

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

METHODES MICROBIOLOGIQUES DE SURVEILLANCE DE LA QUALITE DES EAUX COTIERES

Deuxième rapport sur une réunion mixte OMS/PNUE

Athènes
25-29 juin 1984



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

Original : Anglais

ICP/CEH 001/m01
5696I

Note

Ce document ne constitue pas une publication.
Il ne doit faire l'objet d'aucun compte rendu ou
résumé ni d'aucune citation ou traduction sans
l'autorisation de l'Organisation mondiale de la
santé. Les opinions exprimées dans les articles
signés n'engagent que leurs auteurs.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Préface	1
1. Ouverture de la réunion	2
2. Portée et objectifs de la réunion	3
3. Election du bureau	3
4. Adoption de l'ordre du jour	3
5. Examen des précédents exercices d'interétalonnage et de l'interétalonnage réalisé en Grèce au plan national	4
6. Examen du projet de directives pour la surveillance des zones côtières à usage récréatif et pour l'élevage des crustacés et des mollusques	4
7. Examen des résultats de l'exercice d'interétalonnage	6
8. Action future et recommandations	6
9. Autres questions	7
Annexe 1 : Rapport sommaire de l'exercice grec d'interétalonnage, Athènes, mars 1984	8
Annexe 2 : Résultats du présent exercice d'interétalonnage	10
Annexe 3 : Liste des participants	28

PREFACE

Dans le cadre du programme à long terme de surveillance continue et de recherche sur la pollution de la mer Méditerranée (MED POL - Phase II), les programmes de surveillance de la plupart des pays méditerranéens sont devenus opérationnels, ou en train de prendre une forme officielle. Ces programmes prévoient une surveillance régulière, du point de vue microbiologique et connexe, de zones côtières à usage récréatif et destinées à l'élevage des crustacés et à la conchyliculture.

Quatre méthodes de référence, concernant les principaux organismes microbiologiques indicateurs pour la surveillance des eaux côtières à usage récréatif et des eaux destinées à l'élevage des crustacés et des mollusques ont été élaborées par le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) et l'OMS, afin de favoriser la normalisation de la méthodologie. Ces méthodes font partie de séries en cours de préparation par le Centre d'activités du programme du PNUE pour les mers régionales en collaboration avec les institutions spécialisées compétentes des Nations Unies. Elles sont conçues non seulement en vue de couvrir tous les paramètres de surveillance approuvés par les parties contractantes à la Convention sur la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et ses protocoles annexes portant adoption formelle du programme MED POL - Phase II, mais aussi pour permettre si possible leur utilisation ailleurs qu'en Méditerranée.

Les quatre méthodes de référence microbiologique élaborées conjointement par le PNUE et l'OMS sont les suivantes :

- détermination des coliformes totaux dans l'eau de mer par la méthode de culture par filtration sur membrane (TC);
- détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer en utilisant la même méthode (FC);
- détermination des streptocoques fécaux dans l'eau de mer, grâce à cette méthode (FS);
- détermination des coliformes fécaux dans les bivalves par la méthode du tube à essais multiples.

Ces quatre méthodes ont été mises au point et vérifiées pendant la première moitié de 1982, et elles ont été examinées lors d'une réunion de consultation mixte PNUE/OMS sur les méthodes de surveillance de certains polluants dans les effluents d'égouts et les eaux côtières à usage récréatif, qui s'est tenue à Rome du 24 au 26 novembre 1982. Au terme de cet examen, les méthodes ont reçu leur forme définitive en 1983. Au cours de la même année, l'OMS et le PNUE entreprenaient l'élaboration de méthodes de référence pour les trois premiers paramètres énumérés ci-dessus, au moyen de la méthode du tube à essais multiples. Ces méthodes devaient être prêtes pour examen et mise à l'épreuve à la fin de 1984.

La consultation de Rome a été combinée avec un exercice préliminaire d'interétalonnage, qui s'est tenu dans les mêmes locaux, du 22 au 26 novembre 1982, et au cours duquel des participants de certains laboratoires méditerranéens ont effectué des déterminations sur les trois paramètres microbiologiques (TC, FC et FS), et une série d'exercices d'interétalonnage a été planifiée dans plusieurs pays méditerranéens, dans l'intention d'y faire participer des scientifiques engagés dans le programme MED POL, ainsi qu'un certain nombre de chercheurs d'autres pays méditerranéens poursuivant les mêmes buts. L'objectif recherché était une meilleure comparabilité des résultats et du contrôle de qualité à la fois au niveau des pays et entre pays.

Le premier exercice de la série, qui a eu lieu à Barcelone du 7 au 11 novembre 1983, avait été précédé pendant l'été de 1983 d'un exercice d'expérimentation inter-laboratoires en Catalogne avec les mêmes méthodes. Le présent exercice, le deuxième de la série, a été organisé par l'OMS et le PNUE en collaboration avec le projet de lutte contre la pollution de l'environnement (Ministère de la planification physique, du logement et de l'environnement), à Athènes, du 25 au 29 juin 1984, et a été précédé lui-même par un exercice tenu à l'échelle nationale, dans la même institution, en mars 1984.

Le présent exercice avait pour principaux objectifs de permettre aux participants d'effectuer de véritables dosages en laboratoire concernant les paramètres bactériens, en utilisant les mêmes échantillons d'eau de mer et les méthodes de référence énumérées ci-dessus, et en pratiquant, à des fins de comparaison, des analyses parallèles au moyen de la méthode du tube à essais multiples.

La réunion de consultation, organisée conjointement avec l'exercice, avait les principaux objectifs suivants :

- examiner les résultats des exercices de laboratoire, présent et antérieurs;
- analyser les résultats de l'exercice national en mars 1984;
- étudier le projet de directives révisées pour la surveillance de la qualité des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques, élaboré conjointement par l'OMS et le PNUE pour faire partie de la série des méthodes de référence;
- formuler des recommandations sur les futurs exercices d'interétalonnage, de même que sur toute autre question connexe, soit en cours, soit planifiée dans le cadre de MED POL - Phase II.

On avait invité à prendre part à l'exercice et à la réunion de consultation des représentants des institutions décrites ci-après : a) institutions grecques participant aux aspects pertinents du programme de surveillance MED POL - Phase II, b) établissements à Chypre, en Egypte, en Israël, à Malte, en Turquie et en Yougoslavie et c) services participant au plan d'action régional pour l'Afrique occidentale. En outre, les organisations internationales ci-après ont été priées d'envoyer des représentants : l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la Commission océanographique internationale (COI), le Programme des Nations Unies pour le développement (PNUD), l'Organisation des Nations Unies pour la science, l'éducation et la culture (UNESCO), l'Organisation météorologique mondiale (OMM), ainsi que l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA).

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

La réunion s'est déroulée du 25 au 29 juin 1984 au siège du projet de lutte contre la pollution de l'environnement, à Athènes. Elle a été suivie par 26 conseillers temporaires venus de Grèce et de cinq autres pays méditerranéens. Le PNUE et le Bureau régional de l'Europe de l'Organisation mondiale de la santé y étaient représentés. On trouvera en Annexe 3 une liste des participants.

Le Dr L.J. Saliba, spécialiste scientifique principal du plan d'action pour la Méditerranée au Bureau régional de l'OMS pour l'Europe, a ouvert la réunion au nom du Dr Leo A. Kaprio, directeur régional. Ayant fait état de l'intérêt profond porté par l'OMS au plan d'action pour la Méditerranée, dans le cadre duquel la présente activité était organisée, il a ensuite fait remarquer combien il importe de veiller à la qualité des zones méditerranéennes à usage récréatif et destinées à l'élevage des crustacés et des mollusques. Une surveillance continue s'impose, et il faut que les résultats individuels soient comparables pour que l'on puisse dresser un tableau d'ensemble précis de la situation. L'orateur a en outre exprimé la gratitude de l'OMS pour le travail réalisé et les moyens mis à la disposition de l'exercice de laboratoire et de la consultation par le projet de lutte contre la pollution de l'environnement. Le Dr Saliba n'a pas manqué de souligner combien la présente réunion est opportune, puisque l'organisme d'accueil a inlassablement oeuvré tant en faveur des aspects liés à la santé de MED POL - Phase I qu'à un projet de grande envergure exécuté par l'OMS.

M. A. Manos, coordonnateur du plan d'action pour la Méditerranée au Programme des Nations Unies pour l'environnement, a prononcé une allocution au nom du Dr Mostafa K. Tolba, directeur exécutif du PNUE. Il a rappelé l'engagement pris par les Etats riverains de protéger et de développer le bassin méditerranéen, ainsi que leur obligation, en vertu de la Convention de Barcelone de 1976, de chercher à établir un système de surveillance de la pollution pour cette zone. Le PNUE, en collaboration étroite avec les institutions spécialisées intéressées du système des Nations Unies, a mis au point une importante composante scientifique (MED POL), qui s'efforce de déterminer les sources et les effets des principaux polluants. En agissant de la sorte, il faut perfectionner et harmoniser les instruments et les méthodes scientifiques, afin que les gouvernements et le public puissent obtenir des renseignements comparatifs fiables sur le degré de pollution de la Méditerranée. L'exercice d'interétalonnage en cours de réalisation à Athènes, ainsi que les autres dans la même série, constitueront des étapes essentielles vers la réalisation de cet important objectif.

