

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

Quatrième rapport sur une réunion mixte OMS/PNUE

Split
15-20 avril 1985



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

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Préface	1
1. Ouverture de la réunion	3
2. Portée et objectifs de la réunion	4
3. Election du Bureau	5
4. Adoption de l'ordre du jour	5
5. Organisation de la réunion et de l'exercice en laboratoire	5
6. Examen des exercices d'interétalonnage antérieurs	5
7. Etude du projet révisé de directive sur la surveillance continue des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques	5
8. Examen critique des projets de méthodes de référence	7
9. Action future et recommandations	8
Annexe 1 Résultats de l'exercice d'interétalonnage	10
Annexe 2 Exercice d'interétalonnage et réunion de concertation sur les méthodes microbiologiques de surveillance de la qualité de l'eau	25
Annexe 3 Liste des participants	32

PREFACE

En vertu du Plan d'action pour la Méditerranée, adopté par les pays du bassin méditerranéen à Barcelone, en février 1975, et conformément à l'article 10 de la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution d'origine tellurique, les parties contractantes ont entrepris d'établir, en étroite collaboration avec les institutions internationales compétentes, un système d'observation de la pollution dans le bassin méditerranéen.

La composante scientifique du plan d'action, c'est-à-dire le programme coordonné de surveillance et de recherche sur la pollution de la mer Méditerranée (MED POL) était destinée à constituer le cadre d'un système de surveillance de cette nature et à lui impartir les connaissances nécessaires. Au cours de la phase pilote de ce programme (MED POL - Phase I), exécutée entre 1976 et 1981, des activités étaient entreprises par le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE), en collaboration étroite avec l'Organisation mondiale de la santé, en vue d'établir des méthodes normalisées d'échantillonnage et d'analyse bactériologique. Ces méthodes ont été déterminées au cours du projet sur le contrôle de la qualité des eaux côtières de la Méditerranée (MED - POL VII), coordonné conjointement par l'OMS et le PNUE, et visant essentiellement à l'étude des paramètres biologiques et apparentés en vue de la surveillance continue des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques.

Dans le cadre du programme à long terme de surveillance et de recherche sur la pollution de la Méditerranée (MED POL - Phase II), couvrant la période de 1981 à 1990, et conformément aux articles pertinents de la Convention et de ses protocoles, la quasi-totalité des pays méditerranéens ont présenté des programmes nationaux d'observation, dont un certain nombre ont atteint leur vitesse de croisière, parfois depuis 1983.

Aux fins de la comparaison des résultats et du contrôle de la qualité des analyses, tant au plan national que régional, une série d'exercices d'interétalonnage des méthodes microbiologiques de surveillance de la qualité des eaux côtières a été entreprise en 1983, après un exercice préparatoire organisé l'Istituto superiore di Sanità, à Rome, en novembre 1982. Ces travaux, réalisés alternativement en anglais et en français, sont destinés aux laboratoires du pays organisateur, qui participe ou envisage de participer au programme de surveillance, ainsi qu'à quelques laboratoires d'autres pays, afin d'assurer la continuité de l'organisation et de la participation. Le premier exercice de la série a eu lieu à l'Escola Tecnica Superior d'Enginyers de Camins, Canals i Ports, à Barcelone (7-11 novembre 1983), le deuxième au siège du projet de lutte contre la pollution de l'environnement, à Athènes (25-29 juin 1984), et le troisième, à l'Institut Pasteur, à Tunis (12-16 novembre 1984).

Le présent exercice d'interétalonnage et réunion de consultation était organisé par l'OMS et le PNUE, en collaboration avec l'Institut d'océanographie et des pêches de Split, dans le cadre de MED POL - Phase II. Son principal objet était de permettre aux participants de procéder à des titrages de

paramètres bactériens, sur les mêmes échantillons d'eau de mer, de crustacés et de mollusques et ce, par les méthodes recommandées ci-après :

- détermination des coliformes totaux dans l'eau de mer, par la technique de filtration sur membrane (Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 2/rev. 1, UNEP/WHO);
- dosage des coliformes fécaux dans l'eau de mer, par la technique de filtration sur membrane (Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 3/Rev. 1, UNEP/WHO);
- dosage des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la technique de filtration sur membrane (Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 4/Rev. 1, UNEP/WHO);
- dosage des coliformes fécaux dans les bivalves, par la technique des dilutions en tubes multiples (Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 5/Rev. 1, UNEP/WHO).

En outre, pour obtenir des informations plus détaillées sur la comparabilité des résultats obtenus par la technique de filtration sur membrane et la technique des dilutions en tubes multiples, il était prévu que les participants procéderaient à des dosages parallèles de coliformes fécaux dans les mêmes échantillons d'eau de mer, suivant la méthode ci-après :

- dosage des coliformes fécaux dans l'eau de mer, par la technique des dilutions en tubes multiples (Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 22, UNEP/WHO, projet).

Ces méthodes de référence font partie d'une série exhaustive, formulée par le programme du PNUE pour les mers régionales, en collaboration avec les institutions spécialisées des Nations Unies. Cette série vise à couvrir ultérieurement tous les paramètres possibles, cités en annexe aux protocoles adoptés en liaison avec la convention. Il est également prévu de les utiliser dans des régions autres que la Méditerranée.

Parmi les objectifs de la réunion de consultation figurait un réexamen/projet de méthode de référence pour le dosage des coliformes fécaux dans l'eau de mer par la technique de dilution en tubes multiples ainsi que des méthodes ci-après :

- dosage des coliformes totaux dans l'eau de mer par la technique de dilutions en tubes multiples (Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 21, UNEP/WHO, projet);
- dosage des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la technique des dilutions en tubes multiples (Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 23, UNEP/WHO, projet);
- directives pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques (Reference Methods for Marine Pollution Studies No. 1, UNEP/WHO, projet révisé).

Parmi les autres objectifs de la consultation il faut citer :

- examen des résultats des exercices antérieurs d'interétalonnage;
- étude des résultats du présent exercice d'interétalonnage, afin de définir les problèmes techniques de méthodologie et de contrôle de la qualité;
- formulation de recommandations relatives aux exercices ultérieurs de la série;
- recommandations relatives aux aspects pertinents du programme à long terme de surveillance continue et de recherche sur la pollution.

Des représentants des institutions yougoslaves participant à la composante "surveillance continue de MED POL - Phase II", dans ses aspects microbiologiques, ainsi qu'à d'autres programmes nationaux d'observation continue, ont été invités à participer à l'exercice d'interétalonnage et à la réunion de consultation, de même que des représentants d'institutions situées à Chypre, en Egypte, en Israël, au Liban, en Lybie et en Turquie, participant au même programme. En outre, les organisations internationales suivantes avaient été invitées à se faire représenter : l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), la Commission océanographique intergouvernementale (COI), l'Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture (UNESCO), l'Organisation météorologique mondiale (OMM) et l'Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA).

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

La réunion était organisée à l'Institut d'océanographie et des pêches de Split, du 15 au 20 avril 1985. Y ont participé neuf conseillers temporaires venus de Yougoslavie et six, d'autres pays méditerranéens. Le Bureau régional de l'OMS pour l'Europe et l'unité de coordination du Plan d'action pour la Méditerranée (PNUE) étaient représentés par un fonctionnaire unique. La liste des participants figure en Annexe 3.

Le Dr L.J. Saliba, spécialiste scientifique principal de l'OMS, Plan d'action pour la Méditerranée, Bureau régional de l'Europe de l'Organisation mondiale de la santé, ouvre la consultation au nom du Dr J.E. Asvall, directeur régional pour l'Europe. Faisant état du profond attachement de l'OMS au Plan d'action pour la Méditerranée, dans le cadre duquel était organisée la réunion, il souligne l'importance de la présente série d'exercices d'interétalonnage qui, avec les méthodes normalisées de référence, assurent la comparabilité des résultats, ce qui permet de se faire une image d'ensemble de l'état de pollution microbienne des eaux côtières de la Méditerranée à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques. L'orateur exprime la gratitude de l'OMS pour les efforts consentis et les locaux fournis par l'Institut d'océanographie et des pêches pour l'exercice de laboratoire et la réunion de consultation. Le Dr Saliba fait remarquer combien il est opportun que la réunion se tienne en Yougoslavie, ce pays ayant participé, depuis le début du programme MED POL, aux activités du programme dans le domaine de la santé. D'ailleurs l'institut hôte a depuis toujours qualité de participant actif du programme.

Le Dr Pero Cetinic, directeur de l'Institut d'océanographie et des pêches de Split, souhaite la bienvenue aux participants. Heureux de ce que la réunion ait été organisée dans son institut, qui collabore de longue date avec l'Organisation mondiale de la santé et le Programme des Nations Unies pour l'environnement aux importants travaux consacrés à l'observation des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage des crustacés et des mollusques, il exprime l'espoir que cette coopération pourra être poursuivie à l'avenir avec le même succès. Mettant une fois de plus l'institut à la disposition des participants, pour leur offrir toute l'assistance nécessaire afin d'assurer le succès de leurs travaux, il souhaite que la réunion permette d'obtenir des résultats qui se révéleront utiles aux projets futurs de même nature.

