer, bien qu'on en suspecte. (114) (115).

Les Staphylocoques pathogènes apportés par le baigneur sont connus pour provoquer des infections de la sphère ORL et de la peau (116-117-118). De même Mycobacterium marinum et M. fortuitum peuvent causer des granulomes et les Klebsiella des affections pulmonaires graves.

Legionella pneumophila, découverte en 1976 est largement répandue dans les eaux de surface mais prolifère préférentiellement dans les eaux échauffées des tours de refroidissement, douches, condenseurs, ... Inhalée avec ces aérosols, elle provoque une pneumopathie grave voire mortelle (maladie des légionnaires) mais aucune n'a été décrite après baignade en eau douce ou marine, même réchauffées. (119) (120) (121).

Ce n'est hélas pas le cas pour la Méningo-encéphalite primitive toujours mortelle provoquée par une amibe : Naegleria fowleri. On a recensé dans le monde depuis 1960, 200 cas environ, toujours après baignade dans des eaux douces naturellement ou artificiellement échauffées, (122) (123) (124) (125) sans qu'on sache actuellement pourquoi elles prolifèrent dans certains sites ni comment les éliminer.

En résumé il existe, pour la santé des baigneurs, des risques infectieux indépendants de la pollution fécale, qui concernent la sphère ORL (staphylocoques), la peau (Aeromonas, Pseudomonas Vibrions, Mycobactéries ...), le système digestif (Vibrions), le système nerveux (Naegleria fowleri). Certains sont bénins (affections cutanées), d'autres gravissimes (méningo-encéphalites amibiennes) mais très rares. Ces germes sont leurs propres indicateurs : leur écologie est trop mal connue pour qu'on puisse prévoir leur présence.

CHAPITRE II

LES NORMES EN VIGUEUR ET LES METHODES DE MESURES PRECONISEES

A NORMES EN VIGUEUR

Jusqu'à ces dernières années, rares étaient les pays disposant de normes clairement définies concernant la qualité des eaux de baignade.

De plus un rapport de l'O.M.S. de 1975 (126) montre que les réglementations nationales quand elles existaient, ou plus souvent les recommandations en usage, présentent de grandes différences quant aux critères et aux seuils retenus.

En Europe, il a fallu attendre le 8 décembre 1975 pour que le Conseil des Communautés Européennes adopte une directive (J.O. du 5 février 1976) visant à harmoniser les législations des 9 pays membres. Cette directive définit des valeurs limites impératives (I) que ces derniers ne peuvent dépasser lors de la détermination de leurs normes de qualité, et des valeurs guides (G) qu'ils doivent s'efforcer de respecter. (Tab. 20). Ces valeurs constituent des bornes à l'intérieur desquelles chaque pays peut fixer ses normes nationales.

Au Danemark, par exemple, la valeur impérative pour les "Coliformes fécaux" a été fixée à 1000 Escherichia coli/100 ml.

En France, l'application des prescriptions de cette directive est assurée par des circulaires du Ministère de la Santé (circ. des 23 juin 1976, 22 juin 1977, 23 juin 1978, 25 juin 1979, 10 juin 1980 et 2 juillet 1981 pour les eaux de mer, et circ. des 6 juillet 1977, 25 juin 1979, 30 juin 1980 et 2 juillet 1981 pour les eaux douces). Celles ci définissent des "eaux de bonne, moyenne et mauvaise qualité", ainsi que des "eaux momentanément polluées", sur la base des chiffres de la C.E.E.

TABLEAU 20

QUALITE MICROBIOLOGIQUE REQUISE DES EAUX DE BAINNADE

(Source : Journal Officiel des Communautés européennes du 5.2.76)

Paramètres	G	I	Fréquence d'échantillonnage minimale	Méthode d'analyse ou d'inspection
Microbiologiques:				
1 Coliformes totaux /100 ml	500 (20)	10 000 (5)	bimensuelle (1)	Fermentation en tubes multiples. Repiquage des tubes positifs sur milieu de confirmation. Dénombrement selon NPP (nombre le plus probable) ou filtration sur membrane et culture sur milieu approprié tel que gélose lactosé ou tergitol, gélose d'endo, bouillon au teepol 0,4%, repiquage et identification des colonies suspectes. Pour les points 1 et 2, température d'incubation variable, selon que l'on recherche les coliformes totaux ou les coliformes fécaux.
2 Coliformes fécaux /100 ml	100 (20)	2 000 (5)	bimensuelle (1)	
3 Streptocoques fécaux /100 ml	100 (10)	-	(2)	Méthode de Litsky. Dénombrement selon NPP (nombre le plus probable) ou filtration sur membrane. Culture sur milieu approprié.
4 Salmonelles /1 l	-	0 (5)	(2)	Concentration par filtration sur membrane. Inoculation sur milieu type. Enrichissement, repiquage sur gélose d'isolement, identification.
5 Enterovirus 1 PFU/10 l	-	0	(2)	Concentration par filtration, par floculation ou par centrifugation et confirmation.

G = guide.

I = impérative.

(1) Lorsqu'un échantillonnage effectué au cours des années précédentes a donné des résultats sensiblement plus favorables que ceux prévus dans le présent tableau et lorsqu'aucune condition susceptible d'avoir diminué la qualité des eaux n'est intervenue, la fréquence d'échantillonnage peut être réduite de moitié par les autorités compétentes.

(2) Teneur à vérifier par les autorités compétentes lorsqu'une enquête effectuée dans la zone de baignade en révèle la présence possible ou une détérioration de la qualité des eaux.

() = Fréquences de dépassement autorisée

QUALITE REQUISE POUR LES EAUX DE BAINNADE
(selon la circulaire du 2 Juillet 1981)

Points ayant fait l'objet d'au moins 10 prélèvements entre le 1er Juin et le 30 Septembre

Eau de bonne qualité pour la baignade (A) :

- 80% des résultats des analyses sont inférieurs ou égaux aux nombres Guides relatifs aux Coliformes Totaux (500/100 ml) et aux Coliformes Fécaux (100/100 ml)
- 95% des résultats des analyses sont inférieurs ou égaux aux nombres Impératifs relatifs aux Coliformes Totaux (10000/100 ml) et aux Coliformes Fécaux (2000/100 ml).
- 90% des résultats des analyses sont inférieurs ou égaux aux nombres Guides relatifs aux Streptocoques Fécaux (100/100 ml).

Eau de qualité moyenne pour la baignade (B) :

- 95% des résultats des analyses sont conformes aux nombres Impératifs relatifs aux Coliformes Totaux (10000/100 ml) et aux Coliformes Fécaux (2000/100ml).

Eau pouvant être momentanément polluée (C) :

Entre 5% et 33% des résultats des analyses dépassent les nombres Impératifs relatifs aux Coliformes Totaux (10000/100 ml) et aux Coliformes Fécaux (2000/100 ml).

Eau de mauvaise qualité (D) :

Plus de 33% des résultats dépassent les nombres Impératifs relatifs aux Coliformes Totaux (10000/100 ml) et aux coliformes Fécaux (2000/100 ml).

Points ayant fait l'objet de 4 à 9 prélèvements entre le 1er Juin et le 30 Septembre

Eau de bonne ou moyenne qualité :

Tous les résultats des analyses sont inférieurs ou égaux aux nombres Impératifs relatifs aux Coliformes Totaux (10000/100 ml) et aux Coliformes Fécaux (2000/100 ml).

Eau de mauvaise qualité ou pouvant être momentanément polluée :

Les résultats des analyses d'au moins un prélèvement sont supérieurs aux nombres Impératifs concernant les Coliformes Totaux (10000/100 ml) et les Coliformes Fécaux (2000/100 ml).

Cette directive, obéissant à un souci de normalisation et d'harmonisation, est critiquée par un certain nombre d'auteurs (B. MOORE, 1977 (127) ; A.L.H. GAMESON, 1979 (128)). Ceux-ci objectent que les conditions environnementales (température de l'eau, insolation, marée, etc...) des plages allant de la Méditerranée au nord de l'Ecosse sont trop différentes pour que l'on puisse imposer une législation uniformisée abusivement selon eux.

Ailleurs en Europe, les normes sont souvent inspirées de celles de la C.E.E. Ainsi en Yougoslavie, 95% des échantillons doivent contenir moins de 500 "Coliformes totaux" par 100 ml. (Pour les pays riverains de la Méditerranée voir la référence (129)).

Aux Etats-Unis, chaque état dispose de ses propres normes qui peuvent varier d'une région à l'autre dans une large mesure (voir annexe 1). C'est ainsi que l'on peut noter des "Standards" exprimés en termes de "Coliformes Fécaux", pouvant aller de 70 à 1000 par 100 ml (130). Cependant les chiffres les plus couramment retenus, sont recommandés par l'Administration Fédérale (131) : "Pour les échantillons prélevés au cours d'un mois (et au nombre d'au moins cinq), la concentration en "Coliformes Fécaux" d'une eau de baignade ne doit pas dépasser une moyenne logarithmique de 200 par 100 ml et un seuil de 400 par 100 ml pour au maximum 10% de la totalité des échantillons de l'année".

En U.R.S.S., la salubrité des eaux littorales est régie par le "Règlement sur la protection sanitaire des eaux côtières" de 1975. "La colimétrie ne doit pas dépasser 100 microorganismes par 100 ml dans la région d'utilisation et dans la première zone protectrice, et aucun germe pathogène ne doit être présent" (132).

Certains pays d'Asie, telle la Malaisie, ont aligné leur législation sur les directives de la C.E.E. (133).

Les experts de l'O.M.S, quant à eux, préfèrent exprimer "les seuils d'acceptabilité en termes d'ordres de grandeurs de préférence à des chiffres fixés trop rigidelement" (126,132). Toutefois selon eux "une eau de baignade hautement satisfaisante ne devrait pas contenir plus de 100 Escherichia coli/100 ml, et pour une eau acceptable, 10% au maximum des échantillons (au moins 10 par été) pourraient dépasser 1000 Escherichia coli/100 ml".

State ^a	Year Rev ^b	Water Type ^c	Total Coliform Limit per 100 ml			Fecal Coliform Limit per 100 ml		
			Average	Percentile	One Sample	Average	Percentile	One Sample
Alabama ^{1,2,3}	77	SW				LM ^d 100		
	77	SW				LM 200		
Alaska	78	ALL				Mean 20	90% ≤ 40	
Arizona	73	FW				EPA	EPA	
Arkansas	77	FW				EPA	EPA	
California	78	SW	Ave 1000	80% ≤ 1000		EPA	EPA	
	78	FW	Med ^e 240		≤ 10,000	Med 50	80% ≤ 400	
Colorado	76	FW				EPA	EPA	
Connecticut ^{4,5,6}	76	SW	Med 700	90% ≤ 2300		EPA ^f	90% ≤ 500 ^g	
	76	FW	Med 1000	80% ≤ 2400		EPA ^f	96% ≤ 600 ^g	
Delaware	76	ALL				EPA		
District of Columbia	Pro ^h	ALL				EPA	EPA	
Florida	74	ALL	LM 1000	80% ≤ 1000	≤ 2,400	EPA	EPA	≤ 800
Georgia ^{1,2}	77	SW				LM 100 ²⁴		
	77	FW				LM 200		
Hawaii	74	ALL	Med 1000	90% ≤ 2400		EPA	EPA	
Idaho	Pro	FW				LM 50	90% ≤ 200	≤ 500
Illinois	76	FW				EPA	EPA	
Indiana ⁷	78	FW				EPA		≤ 400 ^{8,1}
Iowa ⁸	77	FW				EPA	EPA	
Kansas	78	FW				EPA	EPA	
Kentucky ^{9,10}	76	FW	Ave 1000	80% ≤ 1000	≤ 2,400	EPA ¹¹	EPA ¹¹	
Louisiana	77	ALL				EPA	EPA	
Maine	77	SW	Med 70	90% ≤ 230		Med. 1000	90% ≤ 200	
	77	FW				NTE 200 ¹²		
Maryland ¹²	74	ALL				EPA	EPA	
Massachusetts ¹³	78	SW	Med 700	80% ≤ 1000				
	78	FW				EPA	EPA	
Michigan ²²	73	FW				EPA		
Minnesota ¹⁴	77	FW				EPA	EPA	
Mississippi	77	ALL				EPA	EPA	
Missouri ^{15,16}	77	FW				EPA	EPA	
Montana	78	FW				EPA	EPA	
Nebraska	77	FW				EPA	EPA	
Nevada	74	FW				EPA	EPA	
New Hampshire ⁸	77	ALL			240			
New Jersey ⁸	74	ALL				EPA		
New Mexico ¹⁴	77	FW				LM 100	80% ≤ 200	
New York ^{9,12,14}	74	ALL	Med 2400	80% ≤ 6000		EPA		
North Carolina ^{10,20}	77	ALL				EPA ¹¹	80% ≤ 400	
North Dakota	77	FW				EPA	EPA	
Ohio ²¹	78	FW				EPA	EPA	
Oklahoma	78	FW				EPA	EPA	
Oregon ²²	Pro	SW	Ave 240	80% ≤ 240				
		FW	Ave 1000	80% ≤ 2400				
Pennsylvania ¹⁶	Pro	ALL				EPA		
Rhode Island	77	SW	Med 700	80% ≤ 2300		Med 50		90% ≤ 600
	77	FW	Med 100	80% ≤ 2400		Med 200 ²⁰		80% ≤ 600 ²⁰
South Carolina	77	ALL				EPA	EPA	
South Dakota	78	FW				EPA	80% ≤ 200	≤ 400
Tennessee ^{1,23,24}	77	FW				EPA		≤ 1000
Texas ⁸	78	ALL				EPA	EPA	
Utah	78	FW	LM 1000			EPA		
Vermont	78	FW	NTE 500			NTE 200		
Virginia	77	ALL				EPA	EPA	
Washington	77	SW				MED 14	90% ≤ 43 ²⁶	
	77	FW				LM 100	90% ≤ 200 ¹⁸	
West Virginia	77	FW	Ave 1000	80% ≤ 1000	≤ 2400	EPA	EPA	
Wisconsin ²⁵	78	FW				EPA	EPA	
Wyoming	78	FW				EPA	EPA	
Puerto Rico	78	ALL				EPA	80% ≤ 400	
Virgin Islands	73	ALL				LM 70		
Trust Territory	73	ALL				EPA	EPA	
American Samoa	73	ALL				Ave 100	90% ≤ 200	
Guam ⁸	78	ALL				Ave 200	EPA	

SW : Eau de mer

LM : Log Mean

FW : Eau douce

EPA : Moyenne géométrique < 200/100 ml

ALL : Toutes eaux

B ANALYSE CRITIQUE DES NORMES

1 Harmonisation internationale

La nécessité d'une harmonisation internationale de la surveillance des eaux de baignade est largement ressentie dans les milieux concernés par les problèmes sanitaires, et des efforts réels ont été faits dans la détermination de "seuils d'acceptabilité", de "nombres guides", "nombres impératifs", etc...

On peut néanmoins déplorer avant tout le manque évident d'harmonisation au niveau des définitions des germes indicateurs recherchés et, nous allons le voir, des méthodes employées.

On peut également remarquer que l'indicateur "Streptocoques Fécaux" est totalement absent des Standards américains et des recommandations de l'O.M.S. et qu'il n'est mentionné dans la directive de la C.E.E. qu'en tant que nombre guide.

On notera enfin l'absence d'harmonisation au niveau des valeurs mathématiques ou combinaisons de valeurs mathématiques qui sont utilisées pour définir les directives et les normes (moyenne géométrique, médiane, moyenne arithmétique, valeurs à ne pas dépasser dans plus de 10% ou 20% des échantillons etc...).

A l'intérieur même d'un pays comme la France, presque rien n'est standardisé et les points suivants sont sujets à critique :

- choix des points de surveillance
- fréquences de prélèvements
- heures de prélèvements
- méthodes d'analyse
- méthodes d'interprétation

2 Représentativité de l'échantillonnage et interprétation des résultats

On le sait, les bactéries intestinales "témoins de pollution fécale", sont rejetées en mer par divers émissaires, estuaires ou égouts et y disparaissent ensuite progressivement, après dispersion par les courants locaux, notamment les courants de marée de certaines régions, qui sont des courants alternatifs, de période 12H30 environ, parallèles à la côte, avec une "excursion" souvent supérieure à 10Km. Les panaches de rejet sont donc très changeants.

D'où une variabilité parfois importante de la qualité microbienne des eaux. La Figure 3 illustre ceci par un exemple extrême : la densité des Escherichia coli, relevée toutes les deux heures pendant 48 heures sur une plage du Nord en Mai 1982, montre en effet des oscillations importantes puisqu'il y va d'un facteur 10, voire 100, avec des pics de période 12H30 comme les courants de marée. Ces pics coïncident ici avec les maxima du courant de flot, mais sur d'autres plages les pics sont au contraire à basse mer, ou intermédiaires : tout dépend de la position du point d'échantillonnage par rapport au rejet ou à l'estuaire le plus proche. Mais des variations de ce type, biquotidiennes, peuvent exister partout dans les régions à marée.

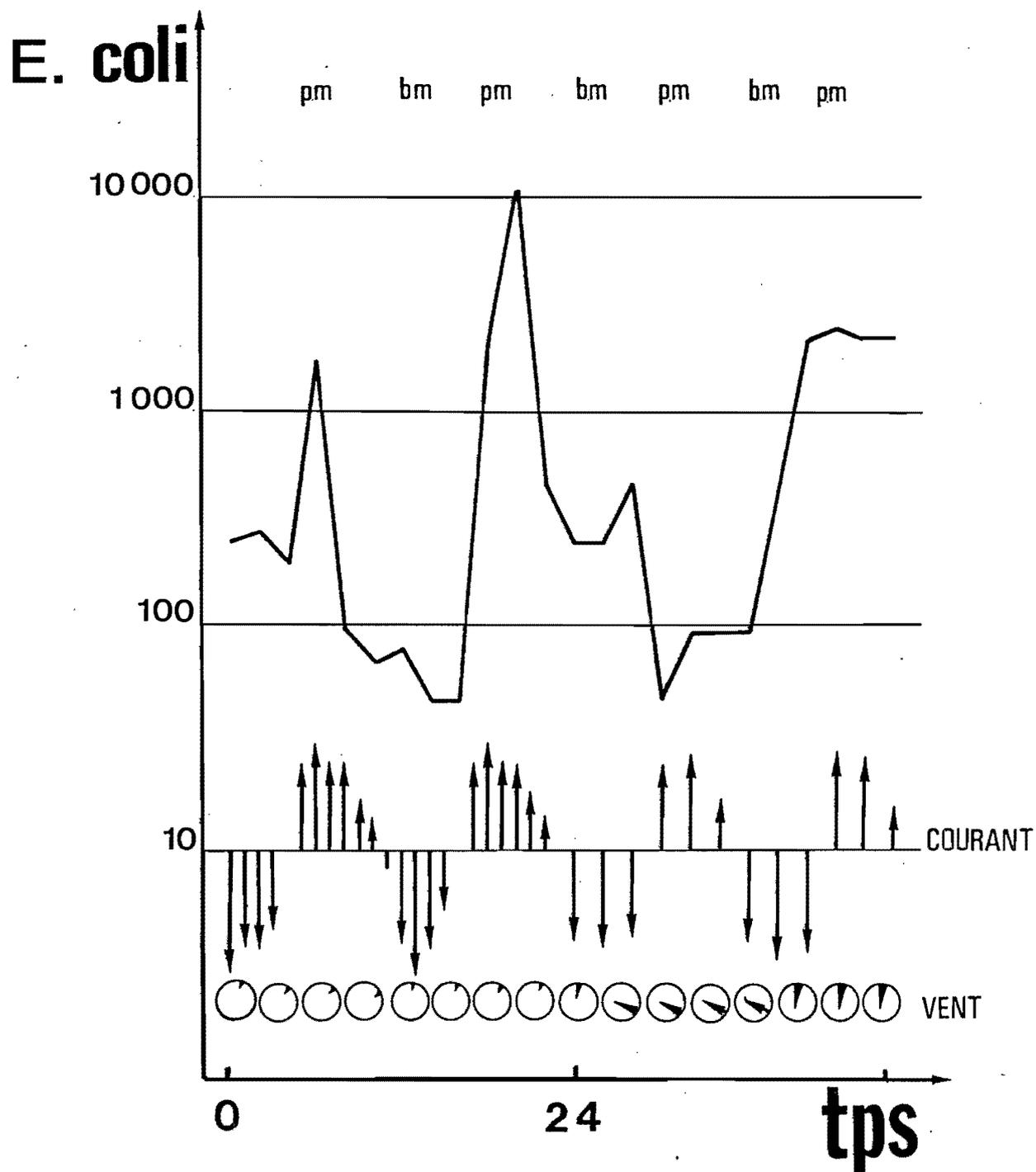
Le classement des zones de baignade est établi, lui, sur la base de prélèvements hebdomadaires, et ne peut donc pas rendre compte de ces oscillations biquotidiennes.