Le Dr G. Kardassis, directeur de l'environnement au Ministère grec de la planification physique, du logement et de l'environnement, a accueilli les participants au nom du ministre, M. A. Tritsis, qui leur souhaitait des travaux couronnés de succès. La Grèce, dont le rôle historique dans le développement de la civilisation du bassin méditerranéen a été exceptionnel, attache une très grande importance à toutes les activités mettant l'accent sur la protection de l'environnement de ce bassin. La surveillance de la qualité des eaux côtières est essentielle pour assurer la sécurité des eaux, pour les baignades et pour d'autres activités. Connaître les limites des ressources naturelles est une condition préalable à leur exploitation dans un souci de protection de l'environnement. Un tableau précis et complet de l'écosystème en cause devrait être

à la base de toute activité. La consultation contribuera beaucoup à établir un tel tableau pour les eaux côtières de la Méditerranée.

Le Dr G. Manes, responsable de la santé publique, s'est adressé aux participants pour le compte du Ministère grec de la santé et du bien-être, et plus particulièrement au nom du Dr Th. Stephanou, directeur de la santé publique. Il a évoqué les agents de pollution des mers, surtout du point de vue de la médecine et de l'épidémiologie, en insistant sur la menace croissante pour la santé publique du fait de l'exposition des baigneurs à l'eau de mer polluée, et par suite de la consommation par le public de crustacés et de mollusques pêchés dans des zones contaminées. L'orateur a aussi souligné combien il importe de soumettre les eaux usées à un traitement secondaire et à la chloration, afin de réduire sensiblement leur teneur en bactéries et virus pathogènes. Le Dr Manes a dit l'importance, pour toutes les autorités nationales intéressées à quelque titre que ce soit, d'œuvrer en pleine coordination et coopération sous l'autorité d'une législation uniforme. En situation idéale, on en viendrait à adopter une législation internationale commune à tous les pays de la Région. Le Ministère grec de la santé et du bien-être a souhaité la réussite complète de la réunion.

Le Dr Athena Mourmouris, coordonnatrice nationale grecque de MED POL, a exprimé avec quelle satisfaction le Ministère de la planification physique, du logement et de l'environnement accueille le présent exercice dans le cadre de sa collaboration constante avec l'OMS et le PNUE. Cet exercice apparaît comme une excellente occasion d'échange d'expérience et de coopération scientifique dans des domaines concrets d'intérêt général concernant l'environnement. D'ailleurs il est indispensable de procéder de la sorte pour obtenir des résultats comparables. Le Dr Mourmouris a fait remarquer que la Grèce a amplement démontré son intérêt dynamique pour MED POL, en participant à la première phase comme à la seconde. Lors de l'exercice national d'interétalonnage, organisé à Athènes du 12 au 16 mars 1984, on avait utilisé à la fois les méthodes de la filtration sur membrane (MF) et du nombre le plus probable (MPN). Dans le présent exercice, à part les trois méthodes MF recommandées jusqu'ici par les parties contractantes, l'organisme d'accueil a également prévu des dosages parallèles au moyen de la technique MPN, pour laquelle l'OMS/PNUE n'ont pas mis au point les méthodes de référence. Il en a été ainsi décidé car plusieurs organismes méditerranéens ont utilisé ce dernier procédé pendant plusieurs années, et les recommandations actuelles des parties contractantes n'excluent pas d'autres méthodes, à condition que les résultats soient comparables. Le présent exercice aiderait donc à établir la comparabilité des méthodes aussi bien que celle des résultats individuels.

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

Le Dr L.J. Saliba, exposant la portée et les objectifs de l'exercice et de la réunion de consultation, a décrit la situation que les exercices d'interétalonnage de Rome et de Barcelone ont fait ressortir, à savoir un écart considérable entre les résultats individuels. Il a souligné que les participants devraient observer la méthodologie prescrite au cours des séances de laboratoire, afin d'assurer une harmonisation aussi complète que possible du point de vue technique. Malgré tous les efforts dans ce sens au cours de précédents exercices, les éléments humains sont apparus importants, aussi faut-il analyser les raisons de ces disparités et les moyens d'y porter remède. Il ressort de ses explications sur l'organisation générale de l'activité dans son ensemble et, notamment, sur les relations entre les séances de laboratoire et en réunion, que l'expérience a montré jusqu'ici que les contacts entre scientifiques de différents laboratoires sortent considérablement renforcés de leur travail en commun, sans préjudice des discussions en réunion.

Les résultats du présent exercice devront être scrupuleusement examinés. D'ailleurs, l'ordre du jour porte essentiellement sur deux points, à savoir les résultats de l'exercice national grec d'interétalonnage en mars 1984, et la méthode de référence No 1 (Directives pour la surveillance de la qualité des zones côtières à usage récréatif et destinées à l'élevage des crustacés et des mollusques), entièrement remaniée depuis sa présentation initiale sous forme de projet en novembre 1982. Ce document, qui allait être étudié à la présente réunion, sera également soumis à plusieurs organismes méditerranéens pour leur permettre de faire connaître leurs observations. Les révisions décidées à la présente réunion ne seront donc pas considérées comme définitives.

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

Mme S. Sotiracopoulos a été portée à la présidence, le Dr Yonna Yoshpe-Purer à la vice-présidence, et le Dr Nada Krstulovic a été choisie comme rapporteur. Le Dr L.J. Saliba a rempli les fonctions de secrétaire de la réunion.

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

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

5. Examen des précédents exercices d'interétalonnage (Rome, 22-26 novembre 1982, Barcelone, 7-11 novembre 1983) et de l'interétalonnage réalisé en Grèce au plan national (12-16 mars 1984) (points 5 et 6 de l'ordre du jour)

A la suite d'une décision unanime, ces deux points ont été examinés ensemble.

Le Dr L.J. Saliba a brièvement décrit les exercices d'interétalonnage organisés à Rome (22-26 novembre 1982) et à Barcelone (7-11 novembre 1983). Le premier, qui n'était qu'un exercice préparatoire réunissant 12 participants, a été organisé surtout pour acquérir de l'expérience. A Barcelone, 28 participants (dont 22 venus d'Espagne) étaient présents au premier exercice de la série actuelle. Bien que tous aient appliqué des méthodes identiques, on a relevé de nombreuses variations entre les résultats individuels. La cause en a été partiellement imputée aux sérieuses inondations qui ont eu lieu à l'époque où les échantillons ont été recueillis. L'exercice a servi cependant à mettre en relief l'importance de l'élément humain.

Mme S. Sotiracopoulos a exposé brièvement les résultats de l'exercice national grec d'interétalonnage, organisé à Athènes du 12 au 16 mars 1984 (document ICP/CEH 001 m01/7). Les représentants de six organismes y ont participé, et l'on a également comparé les méthodes MF et MPN. Les échantillons étaient composés comme suit : eau de mer de bonne qualité, eau de mer modérément polluée, provenant d'une zone à pollution intermittente, eau de mer provenant d'une zone polluée et crustacés et mollusques recueillis dans une zone restreinte. L'exercice a permis de conclure que même si les méthodes MF et MPN pour le dénombrement de TC, FC et FS ne donnent pas toujours exactement les mêmes résultats, il est raisonnable de supposer que les deux méthodes sont satisfaisantes pour établir la qualité de l'eau de mer, et qu'il convient donc de recommander l'usage de l'une et de l'autre dans le programme MED POL, compte tenu toutefois de leurs limitations. On trouvera en Annexe 1 le rapport sommaire de l'exercice.

6. Examen du projet de directives pour la surveillance des zones côtières à usage récréatif et pour l'élevage des crustacés et des mollusques (point 7 de l'ordre du jour)

Le Dr L.J. Saliba a donné un bref aperçu du document ICP/CEH 001 m01/6. La version actuelle a été établie sur la base des observations et des suggestions formulées lors de la réunion de consultation qui s'est tenue à Rome en novembre 1982.

Si les participants à la réunion n'avaient pas d'observations à formuler sur la présentation générale du document, ils ont toutefois fait un certain nombre de commentaires et de suggestions sur des points précis.