Le Dr L.J. Saliba adresse ensuite quelques paroles aux participants, au nom de M. Aldo Manos, coordonnateur PNUE du Plan d'action pour la Méditerranée. Depuis son adoption à Barcelone en 1975, ce Plan est activement poursuivi. L'orateur fait état de ses principales composantes du Plan d'action, faisant remarquer que cette activité spécifique ne devrait pas être vue simplement dans l'optique de ces effets sur la santé, mais qu'il convient de la replacer dans le cadre général du Plan d'action.

M. A. Pavasovic, directeur du Centre d'activité régionale sur les programmes d'actions prioritaires (PAP/RAC), s'adresse aux participants au nom du centre, qui est chargé de l'une des composantes majeures du Plan d'action pour la Méditerranée. M. Pavasovic esquisse la place du PAP dans la structure générale du Plan et évoque les projets régionaux entrepris dans les domaines des établissements humains, de la gestion des ressources en eau, du tourisme, de la protection des sols, de l'aquaculture et des sources d'énergie renouvelables. La présente réunion a des liens avec les projets relatifs aux établissements humains et au tourisme. Souhaitant lui aussi aux participants un succès total de la réunion, il les invite à visiter le PAP/RAC, à Split, pour se faire une idée plus précise de ces activités.

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

Le Dr L.J. Saliba évoque les grandes lignes de la portée et des objectifs de l'exercice et de la réunion de consultation. Au cours de l'exercice de laboratoire, il importe que tous les participants suivent les instructions de l'institution hôte, la comparabilité des résultats étant tributaire de l'application d'une méthodologie unique. Il est non moins important que les participants s'efforcent d'appliquer ultérieurement les mêmes méthodes dans leurs laboratoires nationaux au cours des travaux d'échantillonnage et d'analyse qu'ils réalisent dans le cadre de la composante "observation continue" de MED POL. A défaut, toute comparaison globale des résultats soumis par les différents laboratoires se révélera difficile.

En outre, au cours de leurs réunions, les participants sont appelés à réviser les projets de méthodes de référence pour le dosage des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer, par la technique des dilutions en tubes multiples, ainsi que le projet de directives pour la surveillance continue de la qualité des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques.

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

Le Dr Nada Krstulovic est portée à la présidence, le Dr A.F. Boargob, à la vice-présidence et M. B. Cihangir a été élu rapporteur. Le Dr L.J. Saliba fait fonction de secrétaire de la réunion.

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

L'ordre du jour provisoire est adopté à l'unanimité.

5. Organisation de la réunion et de l'exercice en laboratoire (point 5 de l'ordre du jour)

La présidente expose le programme ainsi que les procédures applicables au cours de l'exercice de laboratoire et de la réunion de consultation. Au laboratoire, les participants travailleront en groupes de deux. Les instructions détaillées sur les procédures de laboratoire sont à leur disposition, de même que les imprimés nécessaires pour faire rapport. Il ne sera fait appel aux méthodes de référence qu'en cas de difficulté. Elle rappelle que les participants ont adopté le programme provisoire, étant entendu qu'il pourrait y avoir lieu de le modifier, en fonction des progrès réalisés en laboratoire.

6. Examen des exercices d'interétalonnage antérieurs (point 6 de l'ordre du jour)

Le Dr L.J. Saliba a brièvement décrit des résultats des précédents exercices d'interétalonnage. Celui de Rome (22-26 novembre 1982), de nature préliminaire, visait à acquérir l'expérience nécessaire pour entamer la série régulière. Le premier exercice (Barcelone, 7-11 novembre 1983) n'a pas fait apparaître une bonne corrélation entre résultats individuels. Cela peut être attribué à deux facteurs essentiels : les fortes crues de l'époque, qui ont affecté l'homogénéité des échantillons, et les variations entre méthodes individuelles. Au cours du deuxième exercice (Athènes, 25-29 juin 1984) on a obtenu une bonne corrélation tant entre résultats individuels et (dans une certaine gamme de valeurs) entre la technique de filtration sur membrane (MF) et la technique des dilutions en tubes multiples suivie de l'interprétation au moyen du nombre le plus probable (MPN). Des correspondances du même ordre ont été obtenues au cours du troisième exercice (Tunis, 12-16 novembre 1984). Dans ce dernier cas, la corrélation entre résultats individuels était affectée par le fait que certains participants utilisaient pour la première fois la technique MF.

7. Etude du projet révisé de directive sur la surveillance continue des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques (point 7 de l'ordre du jour)

Le Dr Saliba présente rapidement le document ICP/CEH 001/m04/6. Cette version du projet de directive est fondée sur les observations et les suggestions formulées lors de la réunion de consultation tenue à Athènes en juin 1984, ainsi que sur d'autres commentaires reçus par la suite d'un certain nombre d'institutions du bassin méditerranéen.

Les participants n'ont eu aucune observation à formuler sur la présentation d'ensemble du document. Par contre, un certain nombre de commentaires ont été proposés sur des points précis. Il s'agit en particulier des listes de paramètres à adopter dans les programmes minimum et élargis d'observation continue, de surveillance des plages, ainsi que d'observation du sable des plages pour définir les paramètres bactériens et fongiques.

Il est apparu aux participants que le nombre de paramètres à retenir dans le programme minimum (en d'autres termes les paramètres microbiologiques obligatoires pour l'eau de mer - coliformes fécaux, streptocoques fécaux et un organisme pathogène à choisir selon les exigences particulières du site) est suffisant. On a toutefois fait remarquer qu'il conviendrait de procéder aussi à la détermination des paramètres complémentaires plus importants (température, salinité, etc.). Compte tenu du fait que dans la région méditerranéenne (comme ailleurs) les individus passent un laps de temps considérable en contact direct avec le sable des plages, plusieurs participants ont jugé que même dans un programme minimum d'observation continue il faudrait inclure un organisme pathogène du sable. Un tel organisme pourrait être bactérien ou fongique.

Une discussion exhaustive a permis d'examiner les divers aspects de l'échantillonnage du sable des plages, ainsi que les problèmes pratiques de l'interprétation des résultats. Contrairement à ce qui se passe pour l'eau de mer, qui peut être considérée comme un milieu relativement homogène, la teneur microbiologique du sable est variable. Ces variations peuvent être l'effet des activités humaines comme de l'action des vagues, et aucun échantillon de sable ne saurait être considéré comme représentatif d'aucune plage, à moins que l'on ne procède à une grande quantité de prélèvements. Il convient aussi de rappeler le problème des plages qui sont nettoyées régulièrement par des moyens mécaniques (parfois chaque matin), qui ne manquera pas d'affecter gravement l'échantillonnage et l'interprétation des résultats.

Les participants sont convenus qu'il n'est pas possible, au stade actuel, de formuler une méthodologie spécifique à l'échantillonnage du sable sur les plages touristiques, dans la mesure où un travail considérable reste à réaliser pour que l'échantillonnage puisse être effectué dans des conditions telles que l'on puisse se faire une image correcte de la situation générale d'une plage donnée. On a recommandé que ces activités préliminaires soient entreprises dans le cadre de la composante "recherche" de MED POL.

Les participants ont analysé aussi l'interprétation des résultats des opérations de surveillance et des mesures pratiques indiquées. A cet égard, ils sont convenus que les critères de qualité de l'environnement sont extrêmement importants, des décisions relatives à l'affectation des zones touristiques devant être prises sur la base de ces critères. Ils ont noté que dans le cadre de la composante "recherche" de MED POL, des études sont en cours sur les rapports existant entre la qualité microbiologique de l'eau de mer et la santé des nageurs. Il a été décidé que de telles études épidémiologiques sont indispensables pour que l'on puisse déterminer des critères qualitatifs solides. Les difficultés auxquelles on se heurtera dans ces études ont été notées par les participants qui, à ce propos, ont été informés de l'organisation, en octobre 1985, d'une réunion de consultation spéciale pour étudier ce problème et formuler des propositions concrètes et réalistes, en vue de la poursuite de ces études.

Les participants sont convenus que les programmes minimum de surveillance continue ne pourraient permettre l'enregistrement de tous les paramètres énumérés dans la classification Garber; il apparaît d'ailleurs que les plus importants, définis dans les directives, suffiront.

Tout au long des débats sur les directives, il a été entendu que la version définitive du document sera élaborée après réception de nouvelles observations des instituts méditerranéens, compte tenu des remarques formulées au cours de la réunion.

8. Examen critique des projets de méthodes de référence (point 8 de l'ordre du jour)

Au cours de la réunion, le contenu des méthodes de référence pour le dosage des coliformes totaux, des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux dans l'eau de mer, par la technique des dilutions en tubes multiples, a fait l'objet d'une brève discussion. Ces documents ont été préparés par un consultant et révisés par un expert de réputation internationale. Les participants ont été informés que les documents seront soumis aux laboratoires méditerranéens, pour nouvelles observations, à la lumière des commentaires formulés en séance et avant diffusion des premières versions fondamentales.