D'ailleurs pour mieux prendre en compte ces oscillations de qualité, les Services Sanitaires de la Région Nord ont décidé de substituer dorénavant au prélèvement hebdomadaire unique à pleine mer, un prélèvement double (pleine mer et basse mer), pour 15 des 50 points de surveillance, en particulier les plus proches d'estuaires, de ports ou de rejets reconnus.

On voit donc que les questions de choix des points de surveillance et d'heures de prélèvement sont inséparables et qu'il est fort possible d'introduire dès ce niveau un biais dans les séries de résultats.

FIGURE 3

VARIABILITÉ DE LA DENSITÉ DES ESCHERICHIA COLI
BRAY-DUNES CENTRE MAI 1982



Par ailleurs le nombre de prélèvements par saison reste mal défini : certaines plages françaises en subissent moins de 10, d'autres une vingtaine. Quand on sait qu'il existe au "classement" une tolérance de dépassement pour 5% d'échantillons, il n'est pas indifférent d'en faire 21 ou 19 !

Une appréciation de la contamination plus scientifique que le classement en catégories discrètes (A,B,C,D), consiste à faire une représentation gaussio-logarithmique des résultats et à déterminer la valeur médiane de la contamination et sa variabilité (pente de la droite de Henry ajustée aux résultats).

Cependant d'autres points plus urgents doivent être réglés: la mesure de certains risques non fécaux, et la question des méthodes.

Mesure des risques non fécaux :

Pour l'instant on doit recommander de rechercher l'amibe Naegleria fowleri en aval des installations thermiques en eaux douces (échangeurs de chaleur, condenseurs, tours de refroidissement et autres aéroréfrigérants, notamment des centrales électriques thermiques) et toutes autres sources d'échauffement en eaux douces. Ce risque est absent en mer.

La recherche des Legionella en eaux douces semble inutile puisqu'aucun cas n'a été rapporté à la baignade dans le monde actuellement et que cette affection est, elle, curable.

De même la recherche des vibrions marins indésirables semble inutile pour la baignade, sauf peut-être localement celle de V.parahaemolyticus en estuaires, mais plus pour l'aspect conchylicole que balnéaire.

Méthodes d'analyse :

Les directives européennes et circulaires d'application françaises laissent le choix aux laboratoires, pour les méthodes d'analyse, entre plusieurs modes opératoires très différents (tableau 20) :

- dans leur principe : dénombrement de colonies sur milieux solides, ou par extinction - dilution en milieux liquides avec utilisation de la méthode statistique du "NPP" ;

- par les milieux et autres conditions de sélection mis en oeuvre (température, temps d'incubation, tests de confirmation, etc...)

Cette incohérence amène ainsi non seulement des différences de quantification, mais conduit même à dénombrer des groupes bactériens différents, comme on va le voir ci-après (tableau 23).

C LES METHODES DE MESURES : FILTRATION OU NPP ?

. Deux types de méthodes font l'objet de normes et sont administrativement équivalentes actuellement (tableau 20) :

- les méthodes par filtration sur membrane et culture sur gélose;
- les méthodes par culture en milieux liquides (dites du "Nombre le Plus Probable" ou "NPP").

1 Les méthodes par filtration sur membrane

Il s'agit de méthodes de dénombrement direct largement utilisées pour les eaux d'alimentation et les eaux peu chargées en matières en suspension en général.

Elles consistent à filtrer un certain volume d'eau à analyser (ou de ses dilutions) sur une membrane (porosité moyenne = 0,45 microns), puis à placer cette dernière sur un milieu gélosé sélectif. Après incubation à une température plus ou moins sélective, le nombre de bactéries s'obtient directement en comptant le nombre de colonies formées.

En supposant que les bactéries sont réparties au hasard sur le filtre, le nombre de colonies ne doit pas excéder 120 pour respecter la loi de Poisson (STELLMANN 1977 (134)), voire être compris entre 20 et 80 selon GELDREICH 1981 (135).

2 Les méthodes par culture en milieux liquides (avec Calcul du Nombre le Plus Probable)

. Ce sont des méthodes de dénombrement indirect, reposant non plus sur un simple comptage mais sur une estimation statistique du nombre de germes présents dans un échantillon d'eau. Elles sont aussi largement utilisées, en particulier pour les eaux chargées en matières en suspension.

. Une série de dilutions décimales successives est réalisée à partir de l'eau à analyser. Avec cette dernière et chacune de ses dilutions, on inocule un nombre n de tubes de milieux nutritifs (sans agent sélectif) mis en incubation de 24 à 48h. à une température non sélective : c'est le test présomptif. Les tubes positifs sont repiqués dans des tubes de milieux sélectifs mis en incubation de 24 à 48h. à une température sélective : c'est le test confirmatif. Les tubes positifs sont alors comptés.

. En supposant qu'un certain nombre de conditions soient réalisées (micro-organismes distribués au hasard dans l'échantillon, n'exerçant ni force d'attraction ni force de répulsion etc...), la loi de Poisson permet le calcul du Nombre le Plus Probable par unité de volume, en connaissant le nombre de réponses positives dans une série de trois dilutions à n tubes. De plus, il est possible d'affecter à ce nombre un intervalle de confiance, ainsi qu'un niveau de probabilité. Ces paramètres, pour les protocoles les plus fréquents (3 ou 5 tubes par dilution décimale), sont réunis dans des tables (DE MAN J.C. 1975 (136)).

. A côté de ces 2 types de méthodes existent un certain nombre de techniques : Immunofluorescence (137), "Pour Plate Count Method" (138), Electrochimie (139), recherche du Coprostanol et autres stéroïdes fécaux par chromatographie (140) (141), Mesure d'activité métabolique par traceur radioactif (142) etc... Actuellement aucune d'elles n'est parfaitement satisfaisante (mise en oeuvre trop difficile, seuil de sensibilité trop élevé, manque de spécificité, volume analysé $\langle 1$ ml, etc...), et ne fait l'objet de normes. Il est cependant permis de penser que dans l'avenir, certaines puissent être appelées à se développer.

3 Critiques

a) Répétabilité

Pour certains auteurs (THOMAS 1955 (143), GELDREICH 1981 (135)) l'estimation du nombre le plus probable (NPP), corollaire obligé de l'utilisation des milieux liquides, entraîne un "manque de précision". En fait ce qui est en question est la répétabilité et le calcul d'une fourchette de probabilité. Ainsi le résultat NPP = 150/ml a en fait 95% de chances d'être compris entre 30 et 440/ml. Le système d'ensemencement multiple permet d'évaluer cette probabilité. Au contraire, la boîte unique, ensemencé avec une seule membrane, fournit un chiffre unique, qui loin d'être "le" chiffre exact, constitue en fait une information bien plus pauvre que le NPP, et sa prétendue précision ne résiste pas mieux à l'expérience des répétitions. Les deux systèmes de mesures, toutes choses égales par ailleurs (et notamment composition des milieux) sont en réalité tout à fait comparables sur le plan statistique (THIERS et TRIGUL (144), MIDDLEBROOKS et al. (145), SEYFRIED (146)).

En tout état de cause, la répétabilité des résultats ne constitue pas un critère très important pour le choix des méthodes quand on considère

- 1) la grande variabilité de la contamination des plages dans le temps (figure 3)
- 2) la grande différence de rendement entre cultures sur milieux solides et sur milieux liquides.

b) Rendement comparé sur milieux liquides et solides

L'emploi de milieux liquides permet en effet une étape de "revivification" en milieu non sélectif, avant confirmation dans les conditions sélectives que supportent les cellules bactériennes cultivées en milieux riches (bactéries fécales fraîchement émises, cultures sur bouillon nutritif,...) mais que supportent très mal les cellules "stressées" par un séjour prolongé en mer, en l'absence de nutriments et en conditions hostiles,... Les cellules "stressées" étant parfois les plus nombreuses, l'emploi direct de conditions sélectives (température élevée de 44,5°C, présence de désoxycholate, etc...) conduit à sous-estimer d'un facteur deux ou trois et parfois dix, la population fécale réelle.

Ce problème dépend beaucoup de la composition des milieux et sera détaillé plus loin.

c) Prix de revient

Les avis sont partagés en ce qui concerne le coût des deux méthodes. Pour certains la filtration donne lieu à une manipulation réduite et rapide (147). Pour d'autres la membrane elle-même est chère et sa lecture exige du personnel plus qualifié (148) que la méthode en NPP. Pour d'autres cependant celle-ci exige un coût relativement important en temps de travail, et en quantité de milieux (149).

Thiers et Trigul (144) quant à eux ne trouvent pas de différences de prix entre les deux techniques mais préconisent pour diminuer le coût de la filtration de laver et réutiliser les membranes après emploi !

4 Coliformes : méthodes et milieux

Les deux méthodes de dénombrements précédemment décrites sont utilisées couramment pour le dénombrement des coliformes :

- méthode par filtration sur membranes, et
- méthode en tubes multiples dite du NPP.

Nous en avons vu les limites générales mais, pour le cas particulier des coliformes, il s'ajoute que de très nombreuses différences ont été observées entre les marques de membranes filtrantes (Tableaux 21 et 22). Suivant la forme des pores, le quadrillage, le mode de stérilisation des filtres, le nombre de coliformes trouvés dans un même eau peut être très variable, et une standardisation s'avère nécessaire là aussi.

Pour le dénombrement sur membranes filtrantes, certains milieux gélosés contiendront uniquement du lactose, un indicateur de pH et un inhibiteur des bactéries Gram+, d'autres de la fuschine basique et du sulfite de sodium qui donneront un aspect métallique verdâtre typique aux colonies de coliformes.

Quelle que soit la méthode utilisée, la recherche des Coliformes totaux doit être réalisée en deux étapes, avec, après un test présomptif, un test confirmatif pour vérifier l'aptitude à produire du gaz (non visible sur les membranes) et l'absence d'oxydase.

En tubes multiples, les milieux sont à base de lactose, et munis de cloches de Durham permettant d'évaluer la production de gaz due à la fermentation du sucre en 48h à 35°-37°.

Le dénombrement des Escherichia coli sera réalisé soit à partir de celui des coliformes totaux en une étape supplémentaire, soit directement par filtration ou en tubes multiples (NPP).

Dès 1904, Eijkman (152) observe que les coliformes des animaux à sang chaud peuvent être différenciés de ceux des animaux à sang froid par leur aptitude à produire du gaz à 46° dans un milieu à base de glucose.

Le principe de la recherche des Escherichia coli reste toujours fondé sur cette observation et sur celle de Leitner en 1929 (153) d'après laquelle la combinaison : test d'Eijkman et production d'indole à 44°5 est spécifique de Escherichia coli.

TABLEAU 21

Summary of Previous Comparative Studies on the Recovery of Bacteria from Water by Different Brands of Membrane Filters in (D)

Number	Investigator(s)	Source (sample/culture) of coliforms	Type of membrane filters compared	Observations
1	Presswood and Brown (1973)	<i>Escherichia coli</i> type I, isolated by mFC method from river water and domestic sewage	Gelman (GN-6), autoclaved Millipore (NAWG 04750) ethylene oxide-sterilized	Gelman filters recovered significantly more fecal coliform bacteria than Millipore filters.
2.	Dutka et al. (1974)	River water/ Burlington Canal water	Gelman (GN-6), autoclaved, CNA Millipore (NAWG 047A0), autoclaved-MA Millipore (NAWG 04750), ethylene oxide-sterilized-ME Sartorius (11406), autoclaved-SA Sartorius (13706), ethylene oxide-sterilized-SE	<i>March study:</i> Gelman superior to both types of Millipore and Sartorius for the recovery of total coliforms; for fecal coliform recovery, Gelman were superior to Sartorius but equivalent to Millipore. <i>June study:</i> Gelman superior to Millipore (MA) and Sartorius (SE) and equivalent to Millipore (ME) and Sartorius (SA) for total coliform recovery; all filters were equivalent for fecal coliform recovery.
3.	Harris (1974)	Unchlorinated water	Gelman Millipore	Gelman superior to Millipore for fecal coliform recovery.
4.	Hufham (1974)	<i>E. coli</i> (ATCC 11775) <i>Enterobacter aerogenes</i> (ATCC 13048) An mFC isolate IMVIC type I from lake water	Gelman (GA-6), autoclaved Millipore (NAWG 04750), ethylene oxide-sterilized	Gelman equivalent to Millipore for total coliform recovery but superior for fecal coliform enumeration.
5.	Schaeffer et al. (1974)	Natural water	Gelman Millipore	Gelman superior to Millipore for total coliforms but equivalent for fecal coliform recovery.
6.	Brodsky and Schiemann (1975)	River water samples	Millipore (NAWG 04750), ethylene oxide-sterilized Sartorius (11456), ethylene oxide-sterilized Johns-Manville (045HD475G), ethylene oxide-sterilized Johns-Manville (045HD47AG), autoclave sterilized Gelman (GN-6), autoclave sterilized	With EC broth cultures of water samples, Johns-Manville superior to Sartorius but not different from Millipore for fecal coliform recovery; with EC broth cultures, no differences among Johns-Manville, Millipore, and Sartorius for the recovery of total coliforms; using river water samples, Johns-Manville superior to Sartorius but equivalent to Millipore for total coliform recovery; no differences among Johns-Manville, Millipore, and Sartorius for recovery of fecal coliform from river water samples, Gelman equivalent to Millipore for fecal coliform recovery from river water samples.
7.	Green et al. (1975)	Nonchlorinated sewage effluent, surface waters receiving sewage, farm runoff, and industrial effluents	Millipore (MA), ethylene oxide-sterilized Millipore (MC), ethylene oxide-sterilized Gelman (GN-6), autoclave sterilized Schleicher and Schuell (B-9, 6754, 4753), autoclave sterilized Schleicher and Schuell (5053), ethylene oxide-sterilized Sartorius nitro-cellulose, autoclaved and ethylene oxide-sterilized Johns-Manville (416C92), ethylene oxide-sterilized	Ranked membranes for the enumeration of fecal coliform in order of decreasing recovery as follows: Millipore MC > Gelman > Johns-Manville = Sartorius > Millipore MA > Schleicher and Schuell.

TABLEAU 22

Membrane Filter Flow Rates and *E. coli* Recovery from Three Types of Waters
(a) Filtration and incubation grid side up IN (D)

Membrane	Count range, five replicates	Mean number of colonies/ 100 ml	Significance of F	Flow rate (sec/100 ml)	Flow rate rank	Significance
Normal chlorinated tap water (0.25 mg total residual chlorine/liter)						
Johns-Manville SG	28-158	85	A-B ^a	12.4	3	A-B ^a
Johns-Manville AG	37-164	83		4	B ^b	A-C ^a
Sartorius 13806	38-168	83		2	b	A-D ^a
Millipore HC	28-151	82		1	A ^b	B-C ^a
Gelman	34-153	82		6	C	B-D ^a
Oxoid	34-140	81		9	D	C-D ^a
Sartorius 11406	24-143	66		5	C	
Millipore SO	17-117	49		7	D	
Millipore AO	11-113	44	8	D		
Membrane-filtered Lake Ontario water						
Millipore HC	150-266	229	A	4.7	1	A-B ^a
Gelman	200-245	218	A	14.0	6	C
Johns-Manville SG	184-216	192	A	10.0	2	A-C ^a
Johns-Manville AG	148-218	183	B	10.1	3	A-D ^a
Sartorius 13806	111-257	177	B	10.2	4	B-C ^a
Sartorius 11406	69-154	107	C	11.3	5	B-D ^a
Millipore AO	17- 53	68	C	14.6	7	C
Oxoid	14- 50	42	D	17.2	9	
Millipore SO	10- 63	28	D	15.7	8	
Membrane-filtered Hamilton Bay water						
Millipore HC	215-245	240	A	4.8	1	A-B ^a
Gelman	191-277	233	A	11.2	5	A-C ^a
Sartorius 13806	133-270	216	A	9.4	2	A-D ^a
Johns-Manville AG	135-222	178	B	10.6	4	B-C ^a
Johns-Manville SG	131-209	175	B	10.3	3	B
Sartorius 11406	105-186	147	B	11.8	6	
Millipore AO	43-164	107	C	15.4	8	C
Millipore SO	24- 85	58	C	13.2	7	B
Oxoid	34- 82	51	D	18.1	9	C

^aSignificant difference at 1% level.

^bGroups marked by or enclosed by same letter not significantly different at 5% level.

^cSignificant different at 5% level.

(b) Filtration and incubation grid-side down

Membrane	Count range, five replicates	Mean number of colonies/100 ml	Flow rate (sec/100 ml)	Flow rate rank
Normal chlorinated tap water (0.25 mg total residual chlorine/liter)				
Millipore HC	65-172	113	6.0	1
Johns-Manville AG	48-178	109	15.2	4
Johns-Manville SG	38-170	97	11.0	2
Sartorius 11406	31-140	82	16.6	5
Oxoid	32-132	77	27.5	8
Millipore AO	19-149	68	20.6	7
Millipore SO	22-141	66	18.3	6
Sartorius 13806	11-122	65	12.2	3
Gelman	11-128	49	33.0	9
Membrane-filtered Lake Ontario water				
Millipore HC	186-274	227	4.9	1
Johns-Manville AG	128-217	179	11.9	5
Sartorius 11406	110-187	146	11.6	4
Oxoid ^a	71-143	113	17.1	9
Sartorius 13806	34-104	75	10.9	3
Johns-Manville SG ^a	8- 87	44	9.8	2
Millipore AO ^a	19- 41	32	13.9	7
Millipore SO ^a	5- 15	11	14.7	8
Gelman ^a	6- 9	8	13.4	6
Membrane-filtered Hamilton Bay water				
Millipore HC	198-265	236	4.7	1
Sartorius 11406	142-196	164	11.5	6
Johns-Manville AG	135-180	155	11.4	5
Millipore AO	37-174	124	14.8	8
Oxoid ^a	108-143	122	17.2	9
Sartorius 13806 ^a	60-160	107	8.7	2
Johns-Manville SG ^a	39- 97	66	10.6	3
Millipore SO	15- 59	38	13.0	7
Gelman ^a	6- 59	26	10.6	4

^aMembranes showing significant difference (5% level) on recovery rates from grid-up membranes.

PRINCIPAUX MILIEUX UTILISES POUR LA RECHERCHE DES COLIFORMES TOTAUX

1) PAR FILTRATION

- Milieu d'Endo - décrit par Endo (154) en 1904 et modifié par Fifield et Schaufus (155) en 1958.
- milieu recommandé par les Standard Methods américaines depuis 1946. Très utilisé en Europe du Nord et de l'Est.
 - contient de la fuschine basique et du désoxycholate; modifié par Mc Carthy (156) en 1961 (LES-Endo agar).
 - les colonies doivent être vérifiées par repiquage en bouillon lactosé au vert brillant (Gaz)
 - T : 35 - 37° ; 24 à 48h.
- Milieu TTC + Tergitol 7 - décrit par Chapman en 1947 (157)
- contient du lactose et un indicateur de pH
 - recommandé par le J.O. (27/3/62) en France pour les analyses d'eaux d'alimentation
 - les colonies doivent être vérifiées par repiquage sur Kligler (gaz) et Gélose (oxydase)
 - T : 37° ; 24 à 48h.
- Milieu au Teepol 610 - décrit par Jameson et Emberley (158) en 1956 et modifié par Burman en 1967 (159)
- contient du lactose et du Teepol 610 à la place de sels biliaires (plus stable et moins inhibiteur)
 - recommandé par "Reports on Public Health and Medical Subjects N° 71" en Grande-Bretagne 1969
 - les colonies doivent être repiquées en milieu liquide (Vert Brillant) et solide (Mac Conkey) pour vérification (gaz et oxydase)
 - T : 35 - 37° ; 48h.