Définitions : les participants ont noté que les normes applicables aux indicateurs bactériens potentiels correspondent à ce qui avait été précédemment recommandé dans le rapport du groupe d'experts réuni conjointement par l'OMS et le PNUE sur les critères de santé et les études épidémiologiques liées à la pollution des eaux côtières (Athènes, 1er-4 mars 1977). Ils ont cependant estimé qu'il convient de les mettre à jour, de préférence après s'être référé à un texte officiel. Les participants ont estimé notamment que les indicateurs potentiels devraient présenter les caractéristiques suivantes :

a) être liés de façon continue et exclusive à la source d'agents pathogènes, et occasionnellement à des substances nocives;

b) être présents en nombre suffisant sans qu'il y ait prolifération, pour permettre une estimation raisonnable de la présence possible de pathogènes susceptibles d'entraîner un risque pour la santé.

Il a été décidé également que le principal élément dont il faut tenir compte en définissant une norme de protection de la qualité de l'eau pour déterminer son acceptabilité est le facteur médical. La définition devrait être modifiée en conséquence.

Identification des zones et des problèmes : les participants sont convenus que sur les fiches de renseignements et les cartes décrivant les zones de surveillance et les stations d'échantillonnage, seuls les points effectivement intéressants devraient faire l'objet de mentions obligatoires.

Echantillonnage (généralités) : plusieurs participants ont jugé préférable d'examiner de nombreux échantillons selon quelques paramètres importants plutôt que d'analyser des échantillons moins nombreux en fonction de paramètres en nombre supérieur. On a souligné la nécessité d'un échantillonnage systématique, et de l'avis des participants, il conviendrait de ne pas soumettre l'heure de l'échantillonnage, dans la même station, à des variations dépassant deux à trois heures. L'heure optimale d'échantillonnage est fonction de plusieurs facteurs, et deux méthodes

permettent de la déterminer : a) la coïncidence avec l'utilisation de pointe et b) la corrélation avec les débits intermittents, comme ceux des émissaires d'égouts. Le choix de l'heure du prélèvement serait alors fonction de la méthode particulière adoptée, compte tenu des renseignements recherchés. S'il est admis que la normalisation de toutes les stations d'échantillonnage ne serait pas possible en pratique, on ne devrait cependant épargner aucun effort pour atteindre l'optimum. Les participants ont souligné l'importance d'une liaison et d'une coordination aussi étroites que possible entre le personnel chargé de l'échantillonnage et le laboratoire procédant aux dosages (surtout lorsque différentes organisations sont en cause).

Situation des points d'échantillonnage : les participants ont estimé que la situation exacte des points d'échantillonnage, y compris la distance entre eux, ne saurait être précisée dans l'absolu, car elle varie selon les plages et que les autorités locales devraient déterminer les normes spécifiques de chacune d'elles. Quand à la situation par rapport à la ligne côtière, le critère devrait être la profondeur plutôt que la distance à partir du rivage. La partie critique est celle qui est située à proximité immédiate du rivage, et les secteurs où l'eau atteint une profondeur de 20 à 30 cm devraient faire l'objet d'une surveillance continue.

Fréquence de l'échantillonnage : les participants ont jugé que pendant la saison des baignades, les plages très fréquentées devraient être surveillées au moins une fois par semaine. On a noté qu'il n'existe aucune définition généralement acceptée de ce qui, en termes quantitatifs, représente une plage surpeuplée ou très fréquentée. C'est aux autorités locales qu'il appartiendrait de le déterminer dans chaque cas individuel.

Surveillance minimale : parmi les paramètres océanographiques et météorologiques, seuls ceux qui sont absolument nécessaires devraient être obligatoires. Il est apparu à cet égard que la direction du vent et du courant aux heures d'échantillonnage est particulièrement importante et devait être enregistrée. Etant donné que l'infection par contact peut revêtir une importance plus grande que l'infection intestinale par ingestion, la surveillance d'un agent pathogène provoquant une infection par contact (dont le choix serait fonction des circonstances locales) serait souhaitable.

Surveillance des plages : les participants ont estimé que la plupart des organisations de surveillance ne disposent pas des effectifs nécessaires pour réaliser toutes les observations prévues dans la classification de Garber et que, dans tout programme de surveillance, seules les plus importantes devraient être obligatoires.

Surveillance élargie : on a recommandé que l'échantillonnage fasse une place à l'examen microbien du sable des plages et des sédiments. Dans ce dernier cas, une définition stricte s'impose. On pourrait considérer comme sédiments les matériaux constituant le fond de la mer directement sous-jacent à la zone d'échantillonnage, et il conviendrait de recommander un échantillonneur convenable capable de recueillir la couche supérieure de sédiments. Il faudrait pratiquer, sur les plages à usage récréatif, un double échantillonnage en deux profondeurs déterminées, celle qui est fréquentée surtout par les adultes et l'autre, par les jeunes enfants et les personnes âgées (ces deux derniers groupes étant les plus vulnérables à l'infection).

La plupart des participants sont convenus que la liste des agents pathogènes figurant dans cette section du document devrait subsister dans l'ensemble. Ils ont toutefois formulé les suggestions suivantes :

- inclure Aeromonas hydrophila parmi les paramètres;
- les champignons sont très importants en tant qu'agents générateurs de maladies par contact, aussi faut-il s'intéresser tout particulièrement aux espèces pathogènes;
- envisager l'inclusion de Campylobacter, pour lequel, toutefois, des études de base approfondies sont encore nécessaires;
- rien ne justifie le maintien de Shigella sur la liste des paramètres, même pour la surveillance élargie.

Les participants ont noté les paramètres obligatoires et facultatifs adoptés par les gouvernements méditerranéens pour la composante "surveillance" de MED POL - Phase II, et reconnu que les agents pathogènes et les indicateurs qu'il convient effectivement de déterminer devraient varier selon les pays, ainsi d'ailleurs que la priorité revenant à chacun. Les observations suivantes ont également été formulées :

- on rencontre invariablement Vibrio parahaemolyticus dans les zones non polluées par les eaux usées, ce qui exclut toute corrélation. Plusieurs participants ont cependant jugé qu'il faudrait le maintenir;
- Clostridium perfringens pourrait donner une indication de la présence de virus. On pourrait le maintenir, mais avec des réserves quant à son utilité, étant donné que : a) il n'est pas véritablement pathogène et b) son dépistage dans l'eau de mer est difficile;
- quant aux parasites, il est au moins aussi important d'étudier Giardia lamblia qu'Entamoeba;
- un certain nombre de participants ont estimé qu'il faut accorder aux salmonelles une priorité élevée; même dans les programmes minimums de surveillance, il faudrait procéder à des analyses pour déceler la présence éventuelle de salmonelles, si l'on détermine dans un échantillon plus de 500 coliformes fécaux par 100 ml. De même, certains participants ont estimé que les vibrions sont proches des salmonelles du point de vue de leur importance générale, sans qu'on puisse, toutefois, fixer un ordre général de priorité;
- on pourrait peut-être établir une différence entre a) les agents pathogènes d'origine fécale, b) les pathogènes d'origine non fécale et c) les parasites. Il a été reconnu à cet égard que certains pathogènes se situeraient entre les deux premières catégories;
- les deux plus importants pathogènes à doser dans les bivalves, par opposition à l'eau de mer, sont Vibrio parahaemolyticus et les salmonelles.

Les participants n'ont pas examiné la section relative à l'analyse statistique. On a décidé de renvoyer tout commentaire sur cette partie du document jusqu'au moment où le projet sera diffusé dans les institutions du bassin méditerranéen.

7. Examen des résultats de l'exercice d'interétalonnage (point 8 de l'ordre du jour)

Les participants, ayant débattu des résultats de l'exercice d'interétalonnage, ont jugé qu'il y a lieu de le considérer comme un succès. Tous les résultats obtenus ont été de très bonne qualité, et la corrélation entre les résultats de chaque participant, ainsi qu'entre ceux-ci et les déterminations parallèles faites par les coordonnateurs de l'exercice, a été tout à fait significative. En outre, la corrélation a été bonne entre les résultats obtenus à la fois pour les coli-formes fécaux et les streptocoques fécaux par les méthodes MF et MPN, cette corrélation ayant été obtenue avec des échantillons d'eau de mer polluée et propre.

Bien que l'on ait jugé les résultats de nature à éviter la nécessité pratique d'une analyse statistique, une telle opération a cependant été réalisée. On s'est toutefois heurté à des problèmes pratiques en raison du nombre relativement faible d'échantillons. Le but essentiel de la série d'exercices d'interétalonnage était d'obtenir des résultats comparables grâce à l'harmonisation des méthodologies; les participants ont cependant décidé que pour les exercices ultérieurs, on pourrait envisager de planifier le programme de travail effectif avec un statisticien, et notamment de déterminer le nombre minimum d'échantillons nécessaires pour répondre aux impératifs en matière de statistique.

On trouvera en Annexe 2 les résultats détaillés de l'exercice d'interétalonnage et les conclusions qui en ont été tirées, ainsi que les instructions et les imprimés fournis aux participants.