Les observations et suggestions ci-après ont été formulées à propos du projet de méthode de référence pour le dosage des coliformes totaux dans l'eau de mer, par la technique des dilutions en tubes multiples :

- il faudrait envisager la possibilité, lorsqu'on procédera aux essais de confirmation, d'employer du milieu solide de McConkey dans des boîtes, au lieu de bouillon liquide en tubes;
- de même, on devrait envisager de remplacer le thiosulfate de sodium par du thiosulfate de potassium, faute de pouvoir se procurer la première de ces substances.

A propos du projet de méthode de référence pour la détermination des coliformes fécaux dans l'eau de mer par la méthode des dilutions en tubes multiples, les observations et suggestions ci-après ont été formulées :

- comme pour les coliformes totaux, il conviendrait d'envisager de remplacer le thiosulfate de sodium par du thiosulfate de potassium si la première de ces substances n'est pas disponible;
- des doutes ont été exprimés quant à la nécessité de maintenir le test à l'indole. Certains participants ont jugé que le test de McConkey suffirait;
- à la section 8.3, a) la température d'incubation figurant au troisième paragraphe devrait se lire $44,5^{\circ}\text{C}$, et non pas $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$; et b) les lectures devraient être effectuées au bout de 24 heures et non de 48 heures.

Pour ce qui est du projet de méthode de référence pour le dosage des streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la technique des dilutions en tubes multiples, il a été suggéré d'utiliser comme milieu du bouillon de streptocoques KF.

Parmi les observations et suggestions d'ordre général, c'est-à-dire applicables aux trois méthodes, il convient de citer :

- les échantillons devraient si possible arriver au laboratoire 12 heures au plus après leur prélèvement;
- les tests de présomption devraient être vérifiés au bout de 48 heures et non pas de 24. Il n'existe pas de raison scientifique pour maintenir la période de 24 heures;
- les participants ont considéré que les effets de la salinité seront un facteur important et il est apparu que les méthodes de référence devraient en faire mention.

Les participants ont décidé que les trois méthodes devront être vérifiées par des laboratoires méditerranéens, aux fins de commentaires plus détaillés. Il sera possible en outre de proposer la révision des autres méthodes de référence faisant appel à la technique MF. A cet égard, les observations ci-après ont été formulées concernant la méthode de référence N° 2, rev. 1 (dosage des coliformes totaux dans l'eau de mer par la technique de filtration sur membrane) :

- il est apparu, sur la base de certaines expériences individuelles, que le milieu de culture M-endo agar ne saurait subir un entreposage de 30 jours après sa préparation. Selon des estimations plus fondées, il conviendrait d'envisager 7-10 jours;
- lors de la préparation du même milieu, les composantes devraient au départ être dissoutes dans 20 ml d'éthanol et peu d'eau, puis amenées à niveau.

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

Les participants ont examiné les résultats de l'exercice en cours, en guise de base de discussion de l'action ultérieure. Un rapport détaillé, citant notamment les résultats obtenus, figure en Annexe 1, et les instructions aux participants en Annexe 2. En règle générale, une assez bonne corrélation a été obtenue entre les constatations des divers participants, les disparités étant attribuées à de légères variations des techniques individuelles. De même, une expérience plus ou moins grande contribue aussi aux variations entre résultats individuels encore que, dans cet exercice particulier, le degré de pratique des participants n'ait pas été aussi variable que lors des exercices antérieurs.

On a insisté sur la nécessité, pour les participants, de continuer d'utiliser la même méthode, une fois revenus à leur laboratoire d'origine. A défaut, il sera malaisé de comparer les résultats présentés par les différents laboratoires.

Les participants ont en outre formulé les recommandations spécifiques ci-après :

- la série d'exercices d'interétalonnage sur les paramètres microbiologiques, dans le cadre de la composante "surveillance continue" de MED POL - Phase II devrait être poursuivie. C'est en effet la meilleure façon de réunir les participants de différents laboratoires, qui contribue sensiblement à l'harmonisation des techniques;
- en dehors des exercices d'interétalonnage, il conviendrait d'envisager d'organiser des cours de formation en méthodes microbiologiques, concernant le programme d'observation continue MED POL. A cet effet, on pourrait procéder sur une base nationale ou sous-régionale;
- pour faciliter l'action sur la base des résultats de la surveillance continue, il conviendrait d'adopter des critères de la qualité de l'environnement pour les principaux paramètres microbiologiques, sur une base régionale commune;
- les études épidémiologiques sur la corrélation entre la qualité de l'eau côtière et ses effets sur la santé devraient être poursuivies sur une base élargie;
- il faudrait élaborer de nouvelles méthodes de référence sur le dosage d'autres paramètres, bactériens ou fongiques. En particulier, il importe d'étudier la surveillance continue du sable des plages, afin de déterminer la meilleure façon d'obtenir des résultats suffisamment représentatifs;
- pour les exercices ultérieurs, on pourrait peut-être préparer les échantillons d'eau de mer de façon à limiter la présence d'éléments de confusion naturels. On pourrait notamment se procurer des échantillons artificiels de concentration bactérienne connue ou encore réduire le nombre d'échantillons et adopter un nombre plus grand de dilutions.

Annexe 1

RESULTATS DE L'EXERCICE D'INTERETALONNAGE Split, 15-20 avril 1985

Introduction

L'exercice avait pour objet de permettre aux participants de procéder au dosage des concentrations microbiennes dans les mêmes échantillons d'eau de mer, de crustacés et de mollusques, par une méthodologie uniforme, puis de comparer les résultats obtenus par les différents participants pour chaque paramètre, afin de déterminer toutes les sources de variations et de s'efforcer d'y porter remède.

Organisation et méthodologie

Les participants étaient répartis en sept groupes de deux. Trois échantillons d'eau de mer et un échantillon de crustacés ou de mollusques étaient analysés par chaque groupe. L'échantillon A était constitué par l'eau de mer prélevée sur une plage fortement polluée, l'échantillon B, sur une plage modérément polluée et l'échantillon C, sur une plage relativement propre. L'échantillon de crustacés ou de mollusques avait été recueilli dans une zone polluée.

Les échantillons d'eau de mer étaient analysés pour déterminer les paramètres ci-après :

- coliformes totaux (TC), par la technique de filtration sur membrane (MF);
- coliformes fécaux (FC), par la méthode de filtration sur membrane et la méthode des dilutions en tubes multiples, suivie de l'interprétation au moyen du nombre le plus probable (MPN);
- streptocoques fécaux (FS) par la technique de filtration sur membrane (MF).

L'échantillon de crustacés ou de mollusques a été analysé pour le dosage des coliformes fécaux (FC), par la technique des dilutions en tubes multiples.

Dans tous les dosages, on a appliqué les méthodes de référence élaborées par l'Organisation mondiale de la santé et le Programme des Nations Unies pour l'environnement, dans le cadre du Plan d'action pour la Méditerranée.

L'inoculation, la filtration, de même que la lecture des résultats ont été réalisées en groupes. Tout au long de l'exercice, on a contrôlé, dans toute la mesure possible, la procédure et les lectures de chaque participant, afin de déterminer la typologie des erreurs et des écarts susceptibles d'influer sur les résultats, au-delà des variations normalement imputables aux méthodes elles-mêmes.

Les échantillons nécessaires, tout le matériel, les milieux de culture et les réactifs ont été fournis aux participants, ainsi que des fiches d'instructions et des imprimés pour enregistrer les résultats.

Résultats et discussion

Les lectures obtenues par chaque groupe sur les filtres à membrane, pour chacun des trois échantillons d'eau de mer, sont données en appendice, ainsi qu'une analyse statistique des résultats. Dans l'échantillon A, la concentration totale en coliformes était trop élevée pour permettre le dosage. Pour les coliformes fécaux, les résultats obtenus variaient entre 256×10^5 et 163×10^6 FC pour 100 ml, un groupe obtenant un résultat de 1×10^5 FC/100 ml. La moyenne des concentrations, sur l'ensemble des résultats, était de 141×10^6 FC/100 ml. Pour les streptocoques fécaux, la fourchette allait de 251×10^5 à 448×10^5 FS/100 ml, avec une moyenne de 282×10^5 FS/100 ml.

Pour l'échantillon B, les concentrations de coliformes totaux allaient de 154×10^4 à 171×10^5 TC/100 ml, avec une moyenne de 376×10^4 ; pour les coliformes fécaux, 132×10^4 à 127×10^5 , avec une concentration enregistrée de 7×10^4 TC/100 ml et une concentration moyenne, sur l'ensemble des résultats, de 311×10^4 TC/100 ml; et pour les streptocoques fécaux 283×10^3 à 820×10^3 FS/100 ml, avec une concentration moyenne de 551×10^3 FS/100 ml.

Quant à l'échantillon C, la gamme des concentrations enregistrées pour les coliformes totaux allait de 4200 à 9800 TC/100 ml, avec une concentration moyenne de 5943 TC/100 ml; pour les coliformes fécaux, de 2300 à 3575 FC/100 ml, avec une concentration moyenne de 2922 FC/100 ml et pour les streptocoques fécaux, 1340 à 2200 FS/100 ml, avec une concentration moyenne de 1844 FS/100 ml.