2) EN NPP

Test présomptif

- Milieu au lactose - décrit par Phelps et Hammond (160) en 1909. Recommandé dès 1912 dans les ST. Methods américaines jusqu'à nos jours. Recommandé en France et dans la CEE ainsi qu'au Japon pour les eaux naturelles.
- T : 30° ; 48h.
- Milieu de Mac Conkey - décrit par Mac Conkey en 1909 (161) et Muer et al (162) en 1920 : modification du précédent par adjonction de sels de bile pour éliminer les Clostridium
- très utilisé en Benelux et en Afrique du Sud
 - T : 37° ; 48h.

- Milieu au lauryl Tryptose - décrit par Mallmann et Darby en 1941 (163) et par Cowls (164) qui remplace les sels biliaires non stables du milieu précédent par du lauryl sulfate
- recommandé dans la dernière édition des St. Methods avec le milieu au lactose. Très utilisé en Grande-Bretagne, en Malaisie et au Canada
 - T : 37° ; 48h.

- Milieu au Glutamate - décrit par Folpner en 1948 (165) et modifié par Gray en 1964 (166) élimine les problèmes dûs à la variabilité des ingrédients : milieu synthétique.
- recommandé en Allemagne Fédérale et en Nouvelle Zélande.
 - T : 37° ; 48h.

Test confirmatif

- Pour les Coliformes totaux - isolement des tubes positifs sur milieu de culture gélosé afin de vérifier l'absence d'oxydase
- ou repiquage des tubes positifs dans des tubes de bouillon bilié au vert brillant afin de vérifier la production de gaz en présence de sels biliaires.
- Pour Escherichia coli - test de Mackenzie (167) réalisé soit en 2 tubes (Vert Brillant ; Eau Peptonée) soit en 1 seul (Milieu de Schubert- Fennel), et consistant à rechercher la fermentation du lactose avec production d'indole à 44,5°C en 24 à 48h.

PRINCIPAUX MILIEUX UTILISES POUR LA RECHERCHE DIRECTE DES ESCHERICHIA COLI

(autres que ceux utilisés pour les Coliformes Totaux et que certains utilisent à 44°C)

1) PAR FILTRATION

milieu mFC (en fait pour "Coliformes fécaux")

- décrit par Geldreich et al, 1965 (168)
- contient du lactose, des sels de bile et de l'acide rosolique
- recommandé par les ST. Methods américaines de 1973
- T : 44,5°C ; 24h.

milieu mTEC - décrit par Dufour et al en 1981 (169)

- contient du lauryl sulfate et du désoxycholate. Test Urée réalisé sur le filtre pour éliminer les Klebsiella

milieu mC - décrit par Dufour et Cabelli en 1975 (170)

- milieu complexe contenant des sels biliaries mais peu selectif
- permet 3 tests in situ sur le filtre (urée, oxydase et indole)
- T : 35° ; 24h.

2) EN NPP

milieu A₁ - décrit par Andrews et Presnell en (171) 1972

- contient de la salicine et du Triton X 100
- recommandé par les ST. Methods américaines
- T : 44,5°C ; 24h.

milieu EC - décrit par Hajna et Perry (172) en 1972

- recommandé par les ST. Methods américaines comme test confirmatif surtout
- T : 44,5° ; 24h.

TABLEAU 23

Méthodes bactériologiques utilisées par les 28 laboratoires français
chargés de la surveillance des eaux de baignade en mer (en 1981)

	MILIEUX SOLIDES (membranes filtrantes)				MILIEUX LIQUIDES (avec NPP)			
	Test présomptif		Test confirmatif		Revivification		Confirmation	
	Nb de labos	Milieux utilisés	Nb de labos	Milieux utilisés	Nb de labos	Milieux utilisés	Nb de labos	Milieux utilisés
"Coliformes Totaux" (CT)	13	12 Gélose lactosée au tergitol et TTC 1 Brillant Green agar	5 8	2 Tests IMVIC 1 Kligler 1 Vert Brillant 1 Kligler rien	18	7 Bouillon lactosé avec BCP 10 Bouillon lactosé sans BCP 1 Bouillon Mac Conkey	11 7	Bouillon au Vert Brillant rien
<u>Escherichia coli</u> ou "Coliformes fécaux"	13	1 (même membrane que CT) 12 Gélose lactosée ou tergitol et TTC 1 Brillant Green agar	1 7 6	Citrate Indole Oxydase 4 Test de Makenzie 2 Tests IMVIC 1 EMB + Kligler rien		Enrichissement 18 commun pour les CT et CF	18	4 Bouillon ou Vert Brillant 14 Test de Mackenzie complet
"Streptocoques fécaux" (SF)	14	8 Slanetz 6 Enterococcus agar	5 9	3 Litsky 2 Esculine agar rien	18	Rothe	18	17 Litsky 1 Esculine agar

A noter que certains labos déclarent utiliser à la fois les milieux liquides avec NPP et la filtration avec culture sur gélose, pour les Coliformes et Escherichia coli (3 labos) et pour les streptocoques (4 labos).

De très nombreux travaux ont été réalisés pour comparer les différentes méthodes de dénombrement des coliformes dans les eaux de baignade. Cependant peu d'auteurs ont comparé ce qui est vraiment comparable, i-e les dénombrements par filtration entre eux (avec des filtres comparables), ou les dénombrements en milieux liquides entre eux.

Le tableau 24 indique les comparaisons effectuées depuis 1974.

En ce qui concerne les milieux liquides utilisés à 35-37°C comme test présomptif, il semble que le Milieu Minéral modifié au Glutamate soit celui qui donne les meilleurs résultats. De plus il est stable (problèmes de peptone et sels biliaries éliminés), et il est le moins cher de tous, d'après BARROW (in : D).

Pour les milieux utilisés avec les membranes, il est clair actuellement que le milieu d'ENDO pose de nombreux problèmes (trop inhibiteur pour les coliformes eux-mêmes, peu reproductible du fait des variations entre lots de fuschine basique). Le milieu au TTC et Tergitol 7 recommandé en France semble être le plus souvent préconisé (179).

Quant aux milieux pour "coliformes fécaux", ils sont de plus en plus abandonnés au profit de nouveaux milieux tels le mTEC qui permettent plusieurs tests sur les colonies en place (urée, indole, oxydase) et détectent ainsi les Escherichia coli thermotolérants. Mais ces recherches directes à haute température (44,5°C), si elles présentent l'avantage d'être rapides (une seule étape, 24h), posent le problème de la revivification, ou récupération des cellules "stressées", par la chloration, l'irradiation solaire, l'absence de nutriments et autres facteurs au cours du séjour en eau de mer ou autres situations hostiles.

"Stress " et revivification

Le premier, TAYLOR en 1955 (184) a proposé une pré-incubation de 2 heures à 37°C avant transfert des membranes filtrantes à la température sélective de 44°C pour 24h. Puis Mc CARTHY en 1961 (156) a montré qu'avec les eaux de surface les dénombrements réalisés en milieux liquides (NPP) étaient supérieurs de 50% à ceux obtenus par filtration et culture sur milieu gélosé d'ENDO.

TABLEAU 24

Références de quelques comparaisons récentes de milieux

pour dénombrement de coliformes

TECHNIQUE	AUTEUR	ANNEE	REFERENCES	MILIEUX
<u>Filtration</u> (MF)	DUFOUR	1975	170	mC et m-Endo
	OPARA	1977	173	Teepol 610 et Triton X100
	DUTKA	1979	174	mC, mFC, Mac Conkey, Teepol 610
	EVISON	1980	175	mFC et Teepol 610
	P.H.L.S.	1980	in (D), Chap.11	m-Tergitol 7 et Teepol 610
	GRABOW	1981	in (D), Chap.14	LES-Endo, Teepol, mFC, Mac Conkey
	PAGEL	1982	176	mFC, mTEC, Mac Conkey
	LICHTIGFELD	1982	177	m-Endo et Mac Conkey
	Mc FETERS	1982	178	24 milieux
	LE CHEVALIER	1983	179	m-Endo et m-Tergitol 7
<u>MILIEUX</u>	ALIVISATOS	1975	180	Mac Conkey et Glutamate
<u>LIQUIDES</u>	PAPADAKIS	1975	181	
(NPP)	HUNT	1978	182	EC, A ₁ , et A ₁ modifié
(test pré-somptif)	MIESCIER	1978	183	
	DUTKA	1979	174	A ₁ , EC, Mac Conkey et Glutamate
	P.H.L.S.	1980	in (D), Chap.11	Glutamate et Lauryl Tryptose Broth
	GRABOW	1981	in (D), Chap.14	Glutamate, et Mac Conkey

Les travaux sur la revivification des bactéries "stressées" sont très nombreux actuellement (BISSONNETTE, 185 ; HACKNEY, 138 ; STUART, 186 ; entre autres). Certains préconisent pour une meilleure revivification, d'employer des filtres à pores coniques (LIN, 187 ; TOBIN et DUTKA, 188 ; SLADEK, 189). D'autres préfèrent la méthode de TAYLOR (184) qui permet une meilleure acclimatation à la température élevée de 44°C. D'autres encore préconisent une double couche de milieu de culture non sélectif (ROSE et al., 190) ou un passage de la membrane, quelques heures, sur milieu nutritif non sélectif à basse température. Après un tel traitement, selon LIN (150) le nombre de coliformes est supérieur de 50% à celui obtenu en une seule étape, et serait donc identique au résultat du NPP. Pour d'autres auteurs (GREEN et al., 151), il ne dépasse pas 14 à 68% de celui obtenu en NPP, dans des eaux chlorées.

Le travail récent de Mc FETERS, 1982 (178) montre que les sels biliaires et particulièrement le désoxycholate sont néfastes à la revivification des bactéries stressées et démontre ainsi pourquoi certains milieux pour coliformes ont des rendements si faibles (tableaux 25, 26 et 27).

Il est donc sûr actuellement que le dénombrement des coliformes et surtout des Escherichia coli, en milieux liquides (test présomptif + test confirmatif, avec NPP), est préférable pour la récupération des cellules bactériennes stressées, car il permet une première étape de 48h en conditions non sélectives (35-37°, milieu lactosé sans inhibiteurs) qui permet une revivification efficace.

TABLEAU 25

Influence du milieu sur la récupération de Coliformes stressés (a)

(Mc FETERS et al., 1982, Appl. Environ. Microbiol., 43 : 100)

Medium	% Recovery (range) ^a		% Deoxycholate or related compounds
	Injured	Healthy	
Group I			
Triple sugar iron	181	106	0
Nutrient alginate	125	88	0
Minerals modified glutamate	99	106	0
Tergitol 7	86 (71-101)	99	0
Boric acid	84	92	0
TLY + 0.1% Tween 80	72	ND ^c	0
Group II			
Lactose broth	72 (47-98)	102	0
<i>m</i> -Endo	66 (30-102)	93	0.1; 0.005 ^f
Lauryl tryptose	56 (34-79)	98	0.01 ^f
Levines EMB	42 (37-47)	119	0
3V	39	95	NA ^g
Purple serum	38	56	0
EE	38	106	2.0 ^d
Brilliant green bile 2%	34 (18-51)	106	2.0 ^d
Deoxycholate lactose	26	94	0.05
Group III			
Eosin methylene blue	24 (7-42)	102	NA
Violet red bile	12	99	1.5 ^e
<i>m</i> -FC at 44.5°C	7 (4-10)	105	1.5 ^e
MacConkey	5	97	0.1 ^e
GN	4	71	0.05
TLY-D	2	82	0.10
XLD	0	40	0.25

^a Coliforms tested include: *Escherichia coli* (two strains), *K. pneumoniae*, *C. freundii*, and *Enterobacter aerogenes*.

^b (Percent recovery) = $\{[(\text{CFU selective medium})/(\text{CFU TLY})] \times 100\}$. Injury was between 90 and 99%. The range for injured coliforms is calculated from seven repetitions, using five coliforms over a 1-year period.

^c ND, Not done.

^d Oxgall.

^e Bile salts.

^f Lauryl sulfate.

^g NA, Not available.

TABLEAU 26
(DUTKA et al, 1979 réf. 174)

Comparison of corrected coliform, fecal coliform, and Escherichia coli densities* incubated at 44,5°C, based on isolate identifications^a Burlington Canal, August 1976

Media	Coliform		Corrected coliform ^b		Fecal coliform		Escherichia coli	
	43.0°C	44.5°C	43.0°C	44.5°C	43.0°C	44.5°C	43.0°C	44.5°C
mC Agar	130	42	130	42	119	35	99	32
mFC Agar	120	90	120	86	95	75	79	68
MacConkey Agar No. 3	500	94	500	94	312	70	181	56
Membrane Enriched Teepol Broth	140	83	134	83	70	66	40	50
A-1 Broth	<u>700</u>	<u>170</u>	<u>646</u>	<u>170</u>	430	<u>170</u>	286	<u>170</u>
LT-BGB 2Z-EC	460	140	360	140	345	126	259	113
MacCONKEY Broth (purple)	<u>700</u>	110	<u>646</u>	110	<u>538</u>	97	<u>493</u>	97
Minerals Modified Glutamate Medium	460	110	460	110	348	110	319	110

* per 100 ml.

^a EC, INVIC, Ornithine Decarboxylase, H₂ S, Motility.

^b Oxidase Negative.

TABLEAU 27

Comparaison de 3 milieux pour dénombrement d'Escherichia coli.

DUFOUR, A.P. 1977, in B : 56

Sample Number	<i>E. coli</i> counts on:					
	mTEC		TBA		Teepol	
	Presumptive	Verified ^a	Presumptive	Verified	Presumptive	Verified
1	45	43	29	23	34	34
2	20	17	24	18	26	9
3	11	9	12	5	42	12
4	2	2	4	3	44	4
5	73	73	22	16	47	46
6	21	21	9	7	20	14
7	26	26	6	6	32	10
Totals	198	191	106	78	245	129
<i>E. coli</i> , %		96		73		52

^aVerified as citrate negative, urease negative, oxidase negative, and indole positive.

5 Dénombrement des Streptocoques Fécaux

Les méthodes les plus courantes pour le dénombrement des Streptocoques Fécaux sont, comme pour les Escherichia coli et coliformes totaux, la filtration sur membrane et la dilution en tubes multiples (NPP).

Au sujet des membranes filtrantes, trois comparaisons ont été effectuées avec des streptocoques, par DUTKA en 1974 (191), LIN en 1976 (192) et DAVENPORT en 1976 (193), et les trois auteurs arrivent à la même conclusion : il n'y a pas, pour le dénombrement des streptocoques fécaux, de différence significative entre les diverses marques commerciales.

Tous les milieux de culture pour streptocoques fécaux contiennent de l'azide de sodium (Na N_3), inhibiteur de la plupart des bactéries aérobies et anaérobies facultatives. Seuls les streptocoques et autres bactéries lactiques cultivent sur ces milieux. Certains renferment en plus de l'esculine (hétéroside) et des sels biliaires, car seuls les streptocoques fécaux sont capables de cultiver et d'hydrolyser l'esculine en présence de 40% de bile. Les différences entre milieux proviennent essentiellement de sources de sucres et protéines.

Parce qu'il permet la croissance de Streptococcus bovis, S. mitis et S. salivarius, le milieu KF est considéré par beaucoup comme le meilleur pour la recherche de tous les streptocoques fécaux : GELDREICH 1976 (201), KENNER et al. 1961 (194) ; PAVLOVA et al. 1972 (202) ; DAOUST and LITSKY 1975 (24) ; SWITZER and EVANS 1974 (203).

Le milieu PSE, plus récent, nécessite une incubation moins longue mais il est difficile d'interprétation lorsqu'il est utilisé avec les membranes filtrantes. Les auteurs ci-dessus le considèrent comme équivalent au KF.

PRINCIPAUX MILIEUX UTILISES

1) POUR FILTRATION ET ETALEMENT ("pour plate")

- Milieu KF - décrit par KENNER et al. en 1961 (194)
 - recommandé par les Standard Methods Américaines pour les eaux neuves, les eaux de mer et les eaux usées non chlorées.
 - permet la croissance de tous les streptocoques fécaux.
 - T : 35°C, 48h.
- m-Enterococcus Agar (Slanetz) - décrit par SLANETZ et BARTLEY en 1957 (195) et principalement utilisé en Europe.
 - recommandé par l'OMS (in B)
 - permet la croissance des Entérocoques ou des streptocoques du Groupe D
 - T : 35°C, 48h.
- Pfizer Selective Enterococcus (PSE) - décrit par ISENBERG et al. (196) en 1970 mais difficile à utiliser avec les membranes filtrantes, malgré une nouvelle technique décrite par DAOUST et LITSKY en 1975 (24)
 - recommandé par LEVIN et al. en 1975 pour les eaux de mer (197)
 - permet la croissance des streptocoques du groupe D
 - T : 35°C, 18h.

2) MILIEUX LIQUIDES

- Azide Dextrose Broth - décrit par HANNAY et NORTON (198) puis MALLMAN et SELIGMANN (199) en 1950
 - T : 37°C, 48h.
- + Ethyl Violet Azide (EVA) - pour test confirmatif du précédent
 - décrit par LITSKY et al. en 1953 (200)
 - recommandé dans les Standard Methods américaines pour les eaux chlorés, turbides, ou contenant des toxiques (ex. métaux).
 - très utilisé en Europe
 - permet le dénombrement des Entérocoques
- KF Broth - décrit par KENNER et al. 1961 (194)
 - assurerait une meilleure récupération de tous les streptocoques fécaux
 - ne nécessite pas de confirmation
 - T : 35°C, 48h.

Ces deux milieux (KF et PSE) sont donc supérieurs au milieu solide m-Enterococcus (qui ne prend pas en compte les streptocoques animaux), au milieu liquide EVA (en particulier pour les eaux de mer, 204), et au milieu de SLANETZ et BARTLEY (25) (très sélectif des Entérocoques).

Par ailleurs CROFT en 1959 (205) a montré que le m-Entérocooccus agar était identique à l'AD-EVA, et SAYLER en 1975 (206) a observé un rendement bien meilleur des milieux liquides. Plus récemment, LEVIN en 1975 (197) a montré la supériorité du milieu PSE sur le milieu KF pour les eaux de mer.

Enfin, il ressort de la bibliographie que pour le dénombrement de l'ensemble des streptocoques fécaux, l'on peut classer actuellement les milieux dans l'ordre suivant (les comparaisons sont ici possibles car PSE et KF existent sous les deux formes: liquide et solide) :

$$\text{PSE} \gg \text{KF} \gg \begin{matrix} \text{Azide Dextrose} \\ + \text{EVA} \end{matrix} \gg \text{m-Enterococcus}$$

Mais il ne faut pas oublier comme l'a montré BISSONNETTE dès 1974 (207) que tous ces milieux sélectifs sont inhibiteurs pour les cellules lésées de streptocoques : avec des cultures de Streptococcus faecalis "stressées", les rendements obtenus sont très inférieurs à ceux des milieux non sélectifs. Sur ces derniers les trois méthodes (NPP, filtration, incorporation) donnent des résultats identiques et élevés ; par contre avec les milieux sélectifs AD + EVA, le NPP pour la forme liquide est supérieur au résultat obtenu sur la forme solide après filtration. Une meilleure revivification semble donc exister ici aussi en milieux liquides.

Peu de comparaisons ont par contre été effectuées entre incubation normale à 35-37°C, et celle, parfois préconisée, à 45°C. Cette température élevée semble réduire le nombre de réponses faussement positives (souches des plantes en particulier) mais elle est défavorable aux cellules stressées.