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

Outre les observations qu'ils ont formulées au sujet du nombre minimum d'échantillons à analyser pour convenir aux nécessités statistiques normales, les participants ont envisagé aussi de prolonger d'une journée au moins, et davantage si possible, la durée actuelle (cinq jours) des exercices d'interétalonnage. Cela permettrait de mieux respecter les intervalles réglementaires entre le commencement de la période d'incubation et la lecture des résultats, et accorderait en outre le temps voulu pour procéder à une analyse statistique, suivie d'une discussion approfondie des résultats obtenus.

Les participants ont formulé encore les recommandations ci-après :

- il conviendrait de poursuivre la série d'exercices d'interétalonnage concernant les paramètres microbiologiques, dans le cadre de la composante de surveillance de MED POL - Phase II, et de l'étendre à de nouveaux paramètres, notamment des agents pathogènes;

- du fait que de nombreux laboratoires méditerranéens utilisent la méthode du tube à essais multiples (MPN), et compte tenu également de la corrélation observée entre cette méthode et la méthode de la culture par filtration sur membrane (MF), il conviendrait de mettre au point, de façon définitive et dans les meilleurs délais, les méthodes de référence qui utilisent la première de ces techniques et qui sont actuellement en cours d'élaboration par l'OMS et le PNUE;
- les scientifiques méditerranéens devraient participer autant que faire se peut à la composante de recherche de MED POL - Phase II, surtout dans les domaines conduisant à moderniser les opérations de surveillance microbiologique et connexe.

9. Autres questions (point 10 de l'ordre du jour)

Au vu des résultats de l'exercice d'interétalonnage, le groupe a débattu des divers avantages et limitations des méthodes de culture par filtration sur membrane (MF) et du tube à essais multiples (MPN), respectivement. Les participants ont souligné en particulier qu'à l'expérience, la méthode MF ne donne pas de résultats précis lorsqu'on examine des eaux très polluées contenant une forte densité de particules en suspension, ou des eaux très fortement eutrophisées. Il est également apparu que les deux méthodes avaient été élaborées à l'origine pour l'analyse de l'eau de boisson, et que leur application à l'eau de mer soulève plusieurs problèmes techniques. A cet égard, le type et la qualité des milieux utilisés ont leur importance, et plusieurs participants ont estimé qu'il convient d'inclure parmi les méthodes de référence le contrôle de qualité des milieux, fondé sur l'utilisation des mêmes micro-organismes.

On a décidé que dans la méthode de référence No 3 (détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer par culture par filtration sur membrane), il faut ajouter le milieu EC au bouillon de McConkey et au Vert brillant à 44,5°C dans les analyses réalisées pour vérification.

La plupart des participants ont estimé en outre que puisque les méthodes MF et MPN seront utilisées et interchangeables dans le cadre du programme de surveillance MED POL, elles devraient être fondées sur un principe d'identification identique, du point de vue du choix des organismes indicateurs, à savoir les coliformes fécaux. L'aptitude à utiliser le lactose et à procéder à la culture à 44,5°C devrait être le seul processus métabolique microbien sur lequel on pourrait fonder l'identification, puisqu'aussi bien, il existe dans l'une et l'autre méthodes. Comme la liste relative à la production d'indole n'est pas comprise dans la surveillance ordinaire par la méthode MF, il faudrait l'omettre de la procédure MPN, afin d'éliminer un élément susceptible d'accroître les différences existant entre les résultats obtenus par les deux méthodes. La phrase relative à la production de l'indole dans l'eau additionnée de tryptone contenant du tryptophane à 44,5°C, figurant dans la méthode de référence No 3, devrait être supprimée dans la définition.

Annexe 1

RAPPORT SOMMAIRE DE L'EXERCICE GREC D'INTERETALONNAGE
Athènes, 12-16 mars 1984

L'activité s'est déroulée du 12 au 16 mars 1984, au Ministère de la planification physique, du logement et de l'environnement/Projet de lutte contre la pollution de l'environnement - Athènes (PERPA). Elle a été suivie par 12 scientifiques de six organismes d'Athènes, de Thessalonique et de Ioánnina.

L'activité avait pour but de permettre aux participants d'effectuer des dosages en laboratoire concernant des paramètres bactériens. On a utilisé les mêmes échantillons d'eau de mer, de crustacés et de mollusques, et appliqué les mêmes méthodes.

La surveillance de la qualité des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage des crustacés et des mollusques s'insère dans le programme de surveillance MED POL grec (Phase II), déjà soumis à l'Unité de coordination du plan d'action pour la Méditerranée.

On a préparé plusieurs méthodes de référence pour l'échantillonnage et l'analyse des trois organismes indicateurs bactériens (coliformes totaux, coliformes fécaux, streptocoques fécaux), à l'usage des parties contractantes méditerranéennes de la Convention de Barcelone, au cours d'une réunion extraordinaire tenue en avril 1984.

Au cours des séances en laboratoire, les participants ont effectué des dosages sur les trois organismes bactériens (coliformes totaux, coliformes fécaux, streptocoques fécaux), dans trois différents échantillons d'eau de mer (eau de mer de très bonne qualité, modérément polluée et polluée), et sur les coliformes fécaux dans des échantillons de crustacés et de mollusques.

On a suivi, pour l'analyse microbiologique des crustacés et des mollusques, la méthode du nombre le plus probable (MPN), puisque c'est la seule qui puisse être appliquée (Méthode de référence OMS/PNUE, Marine Pollution Studies, No 5, Rev. 1).

Pour les échantillons d'eau de mer, on a adopté aussi bien la méthode du nombre le plus probable que la filtration sur membrane. En ce qui concerne cette dernière, les participants ont utilisé les méthodes de référence OMS/PNUE, Etudes sur la pollution des mers, No 2, Rév. 1 (coliformes totaux), No 3, Rév. 1 (coliformes fécaux) et No 4, Rév. 1 (streptocoques fécaux). S'agissant de la méthode du nombre le plus probable, on a utilisé différents milieux à des fins de comparaison réciproque.

- On a constaté qu'en utilisant des échantillons identiques et des méthodes normalisées, les résultats ne présentaient pas de différences statistiques importantes.
- Il faut noter que les deux méthodes MPN et MF peuvent être utilisées pour l'analyse de l'eau de mer, mais chacune présente divers avantages, inconvénients et limitations. En conséquence, l'emploi ou l'acceptation généralisés des deux méthodes ne paraissent pas appropriés pour toutes les qualités d'eau de mer. Ainsi, on ne saurait examiner par la méthode MF les eaux de mer très fortement polluées contenant une forte densité de particules en suspension ou fortement eutrophisées (algues); la même constatation s'applique à la méthode MPN pour l'eau de mer contenant des substances toxiques provenant d'effluents industriels.

Au cours des réunions, les participants ont examiné les progrès et les résultats de cet exercice de laboratoire, ainsi que plusieurs points techniques. Les résultats de l'exercice d'inter-étalonnage organisé à Rome en 1982 ont été également pris en compte.

Recommandations

Les participants sont convenus des points ci-après et ont formulé les recommandations suivantes :

- pour assurer la comparabilité des résultats et la surveillance de la qualité, les exercices d'interétalonnage MED POL devraient être effectués à intervalles réguliers, en particulier si l'on retient de nouveaux paramètres ou s'il est proposé d'utiliser de nouvelles méthodes;

- les méthodes de référence pour le nombre le plus probable (coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux dans l'eau de mer) devraient être mises au point par l'OMS/PNUE, révisées par les scientifiques méditerranéens et adoptées dès que possible pour être appliquées;
- les scientifiques devraient être encouragés à participer à la composante de recherche de MED POL - Phase II.

Annexe 2

RESULTATS DE L'EXERCICE D'INTERETALONNAGE Athènes, 25-29 juin 1984

Introduction

Cette activité avait pour but de permettre aux participants d'effectuer des dosages microbiens dans les mêmes échantillons d'eau de mer, par des méthodes uniformes, et de comparer les résultats obtenus a) entre participants individuels pour chaque paramètre (coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux), et b) entre les deux méthodes (filtration sur membrane et méthode du tube à essais multiples) utilisées pour les deux derniers paramètres.

Organisation et méthodologie

Les participants ont été répartis en cinq groupes de trois. Chaque groupe a analysé deux échantillons d'eau de mer : l'échantillon A, provenant d'une plage naturellement contaminée, et l'échantillon B, d'une plage propre. Les récipients originaux contenant les échantillons, d'une capacité de 10 litres chacun, ont été vigoureusement agités, et des aliquotes d'environ 300 ml d'eau ont été versées dans chacune des cinq bouteilles qui ont servi de spécimens d'analyse pour les groupes de participants.