L'écart-type et les limites de confiance à 95% sont donnés en appendice pour l'ensemble des cas. Pour presque tous les paramètres et échantillons, les résultats obtenus étaient statistiquement significatifs.

Dans le cas du dosage des coliformes fécaux par la méthode des dilutions en tubes multiples, avec interprétation au moyen du nombre le plus probable (MPN), tous les résultats obtenus pour chacun des échantillons A, B et C dépassaient 2400 FC pour 100 ml. Si ces résultats correspondent en général à ceux qui ont été obtenus pour le même paramètre par la méthode MF, il n'a pas été possible de déterminer les différences individuelles ou les divergences entre les deux méthodes, du point de vue statistique. Les mêmes résultats ont été obtenus dans l'échantillon de crustacés et de mollusques (plus de 2400 FC/100 ml).

Bien que les méthodes prescrites aient été fidèlement appliquées, une certaine mesure de variation est apparue en fonction de la technique individuelle des divers participants. Elle est mineure et ne correspond pas au type normalement décrit dans les instructions normalisées sur la méthodologie. On a cependant conclu qu'elle pourrait bien avoir contribué aux disparités entre résultats individuels.

Les échantillons (eau de mer d'une part, crustacés et mollusques de l'autre) étaient plus pollués que prévu et les chiffres obtenus même pour l'échantillon d'eau de mer le plus propre (C) dépassaient la concentration maximale traitée dans le tableau MPN. Cela a interdit toute comparaison réaliste entre résultats obtenus par les techniques MF et MPN pour les coliformes fécaux.

Conclusions

On peut considérer dans l'ensemble, compte tenu de tous les facteurs, que la correspondance entre les résultats des divers groupes était très bonne. Toutefois, la variation effective dépassait ce que l'analyse statistique semblerait indiquer.

Il n'est pas douteux que l'exercice ait été utile dans la mesure où il a amélioré la comparabilité des résultats futurs de la surveillance bactériologique des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et mollusques, dans le cadre de MED POL. Les principaux problèmes peuvent être évoqués comme suit : a) il n'est pas possible de trouver des échantillons présentant un niveau de pollution marginale (c'est-à-dire pour lesquels des variations même légères entre lectures individuelles pourraient influencer sur les mesures juridiques ou administratives) et b) dans un certain nombre de cas, les facilités existantes dans les laboratoires d'origine des participants ne correspondent pas strictement à celles dont ils disposaient pendant cet exercice. Ce dernier problème fait apparaître plus clairement la nécessité d'une normalisation plus poussée entre laboratoires pour s'assurer que les exigences communes minimum sont respectées.

Appendice

Analyse statistique des teneurs microbiennes des échantillons d'eau côtière

Méthode : MF

Type d'échantillon d'eau : A

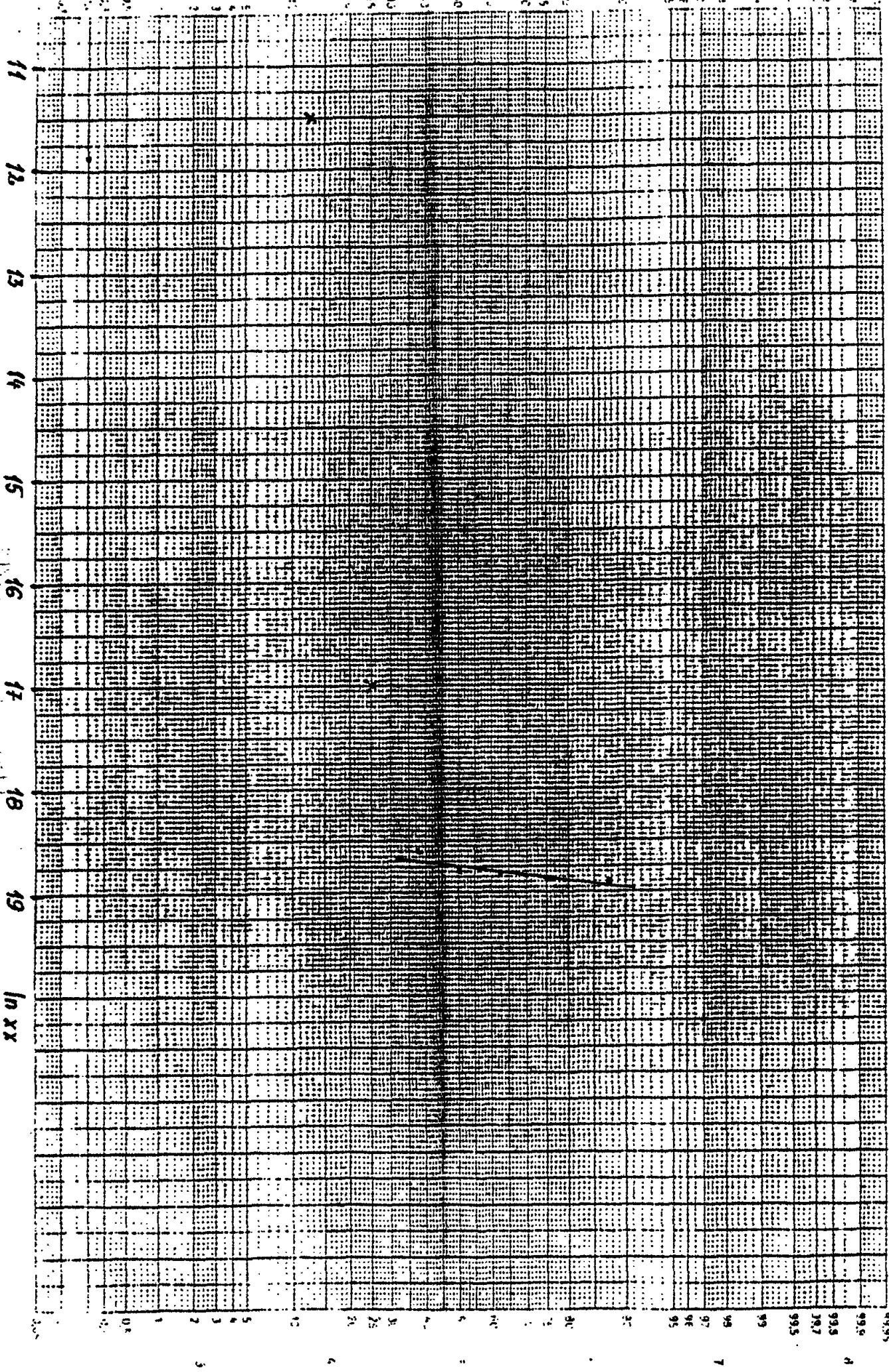
Groupe de travail	Concentration microbienne pour 100 ml		
	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	Streptocoques fécaux
1	-	256,10 ⁵	308,10 ⁵
2	-	1,10 ⁵	448,10 ⁵
3	-	156,10 ⁶	272,10 ⁵
4	-	163,10 ⁶	251,10 ⁵
5	-	131,10 ⁶	256,10 ⁵
6	-	143,10 ⁶	288,10 ⁵
7	-	148,10 ⁶	286,10 ⁵
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-

Milieu de culture (gélose)	m-Endo	m-FC	m- <u>Enterococcus</u>
Nombre d'échantillons identiques		7	7
Fourchette des concentrations de colonies pour 100 ml		1,10 ⁵ 163,10 ⁶	251,10 ⁵ 448,10 ⁵
Concentration moyenne de colonies pour 100 ml		141,10 ⁶	282,10 ⁵
Concentration moyenne, en logarithmes naturels		18,765	17,155
Ecart-type, en logarithmes naturels		0,105	0,110
Intervalle de confiance à 95% pour les concentrations microbiennes		98,10 ⁶ 157,10 ⁶	226,10 ⁵ 351,10 ⁵
Intervalle de confiance à 95% des concentrations microbiennes moyennes		128,10 ⁶ 155,10 ⁶	255,10 ⁵ 312,10 ⁵