C'est ainsi que BURMAN en 1961 (208) et GREEN en 1977 (209) suggèrent une pré-incubation de 5h. à 35°C avant transfert à 45°C pour 44 heures. En Grande-Bretagne, la recherche des Entérocoques est effectuée sur milieu de SLANETZ, à 37°C pendant 4h. puis à 44°C pendant 44h. ce qui donnerait des résultats identiques au NPP en milieux liquides (Dextrose Azide) en 72h. (210)

En résumé, pour ce qui concerne les streptocoques, il semble utile d'envisager le dénombrement de l'ensemble des "streptocoques fécaux" (plutôt que des entérocoques ou Streptocoques D, groupes plus restreints), et d'utiliser pour cela les milieux PSE ou KF en remplacement du système de milieux liquides de Rothe et de Litsky très utilisé en NPP en France, trop sélectif des entérocoques (la filtration sur gélose de Slanetz et Bartley l'étant encore plus). Pour une meilleure revivification des cellules lésées, il convient d'en utiliser la formulation liquide (PSE) (donc en NPP), et d'incuber à 35-37° plutôt que 44-45°C.

CHAPITRE III

L'ÉPIDÉMIOLOGIE, UN NOUVEAU SUPPORT POUR LES NORMES

Dans les chapitres précédents on a vu qu'il existait des germes intestinaux inoffensifs, susceptibles de servir d'indicateurs de contamination fécale, et donc de "couvrir" la plupart des risques infectieux liés à la baignade en mer, rivière ou lac. Cependant il existe une grande variété de techniques microbiologiques pour dénombrer les divers indicateurs ou groupes d'indicateurs plausibles. Bien que certaines de ces méthodes soient parfois présentées comme équivalentes (jusque dans des normes !) elles sont toutes différentes, selon deux axes :

- axe taxonomique : le groupe dénombré est plus ou moins restreint, et son origine fécale plus ou moins sûre. Ainsi dans les Entérobactéries "il y a le choix" entre Escherichia coli, "coliformes dits fécaux" et coliformes totaux;
- axe physiologique : plus les techniques utilisées sont rapides, simplifiées et sélectives de groupes fécaux restreints, moins les cellules lésées (stressées) ont de chances d'être revivifiées. Sur le plan quantitatif (résultat chiffré par 100 ml) les erreurs les plus graves sont commises sur ce second axe.

Il existe des raisons logiques de choisir, dans cette variété, les groupes d'origine intestinale la moins contestée et les méthodes les plus revivifiantes, (*) pour représenter le mieux les risques infectieux. Pour logique qu'il soit, ce raisonnement ne peut être vérifié que par confrontation avec les données épidémiologiques : c'est seulement ainsi qu'on peut espérer établir s'il existe un lien entre morbidité, baignade et pollution de l'eau, et éventuellement chiffrer cette relation, pour permettre ensuite, à partir d'un risque de morbidité jugé acceptable, d'indiquer quel niveau de pollution moyen, ou maximum, lui correspond.

(*) Il semble en effet que l'ingestion soit un des meilleurs moyens de revivifier les bactéries pathogènes lésées et de leur rendre leur pouvoir pathogène. Par ailleurs certains pathogènes (virus, kystes,...) ne sont pas sensibles aux stress de l'environnement. En particulier les oeufs et kystes de parasites animaux et les virus n'ont pas de fonction de nutrition et ne souffrent pas comme les indicateurs de la raréfaction des nutriments. Il convient donc de prendre en compte les indicateurs lésés, en ayant recours à une revivification optimale.

Un certain nombre d'enquêtes dans le monde essaient d'évaluer l'impact de la baignade en eau polluée, soit simplement par le recensement de cas épidémiques (épidémiologie descriptive), soit en recherchant des relations significatives entre la pollution d'un milieu et certains faits pathologiques, dans les règles de l'épidémiologie analytique.

A EPIDEMIOLOGIE DESCRIPTIVE

Comme il a été dit au chapitre I (p. 23), un grand nombre de microbes peuvent être véhiculés par les eaux de baignade et causer des maladies "hydriques". Les véritables épidémies ont cependant un nombre limité d'agents ; il s'agit de :

- Salmonella
- Shigella
- Vibrio cholerae
- Vibrions marins pathogènes (Vibrio para-haemolyticus,
- Leptospires

Un historique de telles épidémies jusqu'à 1975 environ a déjà été présenté ailleurs (211), mais il convient d'y ajouter, pour les années récentes, quelques éléments concernant les leptospiroses, les gastro-entérites, certaines infections cutanées, etc...

1) Leptospiroses

Ces dernières années le nombre de leptospiroses recensées n'a cessé d'augmenter. Ainsi en Grande-Bretagne en 1981, 70 cas dont 5 mortels ont été notés, tous en eaux douces (212). Pour 30 de ces cas, les patients étaient agriculteurs ou employés à l'élevage. Dix infections résultaient de contacts indirects avec des rats ou d'immersion dans des eaux polluées par l'urine d'autres animaux-hôtes, et douze cas résultaient de contacts directs avec des rats. La majorité des cas liés à la baignade (ou immersion) ont eu lieu en fin d'été. Il ne s'agit pas en fait d'épidémies vraies mais de cas isolés qui sont cependant déclarés et recensés, à la différence de bien des cas isolés ou groupés de salmonelloses, viroses et autres maladies moins graves.

2) Maladies virales

Faute de données postérieures à 1973, il faut rappeler qu'une enquête anglaise de 1957 (213) a recherché de façon rétrospective les antécédents en matière de baignade de 150 jeunes poliomyélitiques présentant les mêmes caractéristiques (âge, école, sexe, habitat). Ces deux groupes (enfants malades et enfants sains) se sont révélés avoir des antécédents de baignade tout à fait semblables. Moore en avait conclu que la baignade ne peut être à l'origine de la maladie.

Pour l'hépatite infectieuse, le rôle de la baignade apparaît également peu vraisemblable. Pourtant BRYAN et al. (74) ont associé une épidémie d'hépatite virale à la baignade en 1974, en relation avec une contamination fécale importante de l'eau cette année-là.

3) Salmonella - Shigella

Les doses infectieuses élevées et les données épidémiologiques concernant les Salmonella tendent à confirmer l'hypothèse d'une contamination par absorption de particules en suspension abritant un grand nombre de ces germes. En effet, lors des quelques épidémies de fièvre typhoïde et paratyphoïde attribuées à la baignade, l'eau était anormalement chargée en matières fécales : en Louisiane il y avait eu rupture d'un collecteur d'égout (75) ; en Alabama l'eau transportait des particules drainées dans une zone contaminée par le rejet d'un égout (72); enfin, c'est une eau d'égout brute qui fut responsable de 4 cas de typhoïde à Alexandrie en 1978 (Cabelli) (217).

La diminution du nombre de fièvres typhoïdes pourrait s'expliquer par le développement du traitement des eaux usées, l'élimination des Matières en Suspension lors du traitement contribuant à la diminution du nombre de particules susceptibles d'abriter des salmonelles.

Lors de l'épidémie de dysenterie survenue sur le Mississippi à proximité de Dubuque en 1973, 43 individus consultèrent un médecin et 18 furent hospitalisés. Durant les trois jours qui précédèrent la maladie 23 personnes s'étaient baignées et 13 d'entre elles avaient en particulier fréquenté une zone pour laquelle les analyses, faites le

.....

mois suivant l'épidémie révélèrent des taux de 17500 "coliformes fécaux"/100 ml (73). Les souches de Shigella sonnei isolées à partir de 7 baigneurs présentaient le même antibiogramme que celles isolées dans cette zone.

Pendant trois jours 12% des baigneurs présentèrent des troubles gastro-intestinaux accompagnés de diarrhées et de fièvre. Les baigneurs de moins de 20 ans et ayant absorbé de l'eau furent statistiquement les plus touchés. L'enquête épidémiologique qui suivit révéla qu'il ne s'agissait pas d'une infection d'origine alimentaire mais bel et bien associée à la baignade.

4) Autres infections

Bien connues en piscines, les infections ORL ou cutanées à Pseudomonas aeruginosa ne sont toujours que suspectées pour la baignade en milieu ouvert d'eaux douces ou de mer : aucun rapport épidémiologique ne semblent en faire état. Par contre une douzaine de cas d'infections cutanées à Aeromonas hydrophila ont pu être associées à la baignade, en relation semble-t-il avec des charges importantes de matières organiques (107).

De même des cas isolés de surinfections de blessures par des vibrions marins (Vibrio parahaemolyticus/alginolyticus) ont été rapportés (214-215).

Enfin, dans le même groupe des maladies hydriques indépendantes de la pollution fécale, rappelons le risque, lié à l'échauffement des eaux douces, des méningo-encéphalites amibiennes à Naegleria fowleri (26).

5) Critiques

Les résultats obtenus par enquête rétrospective doivent être considérés avec la plus grande prudence, car du fait même de sa nature ce type d'enquête tend à sous-estimer l'incidence réelle des différentes maladies associées à un facteur donné, la baignade en eau polluée pour ce qui nous concerne.

En effet, il y a d'une part de nombreux autres modes de transmission (alimentaire, interhumaine) et il est difficile de déterminer de façon rétrospective le mode de contamination avec certitude. D'autre part, les baigneurs d'origines diverses ne fréquentent en général le lieu de baignade que par intermittence. Il devient alors difficile de localiser l'origine de la contamination alors que les cas sont dispersés géographiquement. Enfin, la variabilité spatio-temporelle de la pollution et les variations immunitaires individuelles font que l'on a davantage de cas sporadiques, qui passent inaperçus, que d'épidémies décelées. De plus il est difficile d'utiliser les informations fournies par ces cas sporadiques pour développer des normes et des standards surtout lorsque les analyses bactériologiques sont réalisées a posteriori.

On ne peut donc espérer approcher l'incidence des maladies associées à la baignade qu'au travers d'enquêtes épidémiologiques prospectives.

B EPIDEMIOLOGIE ANALYTIQUE

L'idée d'un vaste programme associant la microbiologie et l'épidémiologie afin de développer un critère de qualité d'eau de baignade ne date pas d'aujourd'hui. Dès 1950 des enquêtes prospectives ont été menées, mais toutes étaient entâchées de la plus grande imprécision. Il fallut attendre 1973 avec CABELLI pour obtenir des résultats chiffrés et une meilleure connaissance du problème.

1) Les enquêtes avant 1973

Avant 1973, la seule enquête prospective d'importance concernant les maladies liées à la baignade fut celle menée par STEVENSON (216). Les études portaient sur des groupes de populations côtières (baignade en mer), riveraines d'un grand lac (baignade en eau douce), ou d'un grand fleuve. Elles ont montré que la morbidité était sensiblement plus forte chez les baigneurs et cela indépendamment de la qualité de l'eau de baignade. Les maladies de la sphère ORL étaient de loin les plus fréquentes. Les différences concernant les troubles gastrointestinaux n'étaient pas considérées comme significatives.

2) Les enquêtes après 1973 (Enquêtes de Cabelli et son école)

Conduite des enquêtes
.....

a) Epidémiologie : Les personnes soumises à des taux de pollution différents du fait de baignades successives sont éliminées. Les données épidémiologiques sont recueillies en 2 étapes :

- La première étape se déroule sur un weekend. Durant ces deux jours les enquêteurs interrogent les sujets individuellement ou par groupe (famille en général). Après s'être assuré qu'aucune absence dans le groupe n'était dûe à une affection susceptible d'être en relation avec la baignade, ils proposent trois séries de questions recueillant des données :

- démographiques : nom, adresse, âge, sexe, ethnie, condition socio-économique, conditions de vie sur place ;
- sur les circonstances de la baignade : durée, fréquence, aspect de l'eau (ressenti) ;
- sur la pathologie enregistrée au cours des jours précédant la baignade et sur les éventuels recours aux soins médicaux.

- Dans un deuxième temps, les personnes sont recontactées par téléphone ou par courrier et sont interrogées sur la pathologie survenue dans les 15 jours qui ont suivi le retour au domicile habituel.

Les symptômes envisagés sont :

- gastrointestinaux (GI) : vomissement, diarrhée, nausée, maux d'estomac
- ORL
- respiratoires
- non spécifiques : fièvre, céphalée, mal de dos, irritations, démangeaisons et boutons

b) Bactériologie : Les prélèvements sont effectués en différents points des plages sélectionnées, durant les heures de pointe de la fréquentation (11 à 17h). Les échantillons d'eau sont collectés en bouteilles stériles à proximité de la surface et sont analysés dans les six heures qui suivent le prélèvement. Les germes recherchés et les techniques microbiologiques ont varié d'une enquête à l'autre. La synthèse en est faite dans le tableau 28.

TABLEAU 28

Diverses méthodes microbiologiques successivement employées par CABELLI et son école au cours d'études épidémiologiques

	New-York	Pontchartrain	Alexandrie	Boston	Keystone	Malaga	Ile et Vilaine
Coliformes totaux	lactose * (224)				m Endo (154-155-156)	m Endo (154-155-156)	lactose * (AFNOR NF T90414)
Coliformes dits fécaux	EC * (224)				m FC (168)	m FC (168)	
<u>Escherichia coli</u>	m C (170)	m TEC (223)	m TEC (223)	m TEC (223)	m TEC (223)		McKENZIE * (AFNOR NF T90414)
<u>Klebsiella</u>	m C (170)	m TEC (230)	m TBC (230)				
<u>Enterobacter</u> <u>Citrobacter</u>	m C (170)						
Streptocoques fécaux	m SD (226)				m KF (194)	m E (197)	Roche * (AFNOR NF T90414)
Enterocoques	m E (197)	m E (197)	m E (197)	m E (197)	m E (197)		
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	m PA (227)				m PA (227)		
<u>Aeromonas hydrophila</u>	m A (228)						
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	m PA (229)						
<u>Clostridium perfringens</u>	m CP (231)						
Staphylocoques	m S						
Staphylocoques <u>aureus</u>	m S						
<u>Acinetobacter</u>					m AC (225)		
<u>Bifidobacterium</u>					m YN-6 (232)		

* NPP

m : filtration sur membrane

3) Analyse des données

Les auteurs cherchent à mettre en évidence

- d'une part, les symptômes associés à la baignade au moyen d'une analyse statistique des données (test du χ^2). Ils distinguent deux populations :

- . les non-baigneurs, qui séjournent sur la plage et n'immergent pas la tête ;
- . les baigneurs, caractérisés par un contact des orifices supérieurs avec l'eau.

Et parmi les symptômes ils cherchent à mettre en évidence ceux qui sont en relation avec la pollution bactérienne, en comparant la pathologie des baigneurs en eau polluée et en eau non polluée.

- d'autre part, une relation entre la concentration en certains indicateurs et la fréquence des symptômes associés à la baignade au moyen d'une analyse mathématique des données (régression linéaire).

4) Résultats

New-York (217-218) : Cette étude s'est déroulée en trois étapes (années) à Coney Island et Rockaway. Une étude préliminaire conduite en 1972 avait permis de tester les méthodes microbiologiques et épidémiologiques et d'évaluer la pollution des plages.

En 1973 l'étude porta sur deux plages : une de qualité bactériologique médiocre, située entre la dix-huitième et la vingt-deuxième rue de Coney Island, et une relativement peu polluée, à Rockaway, au niveau de la soixante-septième rue.

La distribution démographique était en gros identique pour les deux plages. Les 2/3 des personnes présentes étaient des baigneurs, en majorité de la classe d'âge 0-19 ans, hispano-américains, hommes.

A Coney Island les baigneurs présentaient statistiquement plus de symptômes Gastrointestinaux (GI) que les non baigneurs, alors qu'à Rockaway c'est la fréquence des troubles respiratoires qui était supérieure parmi les baigneurs, phénomène probablement imputable à la pratique abondante du surf sur cette plage.

En 1974, afin de toucher un plus grand nombre d'individus, la plage de Rockaway fut "étendue" de la soixante-septième rue à Riis Park. Ce transfert eut pour effet une moindre similitude des critères démographiques entre les deux plages. Cependant à deux exceptions près les résultats de 1974 confirment ceux de 1973. Les taux moyens en indicateurs étaient inférieurs en 1974, et en ce qui concerne les symptômes respiratoires on n'observait plus de différence statistique entre baigneurs et non-baigneurs à Rockaway.

Du fait du plus large éventail de personnes interrogées la fréquence des symptômes GI a pu être envisagée suivant différents critères démographiques. Les résultats pour les baigneurs et les non-baigneurs sont regroupés dans le tableau 29.

Les enfants, les hispano-américains et les individus socioéconomiquement défavorisés se baignant à Coney Island présentaient de façon significative plus de troubles GI que les non-baigneurs. Les enquêtes avançaient l'hypothèse que les adultes, les blancs, les noirs et les personnes socio-économiquement favorisées ne se baignaient pas lorsqu'ils étaient en période d'incubation de maladies, à la différence des Porto ricains. Les enfants non baigneurs de Rockaway présentaient statistiquement plus de troubles GI que ceux de Coney Island et que les jeunes baigneurs de Rockaway. Bien que seulement 0,1% des enfants ne se baignent pas à cause de troubles GI préexistants, il semble qu'ils soient plus sensibles à ces derniers.

En 1975, quatre plages de Coney Island ont été étudiées, afin de dégager un critère de qualité d'eau pour la baignade.

L'analyse mathématique des résultats accumulés au cours de ces trois années d'étude fait apparaître que les Entérocoques et Escherichia coli constituent les indicateurs les mieux corrélés avec les symptômes GI. Pour les Entérocoques le coefficient de corrélation varie entre 0.84 et 0.81 alors que pour Escherichia coli il est moindre et varie entre 0.51 et 0.56. Les autres indicateurs (coliformes totaux, coliformes "fécaux" Pseudomonas, Vibrio, Aeromonas) n'étaient pas en relation significative avec la symptomatologie (Tableau 30).

TABLEAU 29

Analysis of gastrointestinal symptom rates (%) after demographic grouping (218)

Demographic Group	G.I. Symptom Rates in % at			
	BA Beach		RU Beach	
	Swim	Nonswim	Swim	Nonswim
Total sample	4.2 ^f	2.6	3.9	3.5
Children ^a	5.7 ^{fg}	1.4	2.3 ^f	5.5
Latin-Americans	4.5 ^{fg}	1.7	2.4	1.2
Low-Middle SES ^b	4.2 ^f	1.6	4.1	3.4
Adults ^c	3.7	2.9	4.2	3.2
Non-Latins ^d	3.8	3.5	4.3	3.9
Higher SES ^e	4.2	4.5	3.7	3.5

a ≤ 10 yrs. old

b ≥ 1.0 persons/rooms ratio

c > 10 yrs. old

d white and black

e < 1.0 persons/rooms ratio

f Significantly different (P=0.05) than nonswimming control

g significantly higher (P=0.05) than RU swimmers

G.I. gastrointestinal ; SES socioeconomic status

BA barely acceptable (polluée) ; RU relatively impolluted

TABLEAU 30

Correlation coefficients for total gastrointestinal symptoms and the "Highly Credible"

portion against the mean indicator densities for 1973-1976 trials conducted at New York city beaches réf. 217

Indicator	Correlation Coefficients (r) for				Number of Points (N)	
	Highly Credible GI 1 Summ 3	Clust 4	Gastrointestinal GI 2 Summ	Clust	Summ	Clust
Enterococci	.75	.96	.84	.81	8	9
Escherichia coli	.52	.56	.56	.51	8	9
Klebsiella	.32	.61	.35	.47	8	11
Enterobact. Citrobacter.	.26	.64	.23	.54	8	13
Total coliforms	.19	.65	.12	.46	8	11
C. perfringens 5	.19	.01	.38	.36	5	8
P. aeruginosa	.19	.59	.25	.35	8	11
Fecal coliforms	-.01	.51	.01	.36	8	12
A. hydrophila	-.09	.60	-.08	.27	7	11
V. parahaemolyticus ⁵	-.20	.42	.19	.05	5	7
Staphylococci 5	-.23	.60	.71	.09	5	10

1 - Highly credible GI symptoms (see text for definitions).