Chaque échantillon a été examiné pour déceler les coliformes totaux (TC) par la méthode du tube à essais multiples (MPN), et les coliformes fécaux (FC) ainsi que les streptocoques fécaux (FS), à la fois par la méthode MPN et la méthode de la culture par filtration sur membrane (MF).

Dans les cas de MF, on a suivi les méthodes de référence recommandées par l'OMS/PNUE. Toutefois, pour économiser du temps et du travail (compte tenu de la durée restreinte de l'exercice), ainsi que pour parvenir à une meilleure uniformité, on a préparé les dilutions de chaque échantillon en quantités assez importantes pour suffire à toutes les inoculations et filtrations (45 ml de tampon phosphaté plus 5 ml d'eau prélevée dans l'échantillon, etc.).

L'inoculation et la filtration ont été effectuées en groupe. Chaque membre du groupe a toutefois lu les résultats, de même que le coordonnateur de l'exercice. Lorsque le dénombrement d'une colonie sur les filtres, obtenu par l'un quelconque des participants individuels, variait de plus de deux à trois colonies par rapport à celui du coordonnateur, les numérations étaient répétées en commun, afin de découvrir la source de la variation. Tous les comptages étaient réalisés à la loupe et, le cas échéant, vérifiés au microscope stéréoscopique à zoom.

Dans le cas du nombre le plus probable, on a suivi le protocole décrit dans les "Méthodes courantes d'analyse de l'eau et des effluents liquides", 15^{ème} édition, 1980 (APHA-AWWA-WPCF). Toutefois, les analyses de contrôle ont dû être limitées à 24 heures (au lieu de 48) pour permettre la collecte des données définitives un jour avant la fin de la réunion, afin qu'elles puissent être analysées comme il convient avant discussion approfondie au cours de la séance de clôture.

Pendant tout l'exercice, on a contrôlé, dans la plus grande mesure possible, la procédure et les résultats de chaque participant individuel à chaque stade, afin de noter où pouvaient s'être produits des erreurs et des écarts susceptibles d'entraîner, dans les résultats, des variations supérieures à celles qui sont inhérentes aux méthodes en soi. On s'est également efforcé de discuter de chaque observation ou erreur faite par chacun des participants individuels, afin de permettre à tous de tirer de l'exercice le maximum de profit.

On trouvera en Appendice 1 les instructions détaillées fournies aux participants, ainsi que les imprimés préparés pour chaque paramètre. Ces instructions ont dû être modifiées dans la mesure où :

- les trois échantillons d'eau de mer prévus à l'origine ont dû être ramenés à deux (échantillons No 1 et 3);
- l'analyse d'eaux usées brutes et de chair de crustacés et de mollusques n'a pu être effectuée.

Les modifications ci-dessus ont été imposées par le manque de temps (c'est-à-dire la durée limitée de l'exercice).

Résultats et discussion

Les observations individuelles sur les filtres à membrane, ainsi que les calculs des densités d'organismes fondés sur elles sont reproduits aux tableaux 1 et 2 pour les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux, respectivement. Ces tableaux montrent que les dénombrements individuels de colonies au sein de chaque groupe présentaient à la fois entre eux et avec les chiffres obtenus par le coordonnateur une très grande cohérence. Un accord également bon existait entre les chiffres obtenus par différents groupes, d'où il résulte que les dilutions ont été correctement effectuées.

Le tableau 3 indique les nombres d'organismes surveillés dans chaque échantillon par les cinq groupes.

Echantillon A : quatre groupes ont évalué le nombre le plus probable (MPN) de TC entre $1,7 \times 10^4$ et $3,5 \times 10^4$ pour 100 ml d'eau, et celui des FC à environ $1,7 \times 10^4$ et $2,4 \times 10^4$ pour 100 ml d'eau. Un groupe a évalué les TC et les FC à $1,6 \times 10^5$ pour 100 ml. Cela est probablement dû à la présence dans un échantillon d'un agglomérat de bactéries disloqué par l'agitation supplémentaire du spécimen avant et pendant dilution. Comme les essais de contrôle pour les deux organismes sont inoculés à partir des mêmes tubes que le test présomptif sur un bouillon de lactose, et que les organismes sont habituellement identiques, on peut estimer que le résultat est raisonnable.

Avec la méthode MF, toutefois, les chiffres observés variaient, pour les cinq groupes, entre $2,1 \times 10^4$ et $3,6 \times 10^4$ de FC pour 100 ml d'eau, lorsqu'on calculait la moyenne des nombres de colonies sur des filtres de 1 ml et de 0,1 ml, et $3,5 \times 10^4$ à $4,2 \times 10^4$ de FC pour 100 ml d'eau, si l'on envisageait uniquement d'utiliser des filtres de 0,1 ml (ce qui donnait 30 à 50 colonies par filtre).

Les cinq groupes ont évalué un nombre de FS se situant entre $1,1 \times 10^4$ et $3,5 \times 10^4$ pour 100 ml d'eau, en utilisant la procédure MPN, et $2,2 \times 10^4$ à $2,9 \times 10^4$ pour 100 ml par la méthode MF (résultats avec des filtres de 0,1 ml).

Echantillon B : tous les résultats obtenus permettaient de conclure à la propreté de l'eau. La plupart d'entre eux ont mis en évidence moins de 10 organismes de chaque groupe dans 100 ml d'eau. Le nombre effectif de FS est probablement inférieur à celui du tableau 3 obtenu par la méthode MF, puisque quatre résultats sur les cinq étaient fondés sur la présence de 1 à 5 colonies sur filtres de 10 ml.

Conclusions

On peut estimer dans l'ensemble qu'en tenant compte de toutes les variations et causes de déviation inhérentes à chacune des méthodes, la concordance entre les résultats des groupes individuels et entre ceux qui ont été déterminés pour les deux méthodes (MF et MPN), respectivement, a été très satisfaisante.

Lectures individuelles pour les colonies de FC placées sur gélose-m-FC, incubées à 44,5°C + 0,2 pendant 24 heures, et nombre de FC pour 100 ml d'eau de mer déterminé en conséquence

Echantillon A - eau polluée

Quantité d'eau filtrée	Groupe I			Moyenne du groupe		y*	Groupe II		Moyenne du gr.	Groupe III		Groupe IV			Moyenne du gr.	y*	Groupe V
	>300	>300	>300	>300	>300		>300	>300		>300	>300	>300	>300	>300			
10 ml	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
(1 ml)	105	105	108	106	112	95	94	95	290	280	128	114	121	134	70		
(0,1 ml)	110	107	110	109	131	89	86	87	ND	-	139	125	132	132	83		
(0,01 ml)	35	32	31	32	38	39	38	38	42	50	35	35	35	33	37		
(0,01 ml)	36	36	36	37	38	39	38	39	ND	-	43	43	43	43	33		
(0,01 ml)	6	6	6	6	6	3	3	3	6	7	8	11	10	9	4		
(0,01 ml)	2	2	2	2	3	4	4	4	ND	-	4	4	4	3	5		
a FSx104 /100 ml	2,3	2,2	2,2	2,2	2,5	2,4	2,4	2,4	3,6	3,9	2,1	2,1	2,1	2,5	2,1		
b i ;	3,7	3,4	3,4	3,5	3,8	3,9	3,9	3,9	4,2	5,0	3,9	3,9	3,9	3,8	3,5		

a - Fondé sur la moyenne des lectures sur filtres de 1 ml et 0,1 ml

b - Fondé sur des lectures sur filtres de 0,1 ml seulement. C'est le résultat le plus correct, puisqu'il est fondé sur des filtres portant chacun de 20 à 80 colonies

Echantillon B - eau propre

Groupes I-IV : filtré 10 ml, 1 ml, 0,1 ml - aucune colonie n'a été observée, le résultat est donc <10 FC/100 ml.

Groupe V : filtré également 100 ml, observé 2 colonies sur un filtre et 1 sur l'autre = 2/100 ml.