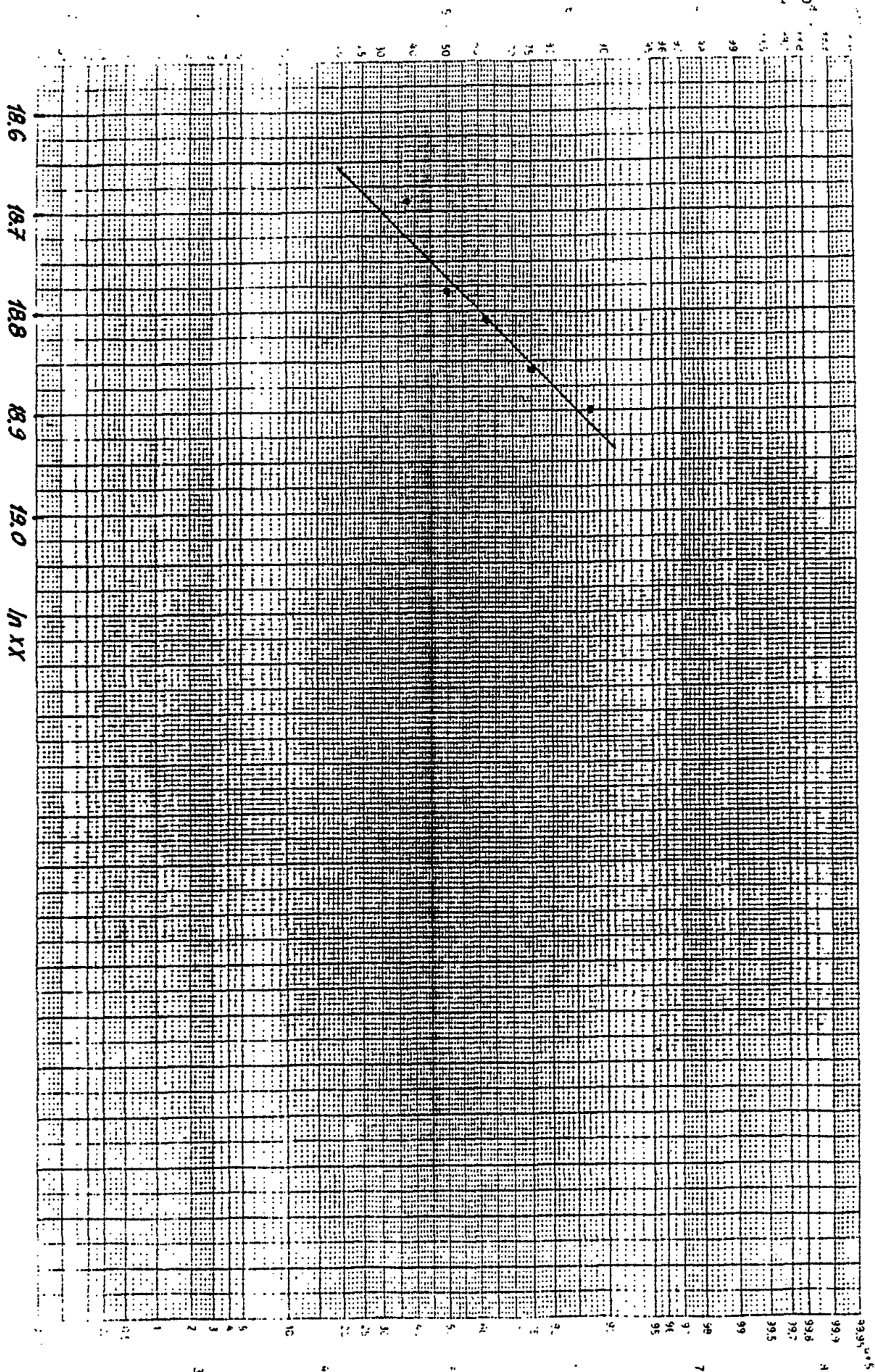
Format after Gauss Abtasse 250 mm

FC 90 = 144.10 FC/100 ml
FC 90 = 166.10 FC/100 ml
S = 0.105

points ignored 19.44

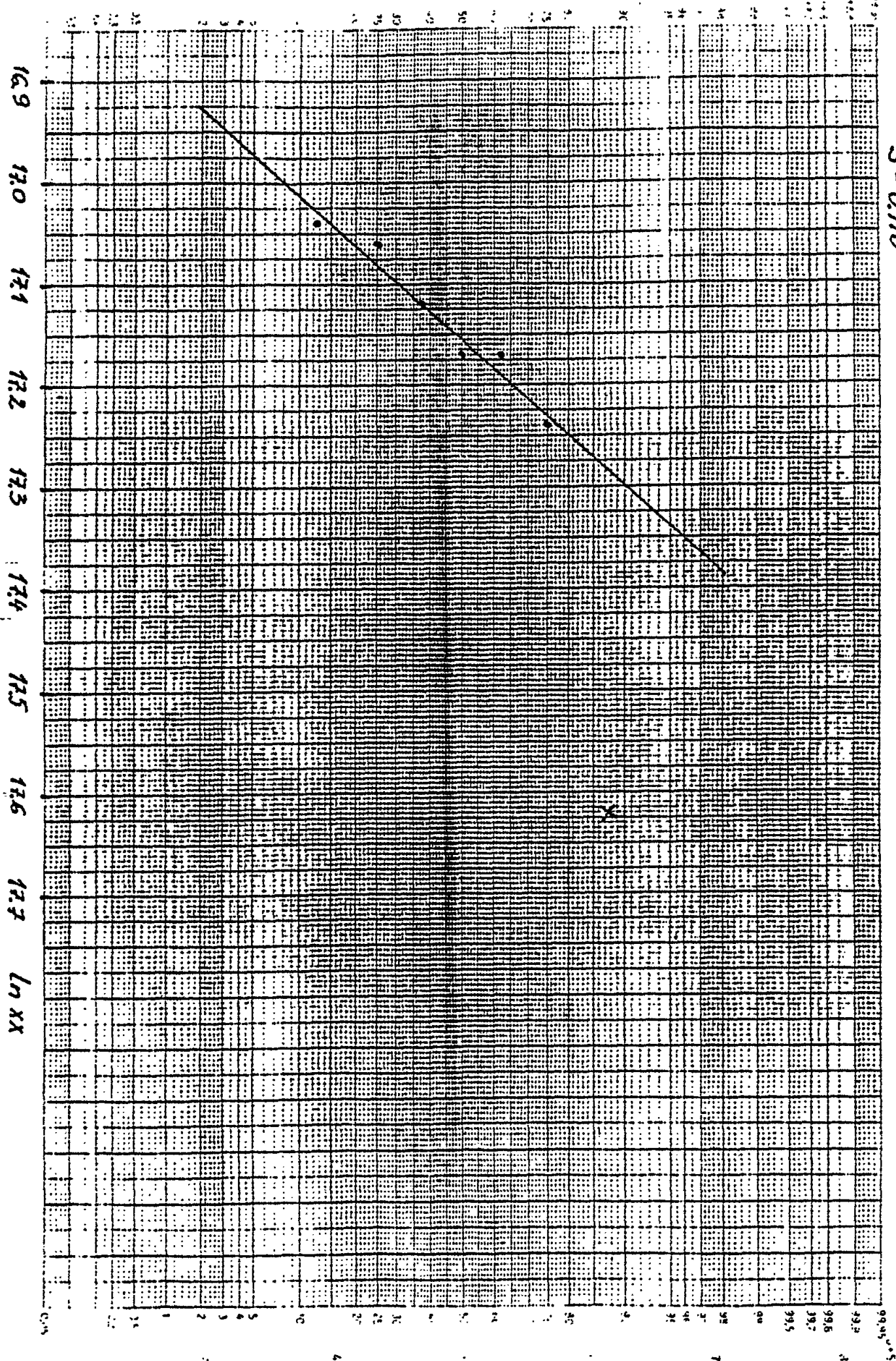


copy 10.1.10



FS 90 = 326 10⁵ FS/100 ml
S = 0.110

x points ignored



5.0 - 10.0 Gauss above 550 MHz mm

1000 MHz and 1000

Analyse statistique microbienne des échantillons d'eau côtière

Méthode : MF

Type d'échantillon d'eau : B

Groupe de travail	Concentration microbienne pour 100 ml		
	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	Streptocoques fécaux
1	156,10 ⁴	132,10 ⁴	283,10 ³
2	360,10 ⁴	330,10 ⁴	490,10 ³
3	438,10 ⁴	338,10 ⁴	460,10 ³
4	171,10 ⁵	127,10 ⁵	820,10 ³
5	154,10 ⁴	7,10 ⁴	640,10 ³
6	474,10 ⁴	456,10 ⁴	820,10 ³
7	342,10 ⁴	292,10 ⁴	560,10 ³
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
Milieu de culture (gélose)	m-Endo	m-FC	m- <u>Enterococcus</u>
Nombre d'échantillons identiques	7	7	7
Fourchette des concentrations de colonies pour 100 ml	154,10 ⁴ 171,10 ⁵	7,10 ⁴ 127,10 ⁵	283,10 ³ 820,10 ³
Concentration moyenne de colonies pour 100 ml	376,10 ⁴	311,10 ⁴	551,10 ³
Concentration moyenne, en logarithmes naturels	15,14	14,95	13,22
Ecart-type, en logarithmes naturels	0,33	0,85	0,44
Intervalle de confiance à 95% pour les concentrations microbiennes	194,10 ⁴ 727,10 ⁴	381,10 ³ 254,10 ⁵	238,10 ³ 242,10 ⁴
Intervalle de confiance à 95% des concentrations microbiennes moyennes	277,10 ⁴ 510,10 ⁴	141,10 ⁴ 682,10 ⁴	367,10 ³ 828,10 ³