2 - Total gastrointestinal GI symptoms.

3 - Analysis of data by summer by beach.

4 - Analysis of data by summer, by cluster of trials (days) with similar indicator densities.

5 - No data for 1973.

5) Alexandrie (217) : Les études sur modèle animal conduisent pour la plupart des agents infectieux à des courbes dose-réponse sigmoïdes. On pourrait donc s'attendre à ce que la courbe reliant les infections liées à la baignade et le taux de pollution soient de ce type. Or, lorsque l'on représente la fréquence de symptômes GI en fonction des densités en indicateurs, les points s'alignent suivant une droite. Pour expliquer cela, deux hypothèses peuvent être avancées :

- α soit l'on se situe sur la partie basse de la courbe et l'on devrait alors noter une inflexion pour des densités en indicateurs plus importantes ;

- β soit les droites de régression correspondent à la portion linéaire de la courbe sigmoïde.

Pour trancher entre ces deux hypothèses, il suffit d'étudier des plages présentant une forte pollution, dont la source soit peu éloignée du lieu de prélèvement. Après une étude préliminaire, CABELLI a choisi trois plages à Alexandrie qui répondaient à ces critères : une plage très polluée (Mandara), une modérément polluée (Ibrahema) et une plage à la limite du seuil d'acceptabilité (Maamoura).

Les résultats obtenus en 1977 confirmèrent ceux de New-York et abondent tous dans le sens de l'hypothèse β ci-dessus. Pour la plupart des symptômes la fréquence est supérieure chez les baigneurs des trois plages. Seule la symptomatologie GI semble corrélée avec le taux de pollution. La différence de fréquence des symptômes GI entre baigneurs et non baigneurs est très nettement supérieure pour les plages polluées par rapport à la plage acceptable. Les enfants semblent les plus sensibles. Malgré une pollution plus forte, les pentes des droites de régression sont inférieures à celles obtenues lors de l'étude de New-York. Bien plus, on observe un plateau à partir de teneurs de 200 à 300 Escherichia coli ou Entérocoques/100 ml. Nous avons donc à Alexandrie une population plus résistante qu'à New-York.

En 1978, l'étude fut non seulement reconduite, mais élargie à des touristes originaires du Caire, qui du point de vue immunité se rapprochaient des populations de New-York. Trois cas de jaunisse furent détectés parmi ces touristes cairotes, sans association avec la baignade et encore moins avec la pollution. Par contre les 4 cas de thyphoïde furent recensés sur la plage la plus polluée. Une fois encore les enfants étaient les plus sensibles. Seule la fréquence de symptômes GI augmentait en parallèle avec le taux de pollution (exprimé en Escherichia coli et

Entérocoques), mais diminuait avec la fréquence des baignades. Comme l'on pouvait s'y attendre, la pente de la droite de régression (symptômes indicateurs) pour les habitants du Caire est supérieure à celle des résidents d'Alexandrie. Les populations se baignant régulièrement semblent acquérir une certaine immunité.

6) Pontchartrain (Louisiane) (219) : Cette étude a été conduite pendant les étés 1977 et 1978 sur le lac de Pontchartrain au niveau de la plage de Levee située à l'embouchure du Bayou. Ce site différait en de nombreux points de New-York :

- effet des marées pratiquement inexistant ;
- eau saumâtre et plus chaude en été ;
- pas de plage à proprement parler mais une descente en escaliers des berges vers le fond ;
- sources de pollution mal définies, bien que les autorités précisent qu'il n'y a pas d'égouts se déversant dans le lac ou dans le Bayou.

En 1977 lorsque l'on compare les symptômes individuellement, on constate une différence statistique entre baigneurs et non baigneurs pour les vomissements, diarrhées, maux d'estomac, otites et irritations cutanées. Après regroupement des symptômes par catégories, seuls les symptômes GI révèlent encore une différence statistique. En général les enfants sont plus sensibles aux troubles GI. CABELLI observe que :

- le taux d'Entérocoques diminue au fur et à mesure que l'on s'éloigne de l'embouchure du Bayou, ce qui n'est pas vérifié pour Escherichia coli ;
- le taux d'Entérocoques diminue après les orages, et inversement pour Escherichia coli ;
- pour les baigneurs de moins de 10 ans il y a une relation entre la fréquence des troubles GI et le taux d'Escherichia coli. Par contre pour les personnes plus âgées c'est avec les Entérocoques qu'il y a une relation.

En 1978, année en moyenne plus sèche que 1977, l'étude a porté principalement sur les relations Escherichia coli, Entérocoques et maladies associées à la baignade. CABELLI a noté :

- une baisse des taux d'indicateurs, sans que pour autant la fréquence des symptômes GI ne varie (39% en 78 et 42% en 77) ;

- une différence statistique entre baigneurs et non baigneurs pour les symptômes respiratoires, ORL et GI. Les enfants étant toujours plus sensibles aux troubles GI.

L'étude de Pontchartrain a montré que les Entérocoques étaient les mieux corrélés avec les symptômes GI, mais que cette corrélation pouvait être remise en question par période de sécheresse.

7) Boston (217) : Cette étude conduite à Boston entre Juin et Juillet 1978 porta sur 2 plages pour lesquelles comme à Pontchartrain l'origine de la pollution était inconnue.

Le taux moyen d'Entérocoques et Escherichia coli était de 80/100ml pour Revere Beach et dix fois plus élevé pour Nahant. A Revere comme à Nahant les symptômes GI étaient les plus fréquents, mais sans différence statistique entre baigneurs et non baigneurs.

La relation symptômes-indicateurs s'apparentait davantage à celle observée à Pontchartrain qu'à celle de New-York et Alexandrie, c'est-à-dire que pour les teneur en indicateurs identiques on observait des fréquences en symptômes GI plus élevées.

8) Keystone (220) : MAC KEE a mené en 1979 une enquête prospective sur les berges du lac Keystone, Oklahoma. La symptomatologie a été examinée pour deux plages à la limite du seuil d'acceptabilité (Salt Creek North et Keystone) et une plage relativement propre, Washington Irving South. Des familles ont été interviewées sur la plage durant un weekend et interrogées 8 à 10 jours après par téléphone sur une symptomatologie éventuelle. Il en ressort que :

- la pathologie gastro-intestinale, respiratoire et ORL est supérieure parmi les baigneurs ;

- la tranche d'âge 0-9 ans et les personnes défavorisées sont les plus touchées ;

- il existe une bonne corrélation entre indicateurs (Escherichia coli, Entérocoques) et fréquence des symptômes GI associés à la baignade.

9) Espagne (221) : Durant l'été 1979, MUJERIEGO a mené une enquête épidémiologique prospective parmi les baigneurs de Malaga et Tarragona. Au total, 24 plages (14 à Malaga dont 7 de mauvaise qualité bactériologique et 10 de Taragona de qualité bactériologique satisfaisante) ont été considérées et 20918 questionnaires collectés par interview direct sur la plage. Les dénombrements de "coliformes fécaux" ont été obtenus après filtration sur membrane, directement à 44°C, sans revivification, sur milieu mFC. Les conclusions de MUJERIEGO sont les suivantes :

- un risque réel pour la santé semble associé à la baignade en eau de mer de mauvaise qualité bactériologique ;
- les troubles les plus fréquemment observés sont les lésions cutanées (2%), les troubles de la sphère ORL et conjonctivites (1,5%) et les symptômes GI (1%) ;
- l'immersion de la tête pendant la baignade est significativement associée aux troubles de la sphère ORL et aux conjonctivites
- les normes se limitant aux "coliformes fécaux" ne sont pas suffisantes et devraient être élargies aux streptocoques fécaux afin d'assurer une meilleure protection.

10) France (222) : l'étude épidémiologique de FOULON repose sur un interrogatoire minute des estivants de 5 plages d'Ile et Vilaine, en 1982. Trois d'entre elles présentaient une contamination fécale notable restant néanmoins inférieure au seuil d'interdiction de baignade d'après les normes de qualité (Le Mole, le Bon Secours, le Port). Les deux autres plages se caractérisaient par une absence de contamination fécale (Port-Mer, le Verger).

Cet interrogatoire est complété par une enquête par voie postale un mois après le retour. FOULON met en évidence que :

- il existe une symptomatologie liée à la baignade concernant les sphères ORL et gastro-intestinale, les conjonctives et la peau ;
- le critère baignade apparaît en rapport principalement avec les affections des conjonctives et de la peau, sans que l'on puisse déterminer s'il s'agit d'un effet d'irritation ou d'une véritable infection. En particulier ce que les estivants désignent par le terme de "champignons" suggère une liaison étroite avec la baignade sans que l'on sache s'il s'agit de véritables mycoses ou de manifestations allergiques ;

- le critère "immersion de la tête" intervient davantage sur la sphère ORL, les maux de ventre et les nausées, ceci quel que soit le niveau de pollution et sans que l'on puisse établir de relation entre les affections observées et une éventuelle contamination des sujets ;

- il existe une corrélation entre niveau de contamination des plages et troubles GI chez les baigneurs, la contamination des plages ayant été mesurée en Escherichia coli et Entérocoques avec revivification et méthode du NPP.

C) Critiques

1° Critiques sur l'épidémiologie

a) Avant 1973 : Si l'on examine la façon dont STEVENSON a conduit son enquête, l'on s'aperçoit d'un certain manque de rigueur.

STEVENSON comme MOORE n'a pas défini de façon précise la baignade. Or, si la baignade n'est pas définie rigoureusement, il est alors possible d'observer des différences statistiques entre deux populations pour lesquelles la plupart des individus n'ont pas eu de contact réel avec l'eau. Remarque d'importance si l'on prend comme hypothèse que seulement 60% des personnes se trouvant sur la plage seraient classées comme baigneurs si l'on prenait comme critère de baignade l'immersion de la tête (proportion vérifiée expérimentalement par CABELLI lors de ses enquêtes).

STEVENSON a mis en évidence des variations temporelles en coliformes importantes, dûes entre autres à la marée, aux courants marins et aux conditions météorologiques (vent). Dans ces conditions, la population de référence "baigneurs" statistiquement idéale doit être constituée d'individus ayant pris un seul bain durant la période d'étude. Or pour des exigences de calendrier, STEVENSON s'est limité à l'étude des riverains et résidents balnéaires, ce qui augmente le risque de baignade répétée (cependant, afin de limiter en quelque sorte l'effet de ce biais, STEVENSON a comparé la fréquence des symptômes au cours des jours de forte et de faible pollution).

Comme population de référence "non baigneurs" STEVENSON a pris des personnes ne fréquentant pas la plage. De ce fait les infections associées à la fréquentation de la plage sont attribuées à la baignade et conduisent à une sur-estimation des effets de la baignade.

STEVENSON dans son étude a tenu compte de l'âge et du sexe, délaissant les facteurs ethniques et socioéconomiques que nous savons maintenant significatifs.

Enfin les techniques microbiologiques étaient telles à l'époque, que la liste des indicateurs se limitait aux coliformes dits fécaux et entérocoques.

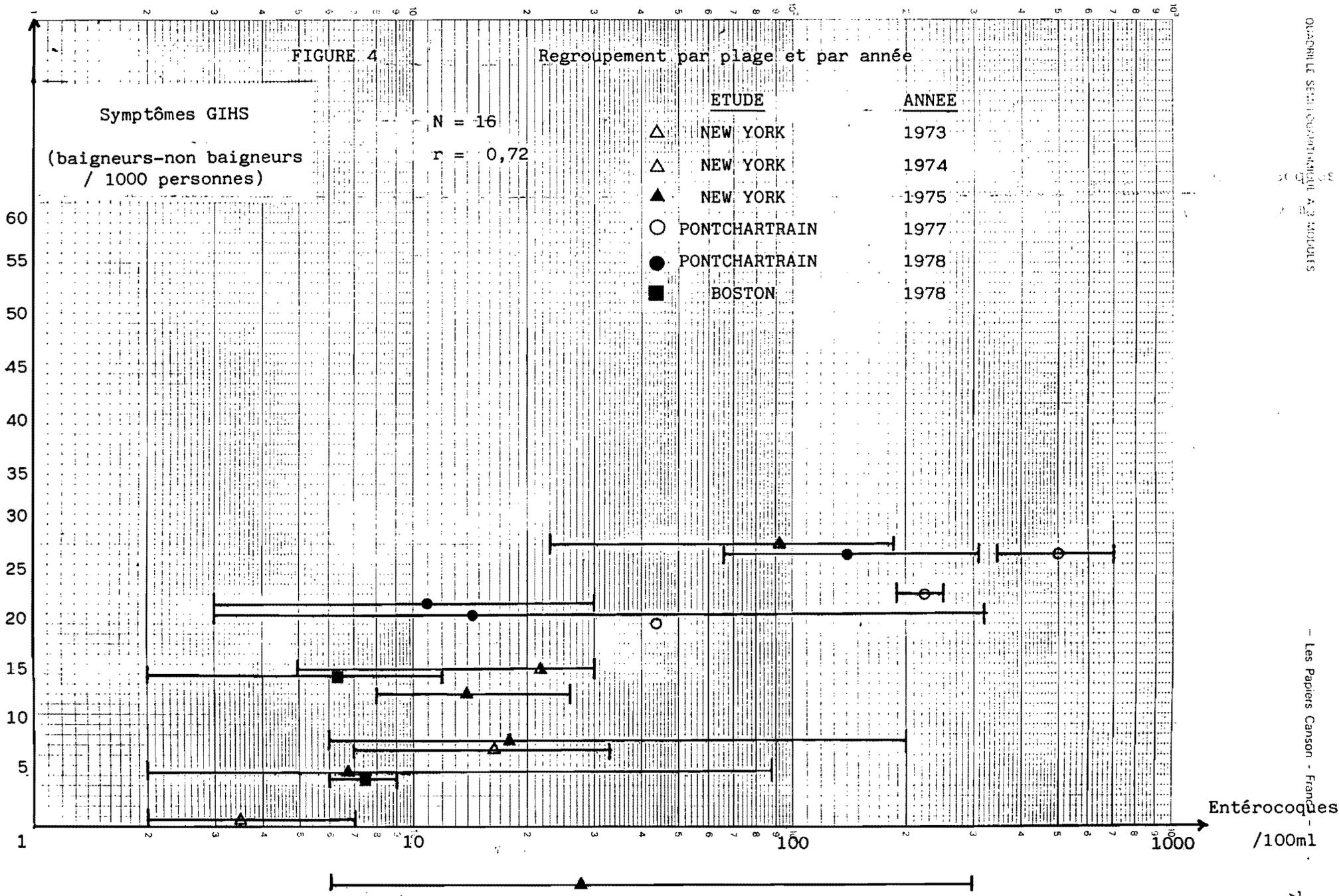
b) Après 1973 : On ne peut critiquer CABELLI sur la conduite de son enquête et au contraire l'on ne peut que se réjouir du fait qu'un épidémiologiste ait su enfin envisager le problème de la baignade avec rigueur et éviter les biais que ses prédécesseurs avaient connus, il est vrai, par manque de moyens techniques et financiers.

Une fois ceci pris en compte, l'on peut alors considérer que CABELLI a démontré de façon probante que les baigneurs, surtout les enfants, étaient statistiquement plus malades que les non baigneurs et que la fréquence des symptômes GI associés à la baignade était significativement plus importante en eau polluée sans même que le niveau de pollution ne dépasse les normes.

Par contre, ces travaux deviennent contestables lorsqu'il s'agit de l'analyse mathématique des données, car de nombreuses questions restent à élucider.

Ainsi lorsque CABELLI calcule pour chaque plage la moyenne annuelle en indicateurs, il obtient, étant donné la variabilité temporelle de la pollution, des erreurs standards allant de 100 à 200% pour les entérocoques et de 300 à 500% pour Escherichia coli (figure 4). On comprend mal alors les précautions prises lors de l'interview pour éliminer les baignades répétées, par crainte de variation des taux de pollution. Puisqu'au moment de l'analyse finale il calcule la fréquence des symptômes associés à la baignade sur l'ensemble des personnes interrogées sur la même plage en considérant qu'elles se sont toutes baignées à la densité moyenne annuelle d'indicateurs, il supprime toute distinction suivant les niveaux de pollution.

Compte tenu de ces critiques un regroupement par niveau des pollutions semble à première vue plus séduisant. En effet CABELLI regroupe les données annuelles, toutes plages confondues, selon leur niveau de pollution. Hélas on ne sait comment il détermine les intervalles de classes (variables et non disjointes) et surtout sur quels critères se fait le choix des coupures à tel niveau de pollution plutôt qu'à tel autre. De plus, en procédant ainsi CABELLI obtient alors un histogramme, la largeur des batons correspondant à l'intervalle de classe et la hauteur à la



fréquence moyenne des symptômes observés parmi les personnes s'étant baignées à ce niveau de pollution. La question est de savoir par quel moyen "mathématique" CABELLI obtient ensuite les points servant à sa régression à partir de l'histogramme.

Quoi qu'il en soit, même si des réponses satisfaisantes sont apportées à ces multiples interrogations, il faut bien se rendre compte que lorsque l'on regroupe des données et ceci quel que soit le mode de regroupement, l'on perd de l'information. Cette perte se traduit entre autres par une incertitude sur chaque valeur, incertitude qui augmente le niveau de regroupement.

La question finale, corollaire de la remarque précédente, est de savoir si une régression basée sur des points entachés d'une telle imprécision peut encore rendre compte de façon significative du phénomène étudié.

2° Critiques sur la microbiologie

CABELLI emploie lors de l'étude de New-York (217-218), le NPP pour le dénombrement des coliformes totaux et "coliformes fécaux" et la filtration sur membrane pour Escherichia coli, Klebsiella, Enterobacter et Citrobacter, et les teneurs en coliformes totaux obtenues par NPP atteignent le double de celles obtenues sur membrane !

Bien plus, même si l'on englobe les Klebsiella dans le groupe des "Coliformes dits fécaux", la somme Escherichia coli plus Klebsiella dénombrés sur membrane (moyenne logarithmique = 74,5) est nettement inférieure au résultat obtenu pour le "CF" par NPP (moyenne logarithmique = 565) (tableau 31).

Etant donné la discordance de ces résultats, CABELLI décide d'utiliser par la suite uniquement les techniques de filtration sur membrane.

Il obtient alors, par exemple à Pontchartrain (219), des teneurs en Escherichia coli souvent supérieures aux teneurs en "Coliformes fécaux" ce qui semble aberrant (tableau 32).

Nous avons vu précédemment que les points servant à l'établissement de critère de qualité étaient déjà entachés d'une incertitude due au regroupement des données. S'y ajoute maintenant une incertitude attribuable aux techniques microbiologiques et aux milieux utilisés.

TABLEAU 31

Geometric mean densities of potential microbial indicators
référence (218)

Indicator	Method ^a	Log Mean Recovery/100 ml at	
		BA Beach	RU Beach
Total coliforms	MPN	1213.*	43.2
Fecal coliforms	MPN	565.*	28.4
<u>Escherichia coli</u>	mC	15.3*	2.4
<u>Klebsiella</u>	mC	59.2*	3.5
<u>Enterobacter-Citrobacter</u>	mC	434.*	6.6
Fecal streptococci	mSD	16.4*	3.5
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	mPA	45.8*	3.1
<u>Aeromonas hydrophila</u>	mA	9.6	4.9
<u>Vibrio parahaemolyticus</u>	mPA	54.5	32.8
<u>Clostridium perfringens</u>	mCP	18.2	12.6
Staphylococci	mS	243.	178.
<u>Staphylococcus aureus</u>	mS	105.	69.2

^a See "Experimental".

* Significantly different at the 95% CL.