$\underline{y}^*$: lectures du coordonnateur

Tableau 2

Chiffres individuels de colonies de FS sur les filtres
à membrane placés sur gélose KF, incubées à $36^{\circ} \pm 1$ pendant 48 heures,
et nombre de FS pour 100 ml d'eau de mer déterminé en conséquence

Echantillon A - eau polluée

Quantité d'eau filtrée	Groupe I			Groupe II			Groupe III			Groupe IV			Groupe V		
	Moyen. du gr.	y*		Moyen. du gr.	y*		Moyen. du gr.	y*		Moyen. du gr.	y*		Moyen. du gr.	y*	
10 ml	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
(1 ml)	189	189	186	192	201	196	286	228	217	192	208	200	205	-	-
(0,1 ml)	162	158	159	149	160	154	ND	ND	-	170	173	172	171	173	186
(0,01 ml)	24	23	23	19	19	19	21	22	22	36	36	36	37	29	30
(0,001 ml)	25	24	24	37	39	38	ND	ND	-	23	23	23	22	23	26
(0,0001 ml)	6	6	6	3	3	3	2	2	2	1	1	1	1	2	2
(0,00001 ml)	1	1	1	4	4	4	ND	ND	-	1	1	1	1	5	5
^a	2,1	2,0	2,0	2,3	2,4	2,3	2,1	2,2	2,2	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,5
FSx10 ⁴	2,5	2,4	2,4	2,8	2,9	2,8	2,1	2,2	2,2	2,9	2,9	2,9	2,9	2,7	2,8
/100 ml b															

a - Fondé sur la moyenne des lectures sur filtres de 1 ml et 0,1 ml

b - Fondé sur des lectures sur filtres de 0,1 ml seulement. C'est le résultat le plus correct, puisqu'il est fondé sur des filtres portant chacun de 20 à 80 colonies

N.B. : Le Groupe III a procédé à une vérification pour déterminer si le rinçage entre analyses de plusieurs échantillons est satisfaisant. A cette fin, des filtres stériles ont été introduits après les dernières filtrations opérées sur les dilutions les plus faibles. Après avoir filtré 10 ml de tampon stérile à travers ces filtres, ils ont été placés sur des milieux mFC et KF, et ont les a fait incuber avec les autres. Aucune colonie n'a proliféré sur ces filtres.

Echantillon B - eau propre

Très peu de colonies ont proliféré sur les filtres de 10 ml; les résultats sont présentés au tableau 3.

Tableau 3

Récapitulation des résultats obtenus par les cinq groupes qui ont participé à l'exercice d'interétalonnage, Athènes (25-29 juin 1984)

Chaque groupe a observé deux échantillons d'eau (aliquotes des mêmes fractions d'échantillons globaux) :

A - eau polluée, B - eau propre. Les TC n'ont été surveillés que par la méthode MPN, les FC et FS par les méthodes MPN et MF.

		<u>Groupe I</u>	<u>Groupe II</u>	<u>Groupe III</u>	<u>Groupe IV</u>	<u>Groupe V</u>
TC/100 ml	A	3,5X10 ⁴	2,8X10 ⁴	1,7X10 ⁴	1,6X10 ⁵	2,4X10 ⁴
	MPN B	8	<2	2	9	2
FC/100 ml	MPN A	2,4X10 ⁴	1,7X10 ⁴	1,7X10 ⁴	1,6X10 ⁵	2,4X10 ⁴
	MF a	2,2X10 ⁴	2,4X10 ⁴	3,6X10 ⁴	2,1X10 ⁴	2,1X10 ⁴
		3,5X10 ⁴	3,9X10 ⁴	4,2X10 ⁴	3,9X10 ⁴	3,5X10 ⁴
	MPN B	8	<2	2	2	2
	MF	<10	<10	<10	<10	2
FS/100 ml	MPN A	2,4X10 ⁴	3,5X10 ⁴	1,7X10 ⁴	1,1X10 ⁵	2,4X10 ⁴
	MF a	2,0X10 ⁴	2,3X10 ⁴	2,2X10 ⁴	2,4X10 ⁴	2,4X10 ⁴
		2,4X10 ⁴	2,8X10 ⁴	2,2X10 ⁴	2,9X10 ⁴	2,7X10 ⁴
	MPN B	2	2	<2	<2	2
	MF	10	10	30	330	25

a - Calculs fondés sur la moyenne des lectures sur des filtres de 1 ml et 0,1 ml.

b - Calculs fondés sur les résultats obtenus avec des filtres de 0,1 ml, ce qui est plus correct, puisque ces filtres comportaient de 20 à 80 colonies.

Appendice 1

INSTRUCTIONS AUX PARTICIPANTS

Objet

Le présent exercice d'interétalonnage a pour objet de permettre aux participants de déterminer en laboratoire des paramètres bactériologiques avec les mêmes échantillons d'eau de mer, de crustacés et de mollusques, en appliquant des méthodes prescrites, à savoir la méthode de la filtration sur membrane (MF) (Annexe 1), et la méthode du tube à essais multiples (MPN) (Annexe 2).

Echantillons

No 1	Eau de mer de très bonne qualité
No 2	Eau de mer légèrement polluée, provenant d'une zone à pollution intermittente
No 3	Eau de mer provenant d'une zone polluée
No 4	Eaux usées brutes
No 5	Crustacés et mollusques provenant d'une zone restreinte

Procédure

Il conviendrait de préparer la quantité d'échantillon à doser en vue des opérations de filtration ou d'inoculation, selon le degré de pollution du milieu échantillon. On utilisera un tampon phosphaté.

Choix de la taille de l'échantillon et de la série de dilutionsQuantité d'échantillons à analyser

	Tube à essais multiples (MPN)					Filtration sur membrane			
Eaux usées brutes	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10
Eau polluée	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10	1	10 ⁻¹	
Eau claire	10	1	10 ⁻¹			100	10	1	
Crustacés et mollusques	10	1	10 ⁻¹			Sans objet			

Préparation de la série de dilutions

Etiqueter tous les tubes et plaques de Petri suivant le numéro d'échantillon et la dilution.

Avant d'extraire les aliquotes de l'échantillon original ou des dilutions, les secouer vigoureusement pour garantir l'exacte représentativité des aliquotes extraites.

Préparer la série de dilutions en extrayant au moyen d'une pipette stérile, après avoir vigoureusement secoué l'échantillon, 1 ml de l'échantillon original, et transférer cet 1 ml dans un tube à essais contenant 9 ml de tampon phosphaté pour procéder à la première dilution (D-1).

Agiter vigoureusement le tube à la main. Poursuivre la préparation de la série de dilutions en extrayant 1 ml de la première dilution (D-1) et mélanger dans un nouveau tube à essais contenant 9 ml de tampon phosphaté pour obtenir une deuxième dilution (D-2), et ainsi de suite.

Filtration sur membrane

Commencer la filtration par la dilution la moins concentrée pour éviter toute contamination par des échantillons contenant des bactéries à de plus fortes concentrations. Utiliser un entonnoir de filtration stérilisé pour chaque échantillon. Placer des MF préstérilisés avec des pinces stérilisées au brûleur sur la plaque poreuse de l'appareil à filtrer. Poser soigneusement l'entonnoir voulu au-dessus du récipient et le bloquer en place. Verser dans l'entonnoir environ 20 ml de solution tampon phosphatée à filtrer. Avec une pipette stérile de 1 ml, ajouter 1 ml de la dernière dilution à la solution tampon phosphatée dans l'entonnoir.

Résultats

Consigner les résultats sur les imprimés appropriés

Eau de mer

1. MF : Coliformes fécaux
2. MF : Streptocoques fécaux
3. MPN : Coliformes totaux
4. MPN : Coliformes fécaux
5. MPN : Streptocoques fécaux

Crustacés et mollusques

6. MPN : Coliformes fécaux

Calculer les résultats en se servant des tableaux 1 et 2.

OBSERVATIONS

Appendice 1

Annexe 1

RECAPITULATION SYNOPTIQUE DES METHODES DE REFERENCE, APRES MODIFICATION

Coliformes fécaux présents dans l'eau de mer (Méthode de référence No 3)

Méthode : Filtration sur membrane
Milieu : Gélose m-FC avec acide rosolique (sans autoclavage)
Température d'incubation : $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ (bain-marie)
Durée : 24 heures
Couleur des colonies : Bleue
Confirmation : Acide et gaz sur bouillon de McConkey, 24 heures à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ ou
Facultatif : gaz sur bouillon de bile vert brillant, 24 heures à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ et
indole + (eau tryptonée incubée pendant 24 heures à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$)

Streptocoques fécaux dans l'eau de mer (Méthode de référence No 4)

Méthode : Filtration sur membrane
Milieu : Gélose KF contenant du TTC (sans autoclavage)
Température d'incubation : $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (incubateur à air)
Durée : 48 heures
Couleur des colonies : Rose à marron
Confirmation : Solubilité de la bile
Facultatif : Prolifération - à 45°C
- à pH 9,6
- dans 6,5% de NaCl

Coliformes fécaux dans les bivalves (Méthode de référence No 5)

Méthode : MPN
Milieu et incubation : Analyse présomptive : bouillon lactosé incubé à $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 48 heures
Analyse confirmée : bouillon de McConkey ou bouillon de bile vert brillant à 2%, incubé à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pendant 48 heures, et eau tryptonée pour l'analyse indole incubée à $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures.