$$TC_{50} = 376 \cdot 10 \quad TC_{100} \text{ ml}$$

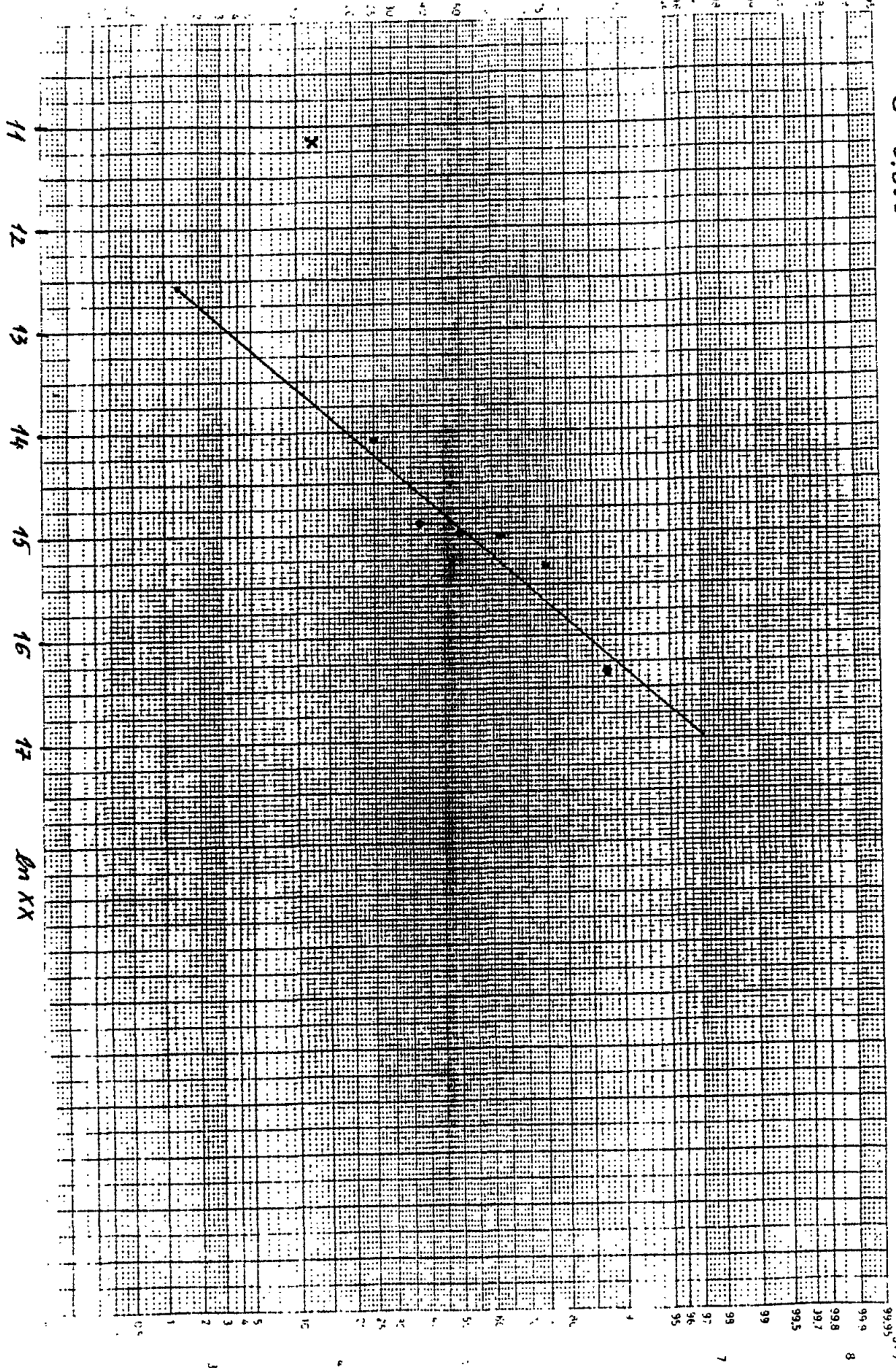
$$TC_{90} = 578 \cdot 10^4 \quad TC_{100} \text{ ml}$$
$$S = 0.33$$

x points' ignore



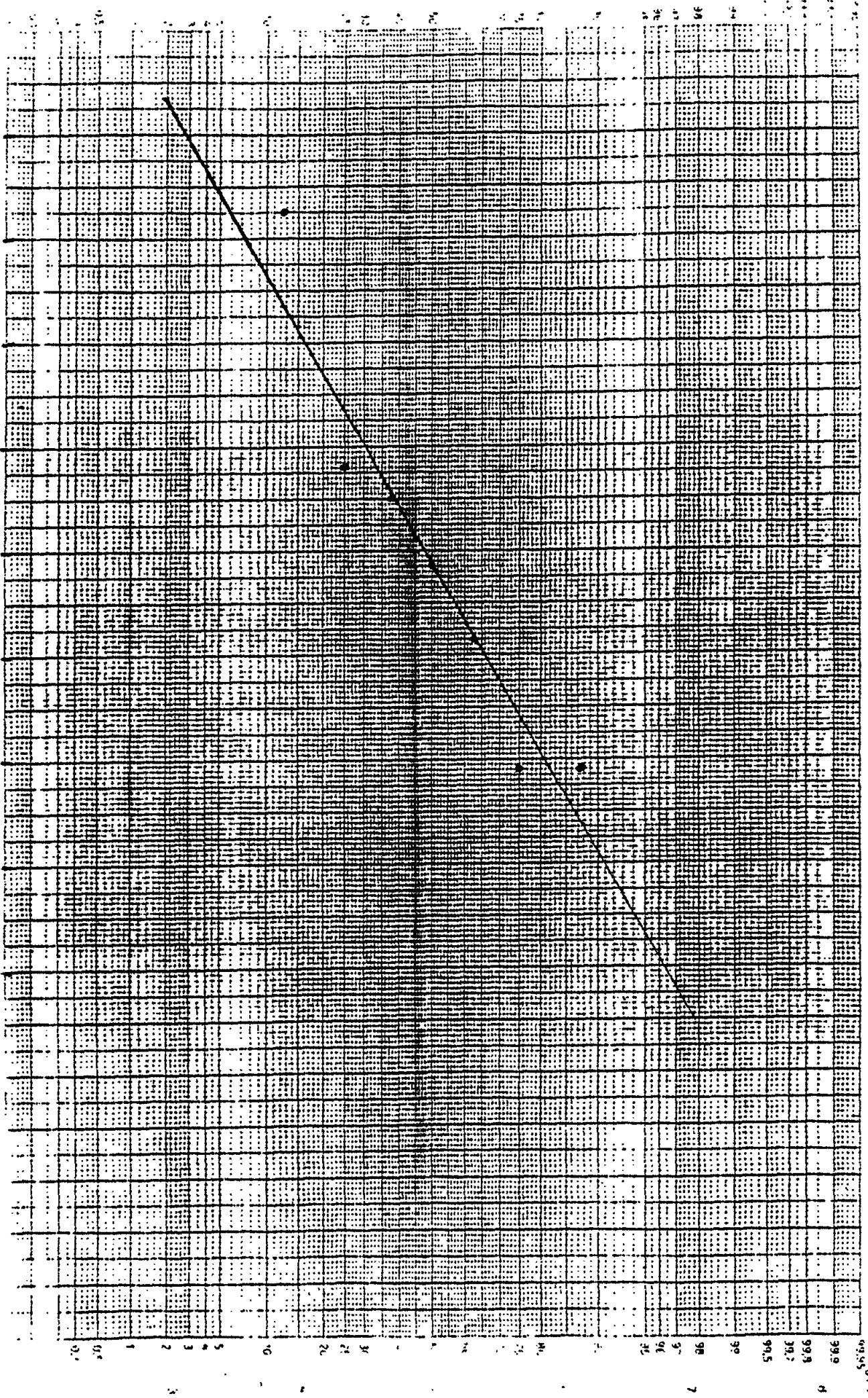
FC 50 = 311.10⁴ FC/100 ml
 FC 90 = 120.10⁵ FC/100 ml
 S = 0.850