TABLEAU 32

Water sampling results : Bayou st. JOHN, Summer 1977

(organisms per 100ml.) (réf. 219)

Time	Trial Date													
	7/9	7/16	7/17	7/23	7/24	7/30	7/31	8/6	8/7	8/13	8/14	8/20	8/27	8/28
<u>E. coli</u>														
12	30	133	113	96	24	600	1030	7830	960	9400	430	3160	3260	630
2	7600	27	56	63	50	10700	500	3930	1400	4200	100	2330	2830	430
4	1960	200	500	130	430	2900	270	3230	1200	960	560	5730	2760	900
<u>Klebsiella</u>														
12	0	70	3	130	11	430	470	1170	100	6850	130	930	530	200
2	0	7	10	360	13	1530	230	570	160	1330	30	460	560	160
4	70	20	30	300	630	1430	300	1170	300	560	330	1460	460	230
<u>Fecal coliforms</u>														
12	30	233	106	80	27	930	2750	3230	500	5960	256	1600	1530	560
2	3860	40	63	50	40	2770	830	3000	1030	2500	216	1230	830	360
4	900	300	560	40	570	2130	470	2270	1200	1230	460	1830	1030	930
<u>P. aeruginosa</u>														
12	1	8	3	14	11	73	130	146	110	1886	173	560	116	43
2	343	4	1	29	20	320	140	116	50	376	110	460	116	43
4	153	5	7	15	73	216	57	100	213	186	1260	500	96	236
<u>Enterococci</u>														
12	23	430	36	0	450	23	90	360	36	53	10	0	50	76
2	3500	110	96	870	570	43	23	285	360	23	36	30	90	200
4	1100	430	430	830	1330	66	30	293	730	76	490	30	100	130

En résumé, les études épidémiologiques prospectives menées par CABELLI et celles qui ont suivi, sur le même modèle, mettent les points suivants en évidence :

- il existe des risques à se baigner ;
- les risques augmentent avec la pollution microbienne de l'eau ;
- les risques supplémentaires liés à la qualité microbienne de l'eau concernent surtout les enfants et se manifestent surtout par des troubles gastro-intestinaux ;
- les indicateurs de pollution les mieux corrélés avec ces troubles sont :
 - . les entérocoques, ou les streptocoques fécaux
 - . les Escherichia coli (particulièrement en NPP) ;
- les coliformes totaux, "Coliformes dits fécaux", vibrions, Aeromonas et autres catégories testées ne semblent pas en relation avec le risque sanitaire.

CONCLUSION GENERALE

Au premier rang des pollutions microbiennes concernant les eaux de baignade (mer, rivière, lac...), vient la pollution fécale. Elle se caractérise par la présence de germes témoins ou indicateurs de contamination fécale dont le dénombrement pourrait logiquement constituer une mesure de risque infectieux.

Il faut noter tout de suite qu'existent d'autres risques infectieux, d'origine non fécale :

- germes opportunistes de la peau ou des muqueuses, apportés par les baigneurs eux-mêmes ou provoquant, à l'occasion de la baignade, des auto-infections ;

- germes autochtones indésirables : Aeromonas en eau douce, Vibrio alginolyticus en mer et surtout Vibrio parahaemolyticus en estuaire, susceptibles au moins de provoquer des infections de blessures ;

- amibes responsables de méningo-encéphalites mortelles (Naegleria fowleri) et susceptibles de proliférer en milieu d'eaux douces échauffé.

Pour en revenir aux germes indicateurs de contamination fécale, il en existe de nombreuses catégories, et il y a surtout de très nombreuses techniques pour les dénombrer, qu'il convient de distinguer dans le détail, sur deux plans : taxonomique et physiologique.

Sur le plan taxonomique, c'est-à-dire de l'identité des germes à dénombrer et en particulier sur leur caractère intestinal ou non, il faut noter que :

- le groupe dit des "coliformes totaux" comprend des espèces d'origine non intestinale et est donc trop large, même quand les Aeromonas très ressemblants en sont exclus, ce qui n'est ni réalisé dans tous les laboratoires ni même rappelé dans toutes les normes. Le dénombrement des "coliformes totaux" était à l'origine la première étape du dénombrement des Escherichia coli et le nombre de Coliformes totaux n'a jamais été autre chose qu'un résultat intermédiaire, faisant double emploi partiel avec celui des Escherichia coli, mais sans grande valeur propre, au moins pour les eaux de baignade ;

- les Escherichia coli par contre sont le seul groupe d'origine intestinale constante, exclusive, incontestée.

- le groupe dit des "Coliformes fécaux" est bien mal nommé, puisqu'il correspond au résultat de techniques qui 1) prennent en compte des germes non-intestinaux (certaines Klebsiella en particulier) et 2) ne permettent pas en général de dénombrer toutes les cellules d'Escherichia coli présentes ! Cette dénomination n'est donc pas du tout synonyme d'Escherichia coli, et elle commence à être abandonnée aux USA.

- Parmi les Streptocoques, trois groupes proches doivent être distingués : les "Entérocoques", partie des "Streptocoques D", partie eux-mêmes des "Streptocoques fécaux". Deux espèces ont des souches d'origine fécale controversée. Elles font partie des Entérocoques ; l'incidence de ces faux-positifs serait donc plus faible en dénombrant les "Streptocoques fécaux", ensemble plus nombreux. La survie de ceux-ci en milieu hostile est souvent supérieure à celle d'Escherichia coli. Il existe donc une diversité de survie entre ces 2 indicateurs, qu'il faut mettre à profit pour refléter la diversité de comportement des pathogènes ;

- Spores de Clostridium perfringens, spores de Clostridium sulfito-réducteurs, spores de sulfito-réducteurs : ces dénominations ne sont pas synonymes, mais désignent des entités d'origine intestinale de moins en moins sûre, et douées d'une capacité de survie tellement prolongée que l'intérêt de ces catégories est faible. D'autres catégories d'anaérobies intestinaux ont été envisagées, mais sans suite actuellement.

- les bactériophages fécaux, virus parasites de bactéries intestinales : leur avantage serait de mieux représenter les virus pathogènes grâce à leur similitude de taille, de constitution,... Leur recherche est facile, mais leur dénombrement l'est moins. Leur spécificité intestinale est sujette à controverse.

- Des méthodes chimiques ont aussi été envisagées (dosage chromatographique du coprostanol et autres stérols fécaux) mais ne sont pas encore d'application générale.

Les deux meilleurs candidats sur le plan taxonomique seraient donc Escherichia coli et Streptocoques fécaux.

Sur le plan de la physiologie cellulaire, les bactéries indicatrices sont capables de multiplication active dans les milieux riches (intestin ; bouillons et géloses, même sélectifs). Mais dans les eaux

....

elles subissent, du fait des conditions hostiles (dilution des nutriments, irradiation solaire,...) des lésions (stress) qui les rendent sensibles aux conditions (désoxycholate, incubation à 44°C,...) utilisables sans dommage pour cultiver sélectivement les mêmes espèces avant stress. Une revivification préalable à la sélection est donc nécessaire si l'on veut prendre en compte cette fraction de cellules lésées, parfois largement majoritaire dans la population.

De nombreuses modifications du dénombrement direct sur gélose sélective après filtration ont été proposées pour tendre vers cette revivification. Mais il semble actuellement qu'aucune ne vaille la revivification en milieu liquide, qui conduit après repiquage sur milieu sélectif, au calcul d'un nombre le plus probable (NPP) et non plus à un comptage de colonies.

Ainsi la question de la revivification s'est-elle souvent transformée en une querelle sur les avantages et inconvénients de la "filtration" d'une part, et du "NPP" d'autre part. En tout cas il apparait que les deux techniques ne sont pas équivalentes, ce qui peut entraîner un écart d'une, voire deux catégories de qualité dans le système de classement français actuel.

Les normes règlementaires sont en effet exprimées en nombres de germes témoins de pollution fécale (maxima et tolérences de dépassement).

De nombreuses critiques peuvent-être faites à ces normes :

- l'établissement des concentrations maximales admissibles ne repose sur aucune base logique connue ; elles diffèrent d'un pays à l'autre ;

- certaines variations de qualité (dans les mers à marée) ont une fréquence plus courte (2/jour) que la fréquence de prélèvement (\ll 1/semaine), d'où des biais systématiques ;

- il n'y a pas, surtout, d'harmonisation des techniques de contrôle : nombre d'échantillons par saison, choix des indicateurs de contamination fécale, et surtout techniques microbiologiques.

Les données épidémiologiques récentes apportent néanmoins des éléments pour orienter la normalisation future. En effet les travaux de CABELLI et ceux qui ont suivi sur ce modèle, soit 7 enquêtes prospectives (5 en mer et 2 en eau douce ; 4 aux USA, 1 en Egypte, 1 en Espagne, 1 en France) ont mis en évidence de façon consistante les points suivants :

- sur une plage, il y a significativement plus de malades chez les baigneurs que chez les non-baigneurs ;

- il y a plus de malades chez les baigneurs en eau polluée qu'en eau peu-polluée ;

- le supplément de symptômes attribuable à la pollution microbienne concerne essentiellement les troubles gastro-intestinaux ; les enfants y sont les plus sensibles ;

- les indicateurs bactériens qui sont en relation significative avec ces symptômes (5 fois sur 7) sont : en premier lieu les streptocoques fécaux, et de façon un peu moins significative, les Escherichia coli ;

- quand ils ont été dénombrés, les autres groupes - Pseudomonas aeruginosa vibrions,... et particulièrement les "Coliformes totaux" et "Coliformes fécaux") n'ont pas montré de corrélation significative avec le supplément de troubles gastro-intestinaux attribuable à la baignade.

Beaucoup reste à faire pour mieux cerner les risques infectieux liés à la baignade, d'une part à propos des risques d'origine non fécale, et d'autre part au niveau de l'analyse des données épidémiologiques, qui gagnerait à être réalisée par des techniques statistiques plus récentes et plus adaptées (analyse vectorielle, régression multiple...). Ceci permettrait sinon de dégager un modèle mathématique du risque d'infection, du moins d'en aborder certains aspects : est-ce la contamination moyenne qui fait le risque, ou ses pointes momentanées, et comment la fréquence des baignades intervient-elle ?.

Cependant des enseignements peuvent être tirés dès maintenant, pour une organisation cohérente du contrôle des zones de baignade, des progrès récents rapportés dans cette étude, en épidémiologie analytique, en taxonomie et en physiologie microbienne.



BIBLIOGRAPHIE

OUVRAGES GENERAUX (*)

- A - BERG G. , Ed. 1978.
"Indicators of Viruses in Water and Food"
Ann Arbor Science Publishers, Inc., Ann Arbor, Michigan. 424 p.
- B - HOADLEY A.W. and DUTKA B.J., Edrs. 1977.
"Bacterial Indicators / Health Hazards Associated with Water"
A.S.T.M. Philadelphia, Pennsylvania. 356 p.
- C - JAMES A. and EVISON L., Edrs. 1979.
"Biological Indicators of Water Quality"
John Wiley and Sons, Ltd. Chichester. 601 p.
- D - DUTKA B.J., Ed. 1981.
"Membrane Filtration : Applications, Techniques and Problems"
Marcel Dekker, Inc., New-York. 612 p.
- E - "Aquatic Microbial Ecology" 1979.
Proc., A.S.M. Conference, Cleanwater Beach, Florida.
University of Maryland, College Park. 460 p.
- F - LITCHFIELD C.D. and SEYFRIED P.L., Edrs. 1978.
"Methodology for Biomass Determinations and Microbial Activities
in Sediments" - Technical Publication 673.
A.S.T.M. Philadelphia, Pennsylvania. 799 p.
- G - JONES J.G., Ed. 1979.
"A Guide to Methods for estimating Microbial Numbers and
Biomass in Freshwater"
Freshwater Biological Association, Ambleside, Cumbria, U.K. 112 p.
- H - COSTERTON J.W. and COLWELL R.R., Edrs. 1979.
"Native Aquatic Bacteria : Enumeration, Activity and Ecology"
A.S.T.M. Philadelphia, Pennsylvania. 214 p.

* Disponibles au Service des Eaux, Institut Pasteur de LILLE

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 - "Public Health Laboratory Service Committee on the Bacteriological Examination of Water Supplies" 1968.
J. Hyg. Camb. : 66 - 67.
- 2 - GAVINI F., LECLERC H., LEFEBVRE B., FERRAGUT C. et IZARD D. 1977.
"Etude taxonomique d'entérobactéries appartenant ou apparentées au genre Klebsiella"
Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur) 125 B : 253 - 269.
- 3 - GAVINI F., FERRAGUT C., IZARD D., TRINEL P.A., LECLERC H., LEFEBVRE B. et MOSSEL D.A.A. 1979.
"Serratia fonticola, a new species from water"
Intl. J. Syst. Bact., 30 : 1 - 6.
- 4 - BRENNER D.J., RICHARD C., STEIGERWALT A.G., ASBURY M.A. and MANDEL M. 1980.
"Enterobacter gergóviae sp. nov. : a new species of Enterobacteriaceae found in clinical specimens and the environment"
Intl. J. Syst. Bact., 30 : 1 - 6.
- 5 - ELROD R.P. 1942.
"The Erwinia coliform relationships"
J. Bact., 44 : 433.
- 6 - FRASER M.H., REID W.B. and MALCOLM J.F. 1956.
"The occurrence of coli-aerogenes organisms on plants"
J. Appl. Bact., 19 : 301.
- 7 - GELDREICH E.E., KENNER B.A. and KABLER P.W. 1964.
"The occurrence of coliforms, fecal coliforms and Streptococci on Vegetation and insects"
Appl. Microbiol., 12 : 63.
- 8 - PAPAVALASSIOU J., TZANNETIS S., YEKA H. and MICHAPOULOUS G. 1967.
"Coli-aerogenes bacteria on plants"
J. Appl. Bact., 30 : 219.
- 9 - DUNCAN D.W. and RAZZELL W.E. 1972.
"Klebsiella biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produces"
Appl. Microbiol., 24 : 933.
- 10 - DUFOUR A.P., CABELLI V.J. and LEVIN M.A. 1973.
"Occurrence of Klebsiella species in wastes from a textile finishing plant"
Abstr. Ann. Meet. Amer. Soc. Microbiol. Miami Beach, Florida,
- 11 - DUFOUR A.P. and CABELLI V.J. 1975.
"Membrane filter procedure for enumerating the component genera of the coliform group in sea-water"
Appl. Microbiol., 29 : 826 - 833.
- 12 - BONDE G.J. 1966.
"Bacteriological methods for estimation of water pollution"
Health Lab. Sci., 3 : 124.
- 13 - LUPO L., STRICKLAND E., DUFOUR A. and CABELLI V.J. 1975.
"Inaccurate estimates of total coliform densities due to oxidase positive bacteria"
A.S.M. Abstr. Ann. Meet. : 207.
- 14 - CLARK H.F. and KABLER P.W. 1964.
"The physiology of the coliform group" in :
"Principles and applications in aquatic microbiology", HEUKELEKIAN H. and DONDERO N., Edrs.
John Wiley and Sons, Inc., New-York.

- 15 - PRESSWOOD W.G. and STRONG D.K. 1978.
"Modification of m. FC medium by eliminating rosolic acid"
Appl. Environ. Microbiol., 36 (1) : 90 - 94.
- 16 - HOUSTON A.C. 1900.
"On the value of examination of water for Streptococci and Staphylococci with a view to detection of its recent contamination with animal organic matter"
Sup. 29 th Ann. Rept. Loc. Gov. Bd., London City Council, England : 458.
- 17 - SHERMAN J.M. 1937.
"The Streptococci"
Bact. Rev., 1 : 1.
- 18 - DEIBEL R.H. 1964.
"The group D Streptococci"
Bact. Rev., 28 : 330.
- 19 - COWELL R.R., HANDEL H. and RAJ H. 1967.
"The taxonomy of Enterococci"
Can. J. Microbiol., 13 : 917.
- 20 - HARTMAN P.A., REINBOLD G.W. and SARASWAT D.S. 1966.
"Indicator organisms : a review. I. Taxonomy of the fecal Streptococci"
Intl. J. Sys. Bact., 16 : 197.
- 21 - RAJ H. and COLWELL R.R. 1966.
"Taxonomy of Enterococci by computer analysis"
Can. J. Microbiol., 12 : 353.
- 22 - PAVLOVA M.T., BRELENSKI F.T. and LITSKY W. 1972.
"Evaluation of various media for isolation, enumeration and identification of fecal Streptococci from natural sources"
Health Lab. Sci., 9 : 289 - 298.
- 23 - KENNER B.A. , CLARK H.F. and KABLER P.W. 1961.
"Fecal Streptococci. I. Cultivation and enumeration of Streptococci in surface waters"
Appl. Microbiol., 9 : 15.
- 24 - DAoust R.A. and LITSKY W. 1975.
"Pfizer selective Enterococcus agar overlay method for enumeration of fecal Streptococcus by membrane filtration"
Appl. Microbiol., 29 : 584 - 589.
- 25 - SLANETZ L.W. and BARTLEY C.H. 1964.
"Detection and sanitary significance of fecal Streptococci in water"
Am. J. Public Health, 54 : 609 - 614.
- 26 - SWITZER R.E. and EVANS J.B. 1974.
"Evaluation of selective media for enumeration of group D Streptococci in bovine feces."
Appl. Microbiol., 28 : 1086 - 1087.
- 27 - SUCKLING E.V. 1943.
"The examination of waters and water supplies"
The Plakiston Co. Philadelphia. 105 p.
- 28 - COHEN J. and SHUVAL H.I. 1973.
"Coliforms, fecal coliforms and fecal Streptococci as indicators of water pollution"
Water, Air and Soil Poll., 2 : 1.
- 29 - KALINA G.P. 1973.
"A comparative evaluation of coliform bacteria as sanitary indicative microorganisms"
Vodosnabzheniye i sanitarnaya tehnika, 3 : 15.
- 30 - HUNDT J.O., JOHNSON A.H. and KHATCHIKIAN R. 1958.
"Incidence and nature of Enterococci on plant materials"
Food Res., 23 : 186 - 193.

- 31 - HUNDT J.O. and GRAHAM W.F. 1968.
 "Streptococcus faecium var. casseliflavus, nov. var.
 J. Bact., 95 : 2005 - 2009.
- 32 - HUNDT J.O., GRAHAM W.F. and McCARTHY I.E. 1967.
 "Spherical lactic acid - producing bacteria of southern grown raw
 and processed vegetables"
 Appl. Microbiol., 15 : 1303 - 1308.
- 33 - FACKLAM R.R. 1972.
 "Recognition of group D Streptococcal species of human origin by
 biochemical and physiological tests"
 Appl. Microbiol., 23 : 1131 - 1139.
- 34 - GELDREICH E.E. and KENNER B.A. 1969.
 "Concepts of fecal Streptococci in stream pollution"
 J. W. P. C. F., 41 : 336 - 352.
- 35 - BARTLEY C.H. and SLANETZ L.W. 1960.
 "Types and sanitary significance of fecal Streptococci isolated from
 feces, sewage and water"
 Am. J. Public Health, 50 : 1545 - 1552.
- 36 - GELDREICH E.E., KENNER B.A. and KABLER P.W. 1964.
 "Occurrence of coliforms, fecal coliforms and Streptococcus on
 vegetation and insects"
 Appl. Microbiol., 12 : 63.
- 37 - BONDE G.J. 1962.
 "Bacterial indicators of water pollution"
 Teknisk Forlag, Copenhagen.
- 38 - LEVINE H. 1921.
 "Bacteria fermenting lactose and their significance in water analysis"
 Iowa State College of Agriculture and Mechanical Arts Official
 Publication, 20 : 62.
- 39 - ROSEBURY T. 1962.
 "Microorganisms indigenous to man"
 McGraw-Hill, New-York : 87 - 90 ; 332 - 335.
- 40 - HAENEL H. 1970.
 "Human normal and abnormal gastrointestinal flora"
 Amer. J. Cl. Nutr., 23 : 1433.
- 41 - AKAMA K. and OTANI S. 1970.
 "Clostridium perfringens as the flora in the intestine of
 healthy adults"
 Japan J. Med. Sci., 23 : 161.
- 42 - MATCHES J.R. and LISTON J. 1974.
 "Mesophilic Clostridia in Puget Sound"
 Can. J. Microbiol., 20 : 1.
- 43 - SIDORENKO G.I. 1967.
 "Data on the distribution of Clostridium perfringens in the environment
 of man"
 J. Epidemiol. Hyg. Microbiol. Immunol., Moscow, 11 : 171.
- 44 - BONDE G.J. 1968.
 "Studies on the dispersion and disappearance phenomena of enteric
 bacteria in the marine environment"
 Rev. Int. Oceanogr. Med., 9 : 17.
- 45 - BONDE G.J. 1967.
 "Pollution of a marine environment"
 J. W. P. C. F., 39 : 45.