Appendice 1

Annexe 2

RECAPITULATION SYNOPTIQUE DES METHODES DE REFERENCE, APRES MODIFICATION

Coliformes totaux présents dans l'eau de mer

Méthode : Tube à essais multiples
Milieu : Analyse présomptive : bouillon lactosé
Température d'incubation : $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Durée : 48 ± 3 heures
Milieu : Analyse confirmée : bouillon de bile vert brillant 2%
Température d'incubation : $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Durée : 48 ± 3 heures

Coliformes fécaux présents dans l'eau de mer

Méthode : Tube à essais multiples
Milieu : Analyse présomptive : bouillon lactosé
Température d'incubation : $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Durée : 48 ± 3 heures
Milieu : Analyse confirmée : milieu EC
Température d'incubation : $44,5 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$
Durée : 48 ± 3 heures

Streptocoques fécaux présents dans l'eau de mer

Méthode : Tube à essais multiples
Milieu : Analyse présomptive : bouillon d'azide de dextrose
Température d'incubation : $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Durée : 48 ± 3 heures
Milieu : Analyse confirmée : Bouillon EVA
Température d'incubation : $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$
Durée : 48 ± 3 heures

Figure 2

Schéma de la préparation
de séries de dilutions

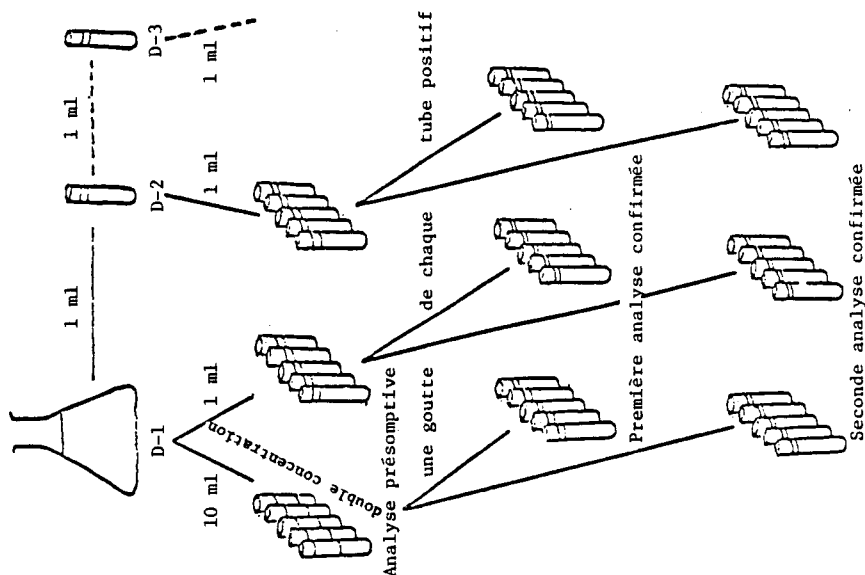
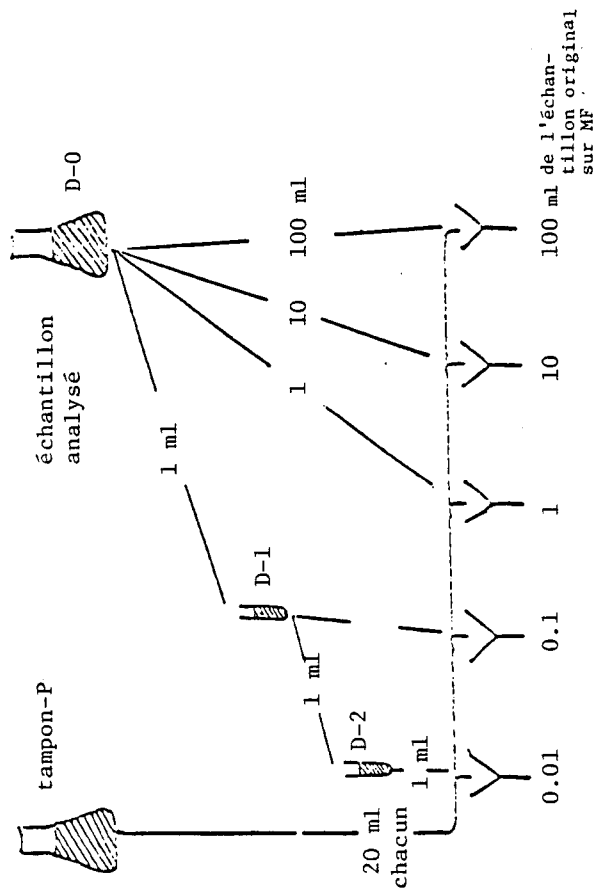


Figure 1

Schéma de la préparation
d'une série de dilutions
et de la procédure de filtration



METHODE DE LA FERMENTATION EN TUBES MULTIPLES : Densité bactérienne

Tableau 1 : Indice MPN et limites de confiance 95%
pour diverses combinaisons de résultats positifs
lorsque cinq tubes sont utilisés pour la dilution
(10 ml, 1,0 ml, 0,1 ml)

Combinaison de positifs	Indice MPN /100 ml	Limites de confiance 95%		:	Combinaison de positifs	Indice MPN /100 ml	Limites de confiance 95%	
		Infér.	Supér.				Infér.	Supér.
0-0-0	<0	-	-	:	4-2-0	22	7	67
0-0-1	2	<0,5	7	:	4-2-1	26	9	78
0-1-0	2	<0,5	7	:	4-3-0	27	9	90
0-2-0	4	<0,5	11	:	4-3-1	33	11	93
				:	4-4-0	34	12	93
				:				
1-0-0	2	<0,5	7	:	5-0-0	23	7	70
1-0-1	4	<0,5	11	:	5-0-1	31	11	89
1-1-0	4	<0,5	11	:	5-0-2	43	15	110
1-1-1	6	<0,5	15	:	5-1-0	33	11	93
1-2-0	6	<0,5	15	:	5-1-1	46	16	120
				:	5-1-2	63	21	150
				:				
2-0-0	5	<0,5	13	:	5-2-0	49	17	130
2-0-1	7	1	17	:	5-2-1	70	23	170
2-1-0	7	1	17	:	5-2-2	94	28	220
2-1-1	9	2	21	:	5-3-0	79	25	190
2-2-0	9	2	21	:	5-3-1	110	31	250
2-3-0	12	3	28	:	5-3-2	140	37	340
				:				
3-0-0	8	1	19	:	5-3-3	180	44	500
3-0-1	11	2	25	:	5-4-0	130	35	300
3-1-0	11	2	25	:	5-4-1	170	43	490
3-1-1	14	4	34	:	5-4-2	220	57	700
3-2-0	14	4	34	:	5-4-3	280	90	850
3-2-1	17	5	46	:	5-4-4	350	120	1000
				:				
4-0-0	13	3	31	:	5-5-0	240	68	750
4-0-1	17	5	46	:	5-5-1	350	120	1000
4-1-0	17	5	46	:	5-5-2	540	180	1400
4-1-1	21	7	63	:	5-5-3	920	300	3200
4-1-2	26	9	78	:	5-5-4	1600	640	5800
				:	5-5-5	> 2400	-	-

Source : Méthodes normalisées, 15e éd. APHA

Tableau 2 : Indice MPN et limites de confiance de 95% pour diverses combinaisons de résultats positifs et négatifs lorsque cinq tubes de 10 ml, cinq tubes de 1 ml et cinq tubes de 0,1 ml sont utilisés

Nombre de tubes donnant des réactions positives				Indice MPN pour		Limites de confiance 95%	
sur				1 g	0,1 g	Infér.	Supér.
5 tubes contenant				1 g	0,1 g	0,01 g	1 g
1 g	0,1 g	0,01 g	1 g	1 g	0,1 g	0,01 g	1 g
0	0	0	0	< 0,2	< 0,05	0,7	0,9
0	0	1	1	0,2	0,05	0,7	0,9
0	1	0	0	0,2	< 0,05	0,7	0,9
0	2	0	0	0,4	< 0,05	1,1	1,1
1	0	0	0	0,2	< 0,05	0,7	1,2
1	0	1	1	0,4	< 0,05	1,1	0,7
1	1	0	0	0,4	< 0,05	1,1	1,1
1	1	1	0	0,6	< 0,05	1,1	1,5
1	2	0	0	0,6	< 0,05	1,5	1,1
2	0	0	0	0,5	< 0,05	1,3	1,6
2	0	1	1	0,7	0,1	1,7	2,1
2	1	0	0	0,7	0,1	1,7	1,7
2	1	1	1	0,9	0,2	2,1	2,3
2	2	0	0	0,9	0,2	2,1	2,8
2	3	0	0	1,2	0,3	2,8	2,5
3	0	0	0	0,8	0,1	1,9	3,1
3	0	1	1	1,1	0,2	2,5	3,7
3	1	0	0	1,1	0,2	2,5	4,4
3	1	1	0	1,1	0,2	2,5	5,0
3	2	0	0	1,4	0,4	3,4	3,5
3	2	1	1	1,4	0,4	3,4	4,3
3	2	2	0	1,7	0,5	4,6	5,7
3	3	0	0	1,7	0,5	4,6	9
4	0	0	0	1,3	0,3	3,1	12
4	0	1	1	1,7	0,5	4,6	100
4	1	0	0	1,7	0,5	4,6	6,8
4	1	1	0	2,1	0,7	6,3	12
4	1	2	2	2,6	0,9	7,8	18
4	2	0	0	2,2	0,7	6,7	30
							64
							580
							240

Imprimé 1

EAU DE MER

Nombre de colonies pour chaque filtre

Dilution		Nombre de colonies de coliformes fécaux par filtration en dilution répétée		
		Répétition		
		1ère	2ème	Moyenne
D - 0	100	_____	_____	_____
D - 0	10	_____	_____	_____
D - 0	1	_____	_____	_____
D - 1	0,1	_____	_____	_____
D - 2	0,01	_____	_____	_____
D - 3	0,001	_____	_____	_____
D - 4	0,0001	_____	_____	_____

Nombre de coliformes fécaux/échantillon de 100 ml

Dilutions	n/100 ml
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Résultat d'analyse : _____ coliformes fécaux/échantillon de 100 ml

Anomalies observées en cours d'analyse :

No de l'équipe : _____

Noms des participants :

.....