x points ignores



FS90 = 965 · 10³ FS 100 ml
S = 0.44

12.4 12.6 12.8 13.0 13.2 13.4 13.6 13.8 14.0 $\ln xx$



Analyse statistique des teneurs microbiennes des échantillons d'eau côtière

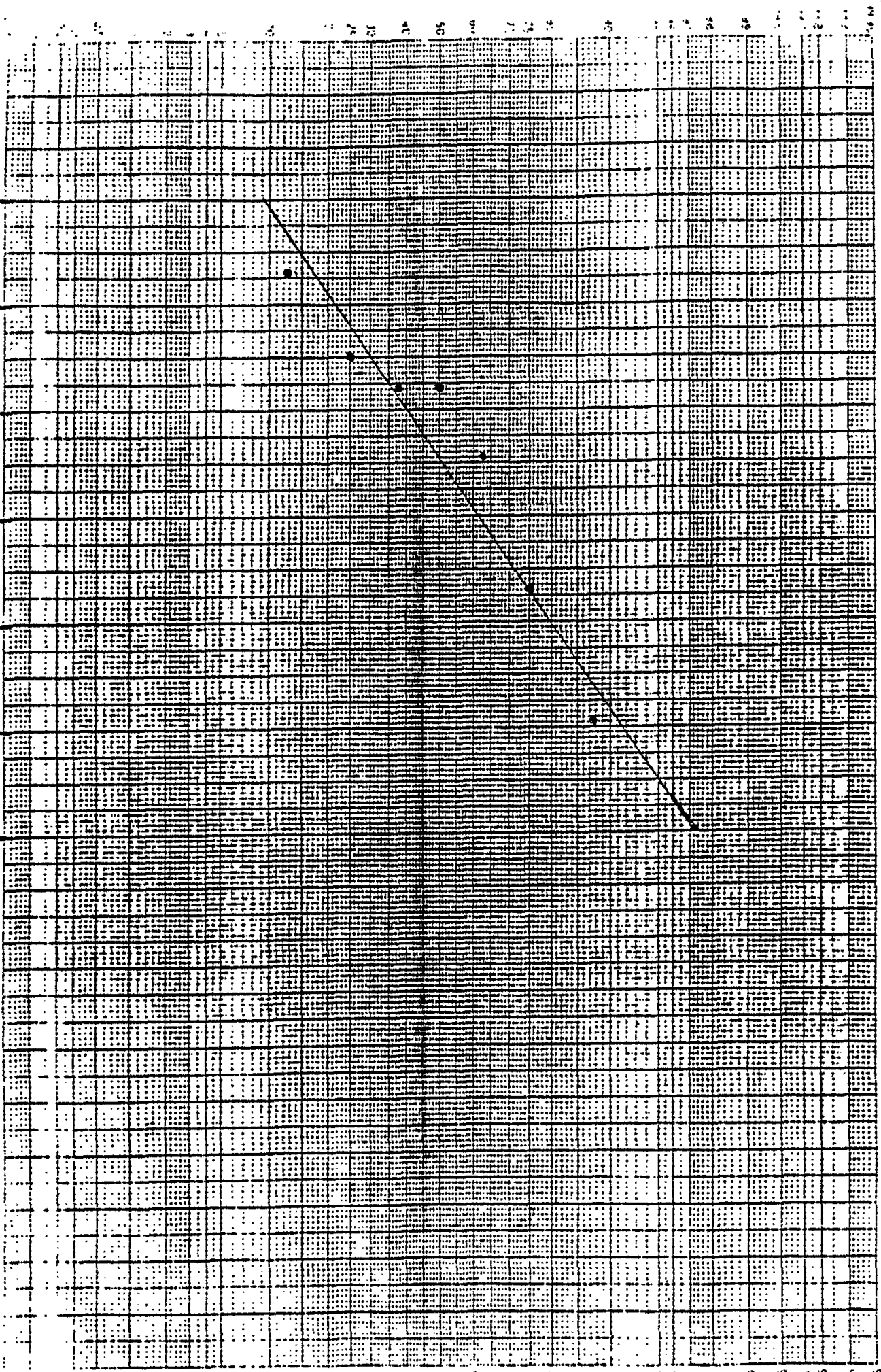
Méthode : MF

Type d'échantillon d'eau : C

Groupe de travail	Concentration microbienne pour 100 ml		
	Coliformes totaux	Coliformes fécaux	Streptocoques fécaux
1	5200	3200	2125
2	4900	3575	1600
3	7650	3300	2100
4	4200	3200	1340
5	9800	2500	1600
6	5200	2300	1800
7	5900	2400	2200
8	-	-	-
9	-	-	-
10	-	-	-
Milieu de culture (gélose)	m-Endo	m-FC	m- <u>Enterococcus</u>
Nombre d'échantillons identiques	7	7	7
Fourchette des concentrations de colonies pour 100 ml	4200 9800	2300 3575	1340 2200
Concentration moyenne de colonies pour 100 ml	5943	2922	1844
Concentration moyenne, en logarithmes naturels	8,69	7,98	7,52
Ecart-type, en logarithmes naturels	0,37	0,20	0,22
Intervalle de confiance à 95% pour les concentrations microbiennes	2864 12456	1998 4316	1189 2864
Intervalle de confiance à 95% des concentrations microbiennes moyennes	4220 8366	2428 3516	1505 2260

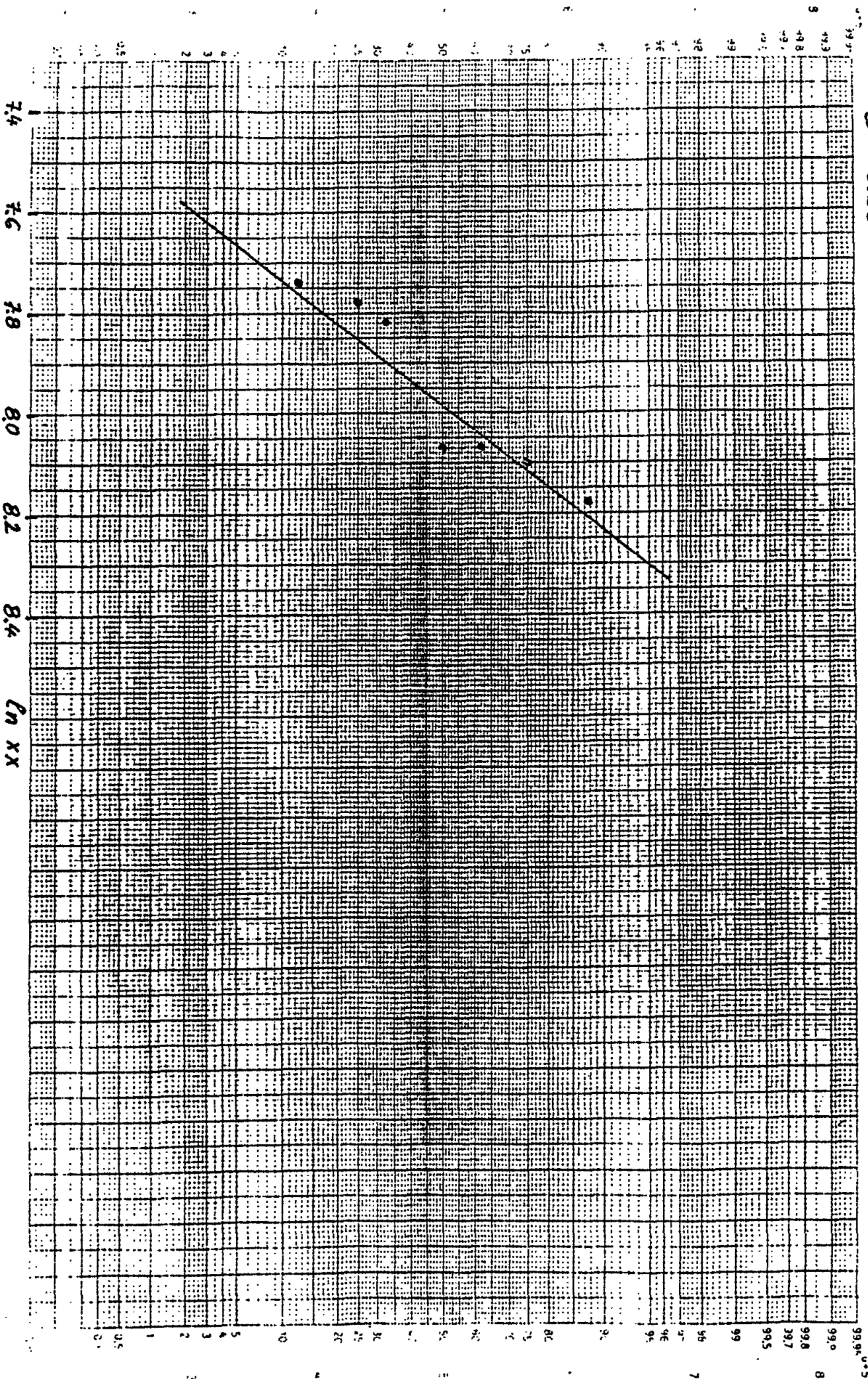
$TC_{90} = 9604 \text{ TC}/100\text{mI}$
 $S = 0.37$