- 46 - GELDREICH E.E. 1978.
 "Bacterial populations and indicator concepts in feces, sewage and solid wastes" in :
 "Indicators of viruses in water and food", BERG G., Ed.
 Ann. Arbor Science Inc. , Ann Arbor, Michigan : 62.
- 47 - ZUBRZYVCKI L. and SPAULDING E.H. 1962.
 "Studies on the stability of the normal fecal flora"
 J. Bact., 83 : 968.
- 48 - EGGERTH A.H. and GAGNON B.H. 1933.
 "The Bacteroides of human feces"
 J. Bact., 25 : 389.
- 49 - TISSIER H. 1900.
 "Recherches sur la flore intestinale des nourissons (état normal et pathologique).
 Thèse. Paris.
- 50 - MOSSEL D.A.A. 1958.
 "The suitability of bifidobacteria as part of a more extended bacterial association, indicating faecal contamination of foods"
 Abstr. 7th Intl. Congr. Mikrobiol. , Stockholm : 440.
- 51 - EVISON L.M. and JAMES A. 1973.
 "A comparison of the distribution of intestinal bacteria in British and East African water sources"
 J. Appl. Bact., 36 : 109.
- 52 - HARISON R.W. and OPAL Z.Z. 1944.
 "Comparative studies on Lactobacilli isolated from the mouth and intestine"
 J. Dental Res., 23 : 1.
- 53 - NINOMIYA K. et. al. 1972.
 "Simple and expedient methods of differentiation among Bacteroides Sphaerophorus and Fusobacterium"
 Jap. J. Med. Sci. Biol., 25 : 63.
- 54 - D'HERELLE F. 1926.
 "The bacteriophage and its behavior"
 Williams and Wilkins Co., Baltimore, Maryland
- 55 - WAKSMAN S.A. and HOTCHKISS M. 1937.
 "Viability of bacteria in sea water"
 J. Bact., 33 : 389.
- 56 - ZOBELL C.E. 1946.
 "Marine Bacteriology"
 Chronica botanica Co., Waltham, Massachusetts.
- 57 - GILDEHEISTER E. and WATANADE H. 1931.
 "Study of the presence of bacterophage in surface waters"
 Zbl. Parasitenk. Abt. I, Orig., 122 : 566.
- 58 - SCHLOSSMANN K. 1932.
 "Existence of bacteriophage in water"
 Z. Hyg. Infektionskr., 114 : 65.
- 59 - DIENERT F. 1934.
 "The utility of investigations of bacteriophages in water"
 Bull. Acad. Med., 112 : 611.
- 60 - ETRILLARD P. and LAMBERT M. 1936.
 "The persistence of bacteriophage in ground water and in the earth"
 Water Poll. Abstr., 9 : 292.

- 68 - EMILIANOWICZ W. 1952.
 "Viability of the Anti-Vi-bacteriophage in natural aquatic habitats in comparison with viability of homologous typhoid bacteria"
 Bull. Inst. Mar. Trop. Med., Gdansk, 4 : 342.
- 69 - PESO O.A. and MIGNONE R.M. 1955.
 "The determination of Bacteriophages as an indicator of water pollution"
 Revta. Obr. Sanit. Nac., B. Aires, 34 : 433.
- 70 - BRISOU J. 1974.
 "Conference Interparlementaire des pays riverains sur la lutte contre la pollution de la Mer Méditerranée"
 C. I. E. S. M., Roma.
- 71 - C. D. C., Salmonella Surveillance ; Communicable Disease Center 1963.
 Typhoid at Covington State Park, Louisiana, C. D. C. Atlanta, GA.
- 72 - ANON. 1972.
 "Typhoid fever - Alabama"
 Morbidity and Mortality Weekly Reports, 21 : 280.
- 73 - ROSENBERG M.L., HAZLET K.K., SCHAEFER J., WELLS J.G. and PRUNEDAR C. 1976.
 "Shigellosis from swimming"
 J. Am. Med. Ass., 236 : 1849.
- 74 - BRYAN J.A., LEHMANN J.D., SETIADI T.F. and HATCH M.H. 1974.
 "An outbreak of hepatitis - A associated with recreational lake water"
 Am. J. Epidemiol., 99 : 145 - 151.
- 75 - Center for Disease Control 1976.
 "Human leptospirosis"
 C. D. C. Veterinary Publ. Health Notes ; Tennessee.
- 61 - GUELIN A. 1948.
 "Etude quantitative des bactériophages de la mer"
 Ann. Inst. Pasteur, Paris, 74 : 104.
- 62 - GUELIN A. 1948.
 "Etude des bactériophages typhiques VI dans les eaux"
 Ann. Inst. Pasteur, Paris, 75 : 485.
- 63 - GUELIN A. 1950.
 "Sur le choix des souches étalons pour la détection du bacille typhique dans les eaux par la recherche des bactériophages spécifiques"
 Ann. Inst. Pasteur, Paris, 79 : 186.
- 64 - GUELIN A. 1950.
 "Sur la présence du bactériophage perfringens dans les eaux et son rôle dans l'épuration des eaux stagnantes"
 Ann. Inst. Pasteur, Paris, 79 : 447.
- 65 - BERG G. 1969.
 "Discussion, Proc. 4th Intl. Conf. Water Poll. Res., Prague"
 Jenkins S.H., Ed., Pergamon Press, Oxford : 833.
- 66 - KATT Y., ROZE N., SPERBER S. and BETZER N. 1974.
 "Bacteriophages as viral pollution indicators"
 Water Res., 8 : 165.
- 67 - VAUGHN J.M. and METCALF T.G. 1975.
 "Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising estuarine waters"
 Water Res., 9 : 913.

- 76 - BLAINE W.B. 1974.
"Epidemiology of cholera in Italy in 1973"
Lancet, 7 : 1370 - 1374.
- 77 - BLAKE P.A., ROSENBERG M.L. and BANDEJRACOSTA J. 1977.
"Cholera in Portugal, 1974, I, Mode of transmission"
Am. J. Epidemiol., 105 : 337 - 343.
- 78 - BLAKE P.A., ROSENBERG M.L. and FLORENSIA J. 1977.
"Cholera in Portugal, 1974, II, transmission by bottled mineral water"
Am. J. Epidemiol., 105 : 344 - 348.
- 79 - BRICOUT F. 1980.
"Diarrhées d'étiologie virale"
Rev. Inst. Pasteur de Lyon, 13 : 107 - 110.
- 80 - CRAUN G.F. 1978.
"Disease outbreaks caused by drinking water"
J. W. P. C. F. , 50 : 1362.
- 81 - CRAUN G.F. 1979.
"Disease outbreaks caused by drinking water"
J. W. P. C. F. , 51 : 1751.
- 82 - HARVEY S., GREENWOOD J.R., PICKETT M.J. and MAH R.A. 1976.
"Recovery of Yersinia enterocolitica from stream and lakes of California"
Appl. environ. Microbiol., 32 : 352 - 354.
- 83 - KAPPERUD G. and JONSSON B. 1978.
"Yersinia enterocolitica et bactéries apparentées, isolées à partir
d'écosystèmes d'eau douce en Norvège"
Med. et Mal. Infect., 8 : 500 - 506.
- 84 - SCHIEMANN C.A. 1978.
"Isolation of Yersinia enterocolitica from surface and well waters
in Ontario"
Can. J. Microbiol., 24 : 1048 - 1052.
- 85 - BARRE N., BERCOVIER H., LAROCHE H., LEDOUCHET C. and
BRAULT J. 1979.
"Bilan d'une enquête épidémiologique sur les yersiniooses dans un
écosystème agrosylvatique en région parisienne, I, Recherche des
Yersinia dans les populations animales sauvages"
Méd. et Mal. Infect., 9 : 135 - 139.
- 86 - Center for Disease Control 1978.
Morb. and Mort. Wkly. Rpt., 81 : 139.
- 87 - WINNER H.I. and HURLEY R. 1964.
"Candida albicans"
Little, Brown and Co., Boston.
- 88 - SHERRY J.P., KUCHMA S.R. and DUTKA B.J. 1979.
"The occurrence of Candida albicans in Lake Ontario bathing beaches"
Can. J. Microbiol., 25 : 1036 - 1044.
- 89 - AHEARN D.G., ROTH F.J., Jr. and MEYERS S.P. 1968.
"Ecology and characterization of yeasts from aquatic regions of
South Florida"
Mar. Biol., 1 : 291 - 308.
- 90 - FELL J.W. and VAN UDEN N. 1963.
in : "Symposium on Marine Microbiology" ; Oppenheimer C.M., Ed.,
C. C. THOMAS, Springfield, Illinois : 329 - 340.

- 91 - CRAUN G.F. 1979. "Waterborne giardiasis in the United States" Am. J. Public Health, 69 : 817.
- 92 - CRAUN G.F. 1979. "Waterborne outbreaks of giardiasis" in : "Waterborne Transmission of Giardiasis", USEPA, Cincinnati, Ohio : 127 - 149.
- 93 - WOLFE M.S. 1979. "Giardiasis" Pediatr. Clin. North Am., 26 : 295.
- 94 - MEYER E.A., JARROLL E.L. 1980. "Giardiasis" Am. J. Epidemiol., 111 : 1.
- 95 - JURANEK D. 1979. "Waterborne giardiasis (summary of recent epidemiologic investigations and assessment of methodology), in : "Waterborne Transmission of Giardiasis", JAKUBOWSKI W. and HOFF J.C., Edrs., USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 96 - SHUVAL H.I. 1975. "The case for microbial standards for bathing beaches", in : "Discharge of Sewage from sea outfalls", GAMESON H., Ed. Pergamon Press, London : 95 - 101.
- 97 - MOORE B. 1975. "The case against microbial standards for bathing beaches", in : "Discharge of sewage from sea outfalls", GAMESON H., Ed. Pergamon Press, London : 103 - 110.
- 98 - Committee on Environmental Quality Management of Sanitary Engineering Division 1970. "Engineering evaluation of the virus hazard in water" J. San. Eng. Div., A. S. C. E., 96 : 111.
- 99 - GELDREICH E.E. and CLARKE N.A. 1971. "The coliform test : a criterion for the viral safety of water" Proc. 13th Water Quality Conf., Univ. of Illinois Bull., 69 : 103.
- 100 - CLARKE N.A., BERG G., LIU O.C., METCALF T., SULLIVAN R. and VLASSOFF L.F. 1969. "Committee Report : viruses in water" J. Am. Water Works Assoc., 61 : 491.
- 101 - BONDE G.J. 1974. "Bacterial indicators of sewage pollution" in : "Proc. Intl. Symp. Discharge Sewage from Sea Outfalls", Gameson H., Ed., Pergamon Press, London : 37 - 47.
- 102 - DUTKA B.J. 1973. "Coliforms are an inadequate index of water quality" J. Environ. Health, 36 : 39 - 46.
- 103 - FUGATE K.J., CLIVER D.O. and HATCH M.T. 1975. "Enteroviruses and potential bacterial indicators in Gulf Coast oysters" J. Milk Food Technol., 38 : 100 - 104.
- 104 - CABELLI V.J. 1979. "Evaluation of recreational water quality, the E. P. A. approach", in : "Biological Indicators of Water Quality", James A. and Evison L., Edrs. John Wiley and Sons, Ltd. Chichester : 14-1 - 14-23.
- 105 - VON GRAEVENITZ A. and MENSCH A.H. 1968. "The genus Aeromonas in human bacteriology" N. Engl. J. Med., 278 : 245 - 249.
- 106 - WASHINGTON J.A. 1972. "Aeromonas hydrophila in clinical bacteriologic specimens" Ann. Intern. Med., 76 : 611 - 614.

- 91 - CRAUN G.F. 1979.
 "Waterborne giardiasis in the United States"
 Am. J. Public Health, 69 : 817.
- 92 - CRAUN G.F. 1979.
 "Waterborne outbreaks of giardiasis" in :
 "Waterborne Transmission of Giardiasis", USEPA, Cincinnati,
 Ohio : 127 - 149.
- 93 - WOLFE M.S. 1979.
 "Giardiasis"
 Pediatr. Clin. North Am., 26 : 295.
- 94 - MEYER E.A., JARROLL E.L. 1980.
 "Giardiasis"
 Am. J. Epidemiol., 111 : 1.
- 95 - JURANEK D. 1979.
 "Waterborne giardiasis (summary of recent epidemiologic investigations
 and assessment of methodology), in :
 "Waterborne Transmission of Giardiasis", JAKUBOWSKI W. and
 HOFF J.C., Edrs., USEPA, Cincinnati, Ohio.
- 96 - SHUVAL H.I. 1975.
 "The case for microbial standards for bathing beaches", in :
 "Discharge of Sewage from sea outfalls", GAMESON H., Ed.
 Pergamon Press, London : 95 - 101.
- 97 - MOORE B. 1975.
 "The case against microbial standards for bathing beaches", in :
 "Discharge of sewage from sea outfalls", GAMESON H., Ed.
 Pergamon Press, London : 103 - 110.
- 98 - Committee on Environmental Quality Management of Sanitary
 Engineering Division 1970.
 "Engineering evaluation of the virus hazard in water"
 J. San. Eng. Div., A. S. C. E., 96 : 111.
- 99 - GELDREICH E.E. and CLARKE N.A. 1971.
 "The coliform test : a criterion for the viral safety of water"
 Proc. 13th Water Quality Conf., Univ. of Illinois Bull., 69 : 103.
- 100 - CLARKE N.A., BERG G., LIU O.C., METCALF T., SULLIVAN R.
 and VLASSOFF L.F. 1969.
 "Committee Report : viruses in water"
 J. Am. Water Works Assoc., 61 : 491.
- 101 - BONDE G.J. 1974.
 "Bacterial indicators of sewage pollution" in :
 "Proc. Intl. Symp. Discharge Sewage from Sea Outfalls",
 Gameson H., Ed., Pergamon Press, London : 37 - 47.
- 102 - DUTKA B.J. 1973.
 "Coliforms are an inadequate index of water quality"
 J. Environ. Health, 36 : 39 - 46.
- 103 - FUGATE K.J., CLIVER D.O. and HATCH M.T. 1975.
 "Enteroviruses and potential bacterial indicators in Gulf Coast oysters"
 J. Milk Food Technol., 38 : 100 - 104.
- 104 - CABELLI V.J. 1979.
 "Evaluation of recreational water quality, the E. P. A. approach", in :
 "Biological Indicators of Water Quality", James A. and Evison L., Edrs.
 John Wiley and Sons, Ltd. Chichester : 14-1 - 14-23.
- 105 - VON GRAEVENITZ A. and MENSCH A.H. 1968.
 "The genus Aeromonas in human bacteriology"
 N. Engl. J. Med., 278 : 245 - 249.
- 106 - WASHINGTON J.A. 1972.
 "Aeromonas hydrophila in clinical bacteriologic specimens"
 Ann. Intern. Med., 76 : 611 - 614.

- 107 - HANSON P.G., STRANDRIDGE J.F. and MAKI D.G. 1977.
 "Freshwater wound infection due to Aeromonas hydrophila"
 J. Am. Med. Assoc., 238 : 1053 - 1054.
- 108 - FRAIRE A.E. 1978.
 "Aeromonas hydrophila infection"
 J. Am. Med. Assoc., 239 : 192.
- 109 - GOLTEN C. and SCHEFFERS W.A. 1975.
 "Marine vibrios isolated from water along the Dutch coast"
 Neth. J. Res. 9 : 351 - 364.
- 110 - FINKELSTEIN R.A. 1973.
 "Chemical Rubber Company Critical Reviews in Microbiology"
2 : 553 - 623.
- 111 - HOADLEY A.W. and KNIGHT D.E. 1975.
 "External otitis among swimmers and nonswimmers"
 Arch. Environ. Health, 30 : 445 - 448.
- 112 - COTHRAN W.W. and HATLEN J.B. 1962.
 Student Medicine, 10: 493 - 502.
- 113 - McCausland R.S. and COX P.J. 1975.
 "Pseudomonas infection traced to a motel whirlpool"
 J. Environ. Health, 37 : 445 - 459.
- 114 - CABELLI V.J., LEVIN M.A., DUFOUR A.P. and McCABE L.J. 1974.
in : "International Symposium on Discharge of Sewage from Sea Outfalls"
 Gameson H., Ed., Pergamon Press, London : 63 - 73.
- 115 - FOSTER D.H., HANES N.B. and LORD S.M. 1971.
 "A critical examination of bathing water quality standards."
 J. W. P. C. F., 43 : 2229 - 2241.
- 116 - MALLMANN W.L. 1928.
 "Streptococcus as an indicator of swimming pool pollution"
 Am. J. Public Health, 18 : 771.
- 117 - SELIGMAN E.B. 1951.
 "Studies of Streptococci and Micrococci as indicators of
 pollution in swimming pool waters"
 These, Michigan State University.
- 118 - FAVERO M.S., DRAKE C.H. and RANDALL G.B. 1964.
 "Use of Staphylococci as indicators of swimming pool pollution"
 Public Health Rep., 79 : 61.
- 119 - YU V.L. 1981.
 "Legionnaires'disease : an epidemiologic overview"
 J. Am. Med. Ass., 245 : 1.
- 120 - EICKOFF T.C. 1979.
 "Epidemiology of Legionella disease"
 Ann. Inter. Med., 90 : 499 - 502.
- 121 - NORTHROP R., BECKER C., CORDELL R., SULITA M., ALTMAN N.,
 ANDERSON R. and KUSEK J. 1981.
 "Health effects of sewage aerosols : additionnal serological surveys
 and search for Legionella pneumophila in sewage"
 Report E. P. A. 600/51-81-032. U. S. E. P. A. Cincinatti, Ohio.
- 122 - DELATTRE J.M. et OGER C. 1981.
 "Naegleria fowleri and heated aquatic environments : a possible
 mechanism"
 Ann. Soc. belge Med. Trop., 61 : 441 - 452.
- 123 - DE JONCKEERE J. and VAN DE VOORDE H. 1977.
 "The distribution of Naegleria fowleri in man-made thermal waters"
 J. Trop. Med. Hygiene, 26 : 10 - 15.

- 124 - JADIN J.B., HERMANNE J., ROBYN G., WILLAERT E.
VAN MAERCKE Y. and STEVENS W. 1971.
"Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive observés
à Anvers (Belgique)"
Ann. Soc. Belge Méd. Trop., 51 : 255 - 266.
- 125 - CARTER R.F. 1968.
"Primary amoebic meningoencephalitis : clinical, pathological and
epidemiological features of six fatal cases"
J. Pathol., 96 : 1.
- 126 - ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE 1975.
"Guides and criteria for recreational quality of beaches and coastal
waters"
Report of a working group, W. H. O., Copenhagen.
- 127 - MOORE B. 1977.
"The E. E. C. bathing water directive"
Mar. Poll. Bull., 8 : 269 - 272.
- 128 - GAMESON A.L.H. 1979.
"E. E. C. directive on quality of bathing water"
Wat. Poll. Control, 78 : 206 - 214.
- 129 - OMS/PNUE. 1976.
"Protection de la Méditerranée contre la pollution d'origine
tellurique : aperçu des législations nationales"
Genève.
- 130 - Subcommittee on Water Quality Control 1969.
"Water quality standards of the United States territories and the
district of Columbia."
Am. Pub. Health Ass., New-York.
- 131 - Federal Water Pollution Control Administration 1968.
"Water quality criteria"
Report of the national technical advisory committee to the Secretary
of the Interior, Washington DC
- 132 - In : "Health criteria and epidemiological studies related to coastal
water pollution" 1977.
Report of a working group. WHO/UNEP, WHO, Copenhagen.
- 133 - OWENS J.O. 1978.
"Coliform and Escherichia coli bacteria in sea water around
Penang Island, Malaysia"
Water Res., 12 : 365 - 370
- 134 - STELLMANN C. 1977.
"Application of statistical methods to bacterial count. Model
of bacterial counting on solid medium taking confluence into
consideration"
Rev. Inst. Pasteur Lyon, 10 : 233.
- 135 - GELDREICH E.E. 1981.
"Membrane filter techniques for total coliform and fecal coliform
population in water" in :
"Membrane Filtration : Applications, Techniques and Problems"
Dutka B., Ed., Marcel Dekker, Inc. New-York and Basel.
- 136 - DE MAN J.C. 1975.
"The probability of most probable numbers"
Europ J. Appl. Microbiol., 1 : 67 - 78.
- 137 - PUGSLEY A.P. and EVISON L.M. 1975.
"A fluorescent antibody technique for the enumeration of faecal
Streptococci in water"
J. Appl. Bact., 38 : 63 - 65.