.....

.....

.....

Date

Imprimé 2

EAU DE MER

Nombre de colonies pour chaque filtre

Dilution		Nombre de colonies de streptocoques fécaux par filtration en dilution répétée		
		Répétition		Moyenne
		1ère	2ème	
D - 0	100	_____	_____	_____
D - 0	10	_____	_____	_____
D - 0	1	_____	_____	_____
D - 1	0,1	_____	_____	_____
D - 2	0,01	_____	_____	_____
D - 3	0,001	_____	_____	_____
D - 4	0,0001	_____	_____	_____

Nombre de streptocoques fécaux/échantillon de 100 ml

Dilutions	n/100 ml
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Résultat d'analyse : _____ streptocoques fécaux/échantillon de 100 ml

Anomalies observées en cours d'analyse :

No de l'équipe : _____

Noms des participants :

.....

.....

.....

.....

Date

Imprimé 3

EAU DE MER

METHODE DU TUBE A ESSAIS MULTIPLES

COLIFORMES TOTAUX

Dilution	ml d'échan- tillon inoculé	Durée d'incubation	Bouillon de lactose 36° C	Vert brillant 36 ± 10C
10 ⁰	10	24		
10	1	48		
10 ⁻¹	1	24		
10 ⁻²	1	48		
10 ⁻³	1	24		
10 ⁻⁴	1	48		
10 ⁻⁵	1	24		
10 ⁻⁶	1	48		

Résultats d'analyse (voir tableau 1)
1) MPN après 48 heures en milieu "vert brillant" à 36° C coliformes totaux /100 ml
2) Limites de confiance de 95% Inférieure : Supérieure
3) Anomalies observées en cours d'analyse

No de l'équipe :

Noms des participants :
.....
.....
.....

METHODE DU TUBE A ESSAIS MULTIPLES

COLIFORMES FECAUX

Dilution	ml d'échantillon inoculé	Durée d'incubation	Bouillon de lactose 36°C	Milieu EC 44,5°C
10 ⁰	10	24		
10	1	48		
10 ⁻¹	1	24		
10 ⁻²	1	48		
10 ⁻³	1	24		
10 ⁻⁴	1	48		
10 ⁻⁵	1	24		
10 ⁻⁶	1	48		

Résultats d'analyse (voir tableau 1)
1) MPN après 48 heures en milieu EC à 44,5°C coliformes fécaux /100 ml
2) Limites de confiance de 95%
Inférieure : Supérieure
3) Anomalies observées en cours d'analyse

No de l'équipe :

Noms des participants :
.....
.....
.....

Imprimé 5

EAU DE MER

METHODE DU TUBE A ESSAIS MULTIPLES

STREPTOCOQUES FECAUX

Dilution	ml d'échan- tillon inoculé	Durée d'incubation	Bouillon de dextrose azide	Bouillon EVA
10 ⁰	10	24		
		48		
10	1	24		
		48		
10 ⁻¹	1	24		
		48		
10 ⁻²	1	24		
		48		
10 ⁻³	1	24		
		48		
10 ⁻⁴	1	24		
		48		
10 ⁻⁵	1	24		
		48		
10 ⁻⁶	1	24		
		48		

Résultats d'analyse (voir tableau 1)	
1) MPN après 48 heures en milieu EVA à 44,5°C	streptocoques fécaux
/100 ml	
2) Limites de confiance de 95%	
Inférieure	Supérieure
:	:
:	:
:	:
:	:
3) Anomalies observées en cours d'analyse	

No de l'équipe :

Noms des participants :

.....

.....

.....

Dilution	ml d'échantillon inoculé	Durée d'incubation	Lactose 36°C	Vert brillant: pour dosage 44,5°C	Eau tryptonée: Indole 44,50C
10 ⁰	10	24			
10	1	48			
10 ⁻¹	1	24			
10 ⁻²	1	48			
10 ⁻³	1	24			
10 ⁻⁴	1	48			
10 ⁻⁵	1	24			
10 ⁻⁶	1	48			

Résultats d'analyse (voir tableau 2)

1) MPN après 48 heures en Vert brillant et eau tryptonée à 44,50C

chair de crustacés et mollusques coliformes fécaux

2) Limites de confiance de 95%

Inférieure : Supérieure

3) Anomalies observées en cours d'analyse

No de l'équipe :

Noms des participants :

Annexe 3

LISTE DES PARTICIPANTS

CONSEILLERS TEMPORAIRES

- Mme M. Aravantinou (statisticienne)
Projet de lutte contre la pollution de l'environnement, Athènes (Grèce)
- Dr S. Bokan
Zavod za Zastitu Zaravlja, Rijeka (Yougoslavie)
- Dr Y.G. Goufa
Laboratoires centraux de la santé publique, Athènes (Grèce)
- Dr N. Dimopoulos
Département de biologie, Université de Patras (Grèce)
- Mme E. Ioannou
Ministère de la santé, laboratoire général d'analyses, Akropolis (Chypre)
- Professeur V. Katsouyannopoulos
Département d'hygiène, Ecole de Médecine, Université de Ioannina (Grèce)
- Dr V. Krikelis
Laboratoire d'entérovirus, Institut Pasteur hellénique, Athènes (Grèce)
- Dr N. Krstulovic
Institut d'océanographie et des pêches, Split, Yougoslavie (rapporteur)
- Dr G. Manes
Directeur, direction de la santé publique, Ministère de la santé et du bien-être, Athènes (Grèce)
- Dr A. Mates
Ministère de la santé, laboratoire de district de la santé publique, Haïfa (Israël)
- Mme A. Mavridou
Ecole d'hygiène, Athènes (Grèce)
- Dr A. Mourmouris
Ministère de la planification physique, du logement et de l'environnement, Athènes (Grèce)
- Professeur J. A. Papadakis
Département de bactériologie, Ecole d'hygiène d'Athènes (Grèce)
- Professeur G. Papaevangelou
Ecole d'hygiène d'Athènes (Grèce)
- Dr M. Papapetropoulou
Département d'hygiène, Université de Patras (Grèce)
- Professeur J. Th. Papavassiliou
Conseil central de la santé, Athènes (Grèce)
- M. F. Portelli
Laboratoire de la santé publique, Département de la santé, Valletta (Malte)
- Dr C. Richardson (statisticien)
Ecole d'hygiène d'Athènes (Grèce)
- M. M. Sabatakakis
Ministère de la santé et du bien-être, département de la protection sanitaire de l'environnement, Athènes (Grèce)

Mme S. Sotiracopoulos
Projet de lutte contre la pollution de l'environnement, Athènes (Grèce) (présidente)

Mme D. Spala
Projet de lutte contre la pollution de l'environnement, Athènes (Grèce)

Dr G. Stathopoulos
Laboratoire d'hygiène, Ecole de médecine, Université de Thessalonique (Grèce)

Dr M. Thalassinou-Tzatzani
Laboratoires centraux de la santé publique, Athènes (Grèce)

Dr E. Yianniou
Entreprise d'évacuation des eaux usées, Athènes (Grèce)

Mme A. Yilmaz
Université technique du Moyen-Orient, département des sciences de la mer, Erdemli (Turquie)

Dr Yona Yoshpe-Purer
Directeur, Laboratoire de la santé publique Dr A. Felix, Ministère de la santé, Tel-Aviv
(Israël) (vice-présidente)

REPRESENTANTS D'AUTRES ORGANISATIONS

Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE)

Dr F.S. Civili
Chercheur en sciences de la mer, Unité de coordination du plan d'action pour la Méditerranée,
Athènes (Grèce)

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

Bureau régional de l'Europe

Dr J. Saliba
Spécialiste scientifique principal, bureau du projet OMS/EURO, Unité de coordination du plan
d'action pour la Méditerranée, Athènes (Grèce) (secrétaire)