- 138 - HACKNEY C.R., RAY B. and SPECK M.L. 1979.
 "Repair detection procedure for enumeration of fecal coliforms and Enterococci from seafoods and marine environments"
 Appl. Environ. Microbiol., 37 : 947 - 953.
- 139 - WILKINS J.R. and BOYKIN E.H. 1976.
 "Analytical notes - Electrochemical method for early detection and monitoring of coliforms"
 JAWWA., 68 : 257 - 263.
- 140 - SMITH L.L. and GOURON R.E. 1969.
 "Sterol metabolism. Detection of 5 μ ol in polluted waters"
 Water Res., 3 : 141 - 148.
- 141 - DUTKA B.J., CHAU A.S.Y. and COBURN J. 1974.
 "Relationships between bacterial indicators of water pollution and faecal sterols"
 Water Res., 8 : 1047.
- 142 - BACHRACH U. and BACHRACH Z. 1974.
 Radiometric method for the detection of coliform organisms in water"
 Appl. Microbiol., 28 : 169 - 171.
- 143 - THOMAS H.A. 1955.
 "Statistical analysis of coliform data"
 Sewage and Industrial Wastes, 27 : 212 - 222.
- 144 - THIERS G. and TRIGUL M. 1976.
 "Comparative study of results and cost of bacteriological analysis of water by the tube dilution method and by membrane filtration"
 Arch. Inst. Pasteur, Tunis, 53 : 249.
- 145 - MIDDLEBROOKS E.J., et al. 1978.
 "MPM and MF coliform concentrations in lagoon effluents"
 J. W. P. C. F., 50 : 2530
- 146 - SEYFRIED P.L. and OWEN A.R.G. 1979.
 "Evaluation of the most probable number technique for the enumeration of fecal coliforms and Pseudomonas aeruginosa in sediment", in :
 "Methodology for Biomass Determinations and Microbial Activities in Sediments"
 LITCHFIELD C.D. and SEYFRIED P.L., Edrs.,
 A. S. T.M., Philadelphia, Pennsylvania.
- 147 - MELMED L.N. 1966.
 "Membrane filtration used for Escherichia coli counts in sewage works effluents and the effect of sample storage on these counts"
 J. Proc. Inst. Sewage Purif., 3 : 272 - 279.
- 148 - PYLE B.H. and DAVIS J.C.A. 1978.
 "Methods for coliform enumeration in water"
 Draft report to biological standing working party of water quality research committee, Water resources council, national water and soil conservation organisation, New Zealand.
- 149 - PETERSON J. 1974.
 "Comparison of the MF technique and MPN technique for the estimation of coliforms in water"
 Public Health Laboratory, 32 : 182 - 193.
- 150 - LIN S.D. 1973.
 "Evaluation of coliform test for chlorinated secondary effluents"
 J. W. P. C. F., 45 : 498 - 506.

- 151 - GREEN B.L., CLAUSEN E.M. and LITSKY W. 1977.
 "Two temperature membrane filter method for enumerating fecal coliform bacteria from chlorinated effluents"
 Appl. Environ. Microbiol., 33 : 1259 - 1264.
- 152 - EIJKMAN C. 1904.
 "Die Garungsprobe bei 46° als Hilfsmittel bei der Trinkwasseruntersuchung"
 Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionsker, Abt., I., Orig., 37 : 742.
- 153 - LEITNER W.L. 1929.
 "The Eijkman fermentation test as an aid in the detection of fecal organisms in water"
 Am. J. Hyg., 9 : 705 - 734.
- 154 - ENDO S. 1904.
 "Ueber ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbacillen"
 Zbl. Bakt. Parasitenk. Infektionsker, Orig., 35 : 109.
- 155 - FIFIELD C.W. and SCHAUFUS C.P. 1958.
 "Improved membrane filter medium for the detection of coliform organisms"
 J. Am. W. A., 50 : 193.
- 156 - McCARTHY J.A., DELANEY J.F. and GRASSO R.J. 1961.
 "Measuring coliforms in water"
 Water Sewage Works, 108 : 238 - 243.
- 157 - CHAPMAN G.H. 1947.
 A superior culture medium for the enumeration and differentiation of coliforms"
 J. Bact., 53 : 504.
- 158 - JAMESON J.E. and EMBERLEY N.W. 1956.
 "A substitute for bile salts in culture media"
 J. Gen. Microbiol., 15 : 198 - 204.
- 159 - BURMAN N.P. 1967.
 "Developments in membrane filtration technique : 2 - Adaptation to routine and special requirements"
 Proc. Soc. Water Treat. Exam., 16 : 40.
- 160 - PHELPS E.B. and HAMMOND F.S. 1909.
 "A study of certain paracolon forms found in polluted deep wells."
 Am. J. Public Hyg., 19 : 545.
- 161 - McCONKEY A. 1909.
 "Further observations on the differentiation of lactose - fermenting bacilli with special reference to those of intestinal origin"
 J. Hyg., 9 : 86.
- 162 - MUER J.C. and HARRIS R.L. 1920
 "Value of brilliant green eliminating errors due to the anaerobes in the presumptive test for B. coli"
 Am. J. Public Health, 10 : 874.
- 163 - MALMANN W.L. and DARBY C.W. 1941.
 "Uses of a lauryl sulfate tryptose broth for the detection of coliform organisms"
 Am. J. Public Health, 31 : 127.
- 164 - COWLES P.B. 1938.
 "A modified lactose broth for use in the presumptive test"
 J. A. W. A., 30 : 979.

- 165 - FOLPMERS T. 1948.
 "Is it justified to use lactose for detection of B. coli in the presumptive test of routine water analysis ?"
 Antonie van Leeuwenhoek, 14 : 58.
- 166 - GRAY R.D. 1964.
 "An improved formate lactose glutamate medium for the detection of Escherichia coli-and other coliform organisms in water"
 J. Hyg., Camb., 62 : 495.
- 167 - MACKENZIE E.F.W., TAYLOR E.W. and GILBERT W.F. 1948.
 "Recent experiences in the rapid identification of Bacterium coli type I"
 J. Gen. Microbiol., 2 : 197.
- 168 - GELDREICH E.E., CLARK H.F., HUFF C.B. and BEST L.C. 1965.
 "Fecal coliform organism medium for the membrane filter technique"
 J. A. W. A., 57 : 208 - 214.
- 169 - DUFOUR A.P., STRICKLAND E.R. and CABELLI V.J. 1981.
 "Membrane filter method for enumerating Escherichia coli"
 Appl. Environ. Microbiol., 41 : 1152 - 1158.
- 170 - DUFOUR A.P. and CABELLI V.J. 1975.
 "Membrane filter procedure for enumerating the component genera of the coliform group in seawater"
 J. Appl. Microbiol., 29 : 826 - 833.
- 171 - ANDREWS W.H. and PRESNELL M.W. 1972.
 "Rapid recovery of Escherichia coli from estuarine water"
 Appl. Microbiol., 23 : 521 - 523.
- 172 - HAJNA A.A. and PERRY C.A. 1943.
 "Comparative study of presumptive and confirmative media for bacteria of the coliform group and for fecal streptococci"
 Am. J. Public Health, 33 : 550.
- 173 - OPARA A.A., MARA D.D. and WHEATER D.W.F. 1977.
 "Teepol and Triton media for the enumeration of Escherichia coli by membrane filtration"
 Water Res., 11 : 949 - 954.
- 174 - DUTKA B.J., KUCHMA S. and KWAN K.K. 1979.
 "Fecal coliform and Ecoli estimates : tip of the iceberg"
 Water, Air and Soil Poll., 11 : 349 - 362.
- 175 - EVISON L. and TOSTI E. 1980.
 "Bathing water quality in the North Sea and the Mediterranean"
 Mar. Poll. Bull., 11 : 72 - 75.
- 176 - PAGEL J.E., QURESHI A.A., YOUNG D.M. and VLASSOF L.T. 1982.
 "Comparison of for membrane filter methods for fecal coliform enumeration"
 Appl. Environ. Microbiol., 43 : 787 - 793.
- 177 - LICHTIGFELD S. and MELMED L.N. 1981.
 "The suitability of m-Endo LES agar for total coliform counts by membrane filtration"
 Water S.A., 8 : 173 - 178.
- 178 - McPETERS G.A., CAMERON S.C. and LE CHEVALLIER M.W. 1982.
 "Influence of diluents, media and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria"
 Appl. Environ. Microbiol., 43 : 97 - 103.

- 179 - LE CHEVALLIER H.W., CAMERON S.C. and McFETERS G.A. 1983.
 "New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water"
 Appl. Environ. Microbiol., 45 : 484 - 492.
- 180 - ALIVISATOS G.P. and PAPADAKIS J.A. 1975.
 "McConkey and glutamate media in the bacteriological examination of seawater"
 J. Appl. Bact., 39 : 287 - 293.
- 181 - PAPADAKIS J.A. 1975.
 "Bacteriological examination of seawater : observations on factors affecting the performance of media"
 J. Appl. Bact., 39 : 295 - 305.
- 182 - HUNT D.A. 1978.
 "Comparison of two rapid test procedures with the standard EC test for the recovery of fecal coliform bacteria from shellfish growing waters"
 Proc. 10th Natl. Shellfish Sanitation Workshop,
 Hunt Valley, Maryland, FDA, Washington, DC : 41 - 48.
- 183 - MIESCIER J.J., CARR V.E., MUSSELMAN J.F. and FURFARI S.A. 1978.
 "Fecal coliform methods for examination of sea water : Interlaboratory evaluation of split sample analysis"
 J. A. O. A. C., 61 : 772 - 778.
- 184 - TAYLOR E.W., BURMAN N.P. and OLIVER C.W. 1955.
 "Membrane filtration technique applied to the routine bacteriological examination of water"
 J. Inst. Wat. Eng., 9 : 248 - 263.
- 185 - BISSONNETTE G.K., JEKESKI J.J., McFETERS G.A. and STUART D.G. 1975.
 "Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters"
 Appl. Microbiol., 29 : 186 - 194.
- 186 - STUART D.S., McFETERS G.A. and SCHILLINGER J.E. 1977.
 "Membrane filter technique for the quantification of stressed fecal coliforms in the aquatic environment"
 Appl. Environ. Microbiol., 34 : 42 - 46.
- 187 - LIN S.D. 1977.
 "Comparison of membranes for fecal coliform recovery in chlorinated effluents"
 J.W.P.C.F., 49 : 2255 - 2264.
- 188 - TOBIN R.S. and DUTKA B.J. 1977.
 "Comparison of the surface metal binding and fecal coliform recoveries of nine membrane filters"
 Appl. Environ. Microbiol., 34 : 69 - 79.
- 189 - SLADEK K.J., SUSLAVCH K.V., SOHN B.I. and DAWSON F.W. 1975.
 "Optimum membrane structures for growth of coliform and fecal coliform organisms"
 Appl. Microbiol. 30 : 685 - 691.
- 190 - ROSE R.E., GELDREICH E.E. and LITSKY W. 1975.
 "Improved membrane filter method for fecal coliform analysis"
 Appl. Microbiol., 28 : 474 - 480.
- 191 - DUTKA B.J., JACKSON M.J. and BELL J. B. 1974.
 "Comparison of autoclave and ethylene oxide-sterilized membrane filters used in water quality studies"
 Appl. Microbiol., 32 : 474 - 480.
- 192 - LIN S.D. 1976.
 "Evaluation of Millipore HA and HC membrane filters for the enumeration of indicator bacteria"
 Appl. Environ. Microbiol., 32 : 300 - 302.

- 193 - DAVENPORT C.V., SPARROW E.B. and GORDON R.C. 1976.
 "Fecal indicator bacteria persistence under natural conditions
 in an ice-covered river"
 Appl. Environ. Microbiol., 32 : 527 - 536.
- 194 - KENNER B.A., CLARK H.F. and KABLER P.W. 1960
 "Fecal Streptococci II. Quantification of Streptococci in feces"
 Am. J. Public Health, 50 : 1553 - 1559.
- 195 - SLANETZ L.W. and BARTLEY C.H. 1957.
 "Numbers of Enterococci in water, sewage and feces determined
 by the membrane filter technique with an improved medium"
 J. Bact., 74 : 591 - 595.
- 196 - ISENBURG H.D., GOLDBERG D. and SAMPSON J. 1970.
 "Laboratory studies with a selective Enterococcus medium"
 Appl. Microbiol., 20 : 433 - 436.
- 197 - LEVIN M.A., FISCHER J.R. and CABELLI V.J. 1975.
 "Membrane filter technique for enumeration of Enterococci in
 marine waters"
 Appl. Microbiol., 30 : 66- 71.
- 198 - HANNAY C.L. and NORTON I.L. 1947.
 "Enumeration, isolation and study of fecal Streptococci from
 river water"
 Proc. Soc. Appl. Bact., 10 : 39.
- 199 - MALMANN W.L. and SELIGMANN E.B., Jr. 1950.
 "A comparative study of media for the detection of Streptococci
 in water and sewage"
 Am. J. Public Health, 40 : 286 - 289.
- 200 - LITSKY W., MALMANN W.L. and FIFIELD C.W. 1953.
 "A new medium for the detection of Enterococci in water"
 Am. J. Public Health, 43 : 873 - 879.
- 201 - GELDREICH E.E. 1976.
 "Fecal coliform and fecal Streptococcus density relationships
 in waste discharges and receiving waters"
 C.R.C. Environ. Control., 6 : 349 - 369.
- 202 - PAVLOVA M.T., BREZENSKI F.T. and LITSKY W. 1972.
 "Evaluation of various media for isolation, enumeration and
 identification of fecal Streptococci from natural sources"
 Health Lab. Sci., 9 : 289 - 298.
- 203 - SWITZER R.E. and EVANS J.B. 1974.
 "Evaluation of selective media for enumeration of group D
Streptococci in bovine feces"
 Appl. Microbiol., 28 : 1086 - 1087.
- 204 - BUCK J.D. 1972.
 "Selective detection of Enterococci in marine waters"
 Am. J. Public Health, 62 : 419 - 421.
- 205 - CROFT C.C. 1959.
 "A comparative study of media for detection of Enterococci
 in water"
 Am. J. Public Health, 49 : 1379 - 1387.
- 206 - SAYLER G.S., NELSON J.D., JUSTICE A. and COLWELL R.R. 1975.
 "Distribution and significance of fecal indicator organism
 in the upper Chesapeake Bay"
 Appl. Microbiol., 30 : 625 - 638.

- 207 - BISSONNETTE G.K. 1974.
 "Recovery characteristics of bacteria injured in the natural aquatic environment"
 Doct. thesis Montana State University, Bozeman, Montana.
- 208 - BURMAN N.P. 1961.
 "Some observations on coli aerogenes bacteria and Streptococci in water"
 J. Appl. Bact., 24 : 368 - 376.
- 209 - GREEN B.L., CLAUSEN E.M. and LITSKY W. 1977.
 "Two temperature membrane filter method for enumeration of fecal coliform bacteria from chlorinated effluents"
 Appl. Environ. Microbiol., 32 : 1259 - 1264.
- 210 - "REPORT 71" 1969.
 "The bacteriological examination of water supplies"
 Reports on public health and medical subjects n° 71.
 HMSO. Dept. of Health and Social Security,
 Welsh Office and Department of Environment - London.
- 211 - LECLERC H. et LAHOUSSE 1976.
 "Sur la pollution microbienne des plages"
 Rapport d'Etude Bibliographique, Institut Pasteur/Agence de Bassin Artôis-Picardie. : 65 p. + 1 annexe : 11 p.
- 212 - LEPTOSPIRA REFERENCE LABORATORIES 1982.
 "Leptospirosis in man", British Isles 1981.
 Brit. Med. J., 284 : 1276.
- 213 - Committee on Bathing Beach Contamination of the Public Health Laboratory Service 1959.
 "Sewage contamination of coastal bathing waters in England and Wales"
 J. Hyg., 57 : 435 - 472.
- 214 - RYAN W.J. 1977.
 "Marine vibrios associated with Superficial septic lesions"
 J. Clin. Path., 29 : 101.
- 215 - PIEN F. 1977.
 "Vibrio alginolyticus infections in Hawaiï"
 J. Clin. Microbiol., 5 : 670.
- 216 - STEVENSON A.H. 1953.
 "Studies of bathing water quality and health"
 J. Clin. Public Health Assoc., 43 : 529.
- 217 - CABELLI V.J. 1980.
 "Health effects criteria for marine recreational waters"
 EPA - 600/1-80-031 : 132 p.
- 218 - CABELLI V.J. 1975.
 "Relationship of microbial indicators to health effects at marine bathing beaches"
 EPA Washington DC.
- 219 - KTSANES V.K. 1981.
 "Health effects of swimming in lake Pontchartrain at New Orleans"
 EPA - 600/1-81-027.
- 220 - McKEE G.L. 1980.
 "Developpement of health effects criteria for freshwater bathing beaches by use of microbial indicators"
 Thèse : 219 p.
- 221 - MUJERIEGO R., BRAVO J.M. and FELIU M.T. 1982.
 "Recreation on Coastal waters : public health implications"
 With workshop on marine pollution of the Mediterranean : 1 - 8.

- 222 - FOULON G., MAURIN J., NGUYEN BINH QUOI, MARTIN - BOUYER G. 1982.
"Etude de la morbidité humaine en relation avec la pollution
bactériologique des eaux de baignade en mer"
(communication personnelle).
- 223 - DUFOUR A.P., STRICKLAND E.R. and CABELLI V.J. 1975.
"A procedure for enumerating thermotolerant E. coli in surface waters"
9th national shellfish sanitation workshop. FDA, Washington, D.C.
- 224 - 1971.
"Standard methods for examination of water and wastewater"
13th ed. American public health association Inc., New-York.
- 225 - BAUMANN P. 1968.
"Isolation of Acinetobacter from Soil and Water"
J. Bact., 96 : 39 - 42.
- 226 - LEVIN M.A., CABELLI V.J. and DUFOUR A.P. 1973.
"Quantification of fecal Streptococci in the marine environment"
Bact. Proc., 37.
- 227 - LEVIN M.A. and CABELLI V.J. 1972.
"Membrane filter technique for enumeration of Pseudomonas aeruginosa"
Appl. Microbiol., 24 : 864.
- 228 - RIPPEY S.R. and CABELLI V.J. 1979.
"Membrane filter procedure for enumeration of Aeromonas hydrophila"
Appl. Environ. Microbiol., 38 : 158.
- 229 - WATKINS W.D., THOMAS C.D. and CABELLI V.J. 1976.
"Membrane filter procedure for enumeration of Vibrio parahaemolyticus"
Appl. Environ. Microbiol., 32 : 679.
- 230 - DUFOUR A.P. and LUPO L.B. 1977.
"A membrane filter method for enumerating Klebsiella species"
Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. : 262.
- 231 - BISSON J.W. and CABELLI V.J. 1979.
"Membrane filter enumeration for Clostridium perfringens"
Appl. and Environ. Microbiol., 37 : 55.
- 232 - RESNICK G. and LEVIN M.A. 1971.
"Enumeration of Bifidobacterium in aquatic and fecal samples"
Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. : 261.