8.2
8.4
8.6
8.8
9.0
9.2
9.4
 $\ln x$



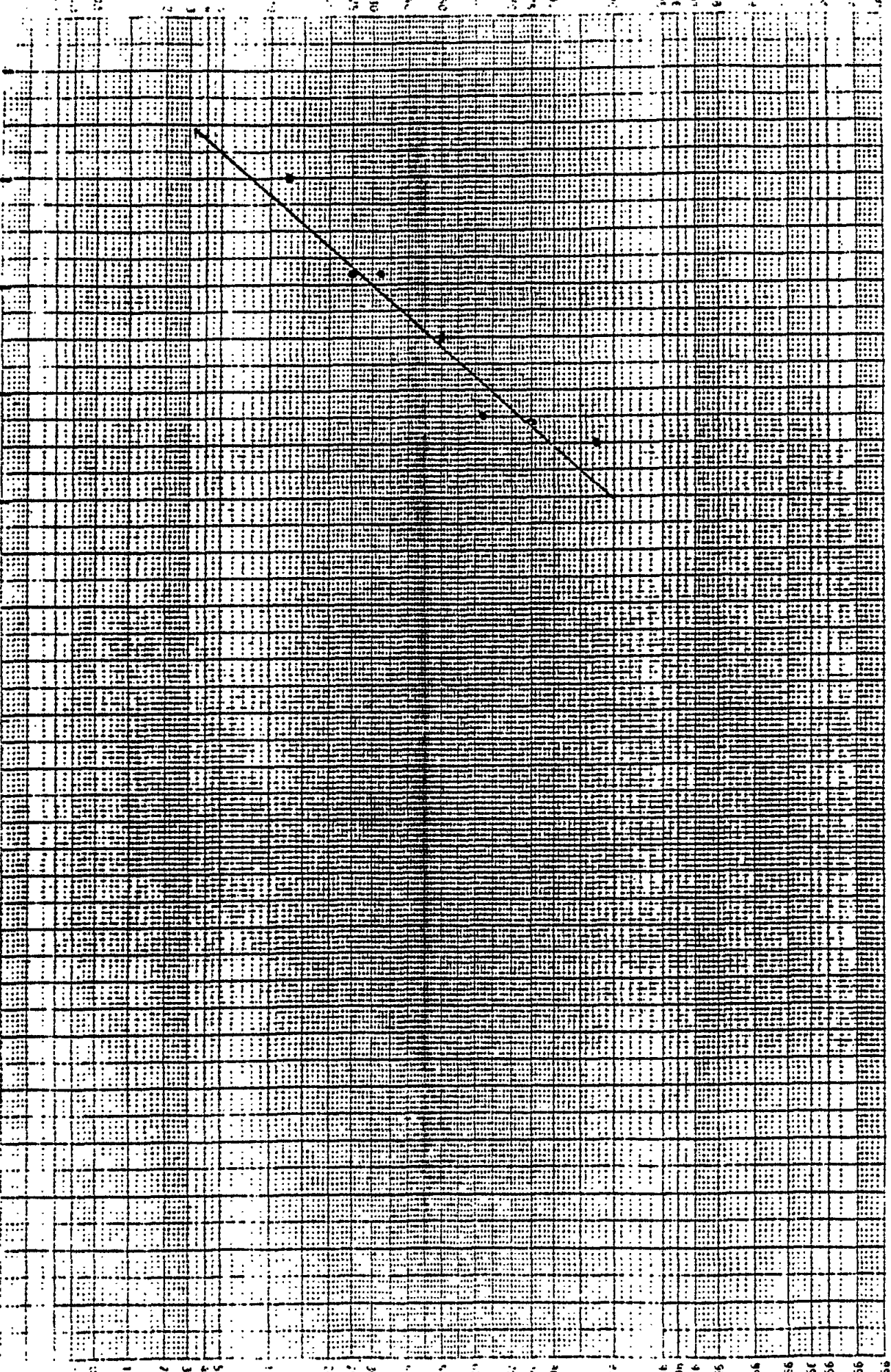
FC50 = 2922 FC/100 ml
FC90 = 3752 FC/100 ml
S = 0.20

FC50 2922 FC/100 ml



FS90 = 2440 FS/100 ml
S = 0.22

70
72
74
76
78
ln, xx



Annexe 2

E X E R C I C E D ' I N T E R E T A L O N N A G E

ET REUNION DE CONCERTATION SUR LES METHODES
MICROBIOLOGIQUES DE SURVEILLANCE
DE LA QUALITE DE L'EAU

PROJET MIXTE OMS/PNUE
MED POL - Phase II

Instructions aux participants

Institut d'océanographie et des pêches
Split, 15-20 avril 1985

EXERCICE D'INTERETALONNAGE

ET REUNION DE CONCERTATION SUR LES METHODES MICROBIOLOGIQUES DE SURVEILLANCE DE LA QUALITE DE L'EAU

PROJET MIXTE OMS/PNUE
MED POL - Phase II

1. Groupes de travail

Les participants seront répartis en huit groupes de deux personnes. Chacun des groupes sera identifié par un chiffre romain de I à VIII, respectivement.

Les participants porteront respectivement les numéros 1 et 2.

La composition de chacun des groupes doit demeurer invariable pendant toute la durée de l'exercice.

2. Echantillons

Chaque groupe de travail recevra des échantillons identiques de trois types d'eau et de crustacés ou de mollusques d'une zone déterminée, à savoir :

- échantillon A : eau fortement polluée;
- échantillon B : eau modérément polluée;
- échantillon C : eau légèrement polluée;
- échantillon D : crustacés ou mollusques d'une zone déterminée.

3. Méthodologie

eau de mer - coliformes totaux (MF)

- coliformes fécaux (MF et MPN)

- streptocoques fécaux (MF)

crustacés et mollusques - coliformes fécaux (MPN)

4. Matériel de laboratoire

Chaque groupe de travail recevra les objets suivants :

4.1. Tout le matériel nécessaire pour la filtration sur membrane :

- trois entonnoirs stériles;
- des boîtes de Petri d'un diamètre de 15 cm, avec jusqu'à cinq membranes;
- des flacons contenant 90 ml de solution tampon stérile permettant des dilutions successives par addition de 10 ml d'eau provenant de l'échantillon;
- des pipettes stériles (20 et 10 ml);
- des membranes filtrantes;

- des flacons pour rinçage avec solution tampon stérile;
- tout le matériel nécessaire aux analyses.

4.2. Tout le matériel nécessaire pour la méthode des dilutions en tubes multiples, à savoir :

- tubes avec milieu;
- pipettes stériles (1 et 10 ml);
- flacons avec réactif de Kovacs;
- pipettes Pasteur;
- tout le matériel nécessaire pour les analyses.

5. Préparation de séries de dilutions

Tous les transferts nécessaires pour préparer différentes dilutions à partir d'un échantillon d'eau déterminé devraient être opérés avec la même pipette.

Avant de prendre des aliquotes de l'échantillon initial ou des dilutions, il convient d'agiter vigoureusement pour s'assurer que l'on prélèvera des aliquotes représentatives.

Les dilutions devront être opérées en progressant d'un ordre de grandeur à la fois, par addition de 10 ml de l'échantillon d'eau à un flacon contenant 90 ml de solution tampon stérile. Le flacon devrait être immédiatement identifié par le type d'eau et le degré de dilution (exemple : A, 10^{-3}).

6. Identification des boîtes de Petri et des tubes

Il conviendrait de porter sur chaque boîte de Petri et tube les mentions ci-après :

- numéro du groupe (de I à VIII);
- numéro du participant (1 ou 2);
- numéro de l'échantillon et dilution (exemple : A, 20 ml, 10^{-1}).

7. Instructions relatives à la filtration

Pour les filtrations, il conviendrait de procéder en partant de la plus forte dilution, afin d'éviter la contamination par des échantillons contenant des nombres de bactéries plus élevés.

Il faudrait employer pour chaque échantillon une pipette différente.

Il convient, pour filtrer toutes les dilutions d'un échantillon déterminé, d'employer le même entonnoir.

8. Présentation des résultats.

Les résultats devraient être consignés sur les imprimés prévus à cet effet.

Imprimé 1. MF : coliformes totaux
coliformes fécaux
streptocoques fécaux

Imprimé 2. MPN : coliformes fécaux présents dans l'eau de mer

Imprimé 3. MPN : coliformes fécaux présents dans l'échantillon de crustacés ou de mollusques

On calculera les résultats en se reportant au tableau 1, (pour l'eau de mer) et au tableau 2, (pour l'échantillon de crustacés et de mollusques).

Pour tout renseignement complémentaire, se reporter à la publication :
UNEP/WHO Reference Methods for Marine Pollution Studies (qui vous a été fournie avec le matériel).

FORM 1^a

MEMBRANE FILTRATION METHOD

Working group No. _____

Date: _____ April 1985

Members of group : _____

Type of water sample : _____

Results of microbiological analyses

Quantity of water filtered ml	Dilution	Number of colonies per membrane		
		Total coliforms	Faecal coliforms	Faecal streptococci
50	1 : 1			
20	1 : 1			
5	1 : 1			
20	1 : 10			
5	1 : 10			
20	1 : 100			
5	1 : 100			
20	1 : 1000			
5	1 : 1000			

Microbial concentration,
in colonies per 100 ml

Comments:

^a Distribué aux participants en anglais seulement.

FORM 2^a

MULTIPLE TEST TUBE METHOD
FAECAL COLIFORMS

Working group No. _____

Date: _____ April 1985

Members of group : _____

Type of water sample : _____

Aliquots
transferred
ml

Faecal coliform test
number of positive reactions

	Lactose 36° C 24 ^h 48 ^h	MacConkey 44,5° C 24 ^h 48 ^h	Indole test 44,5° C 24 ^h 48 ^h
10	_____	_____	_____
1	_____	_____	_____
0,1	_____	_____	_____
0,01	_____	_____	_____
0,001	_____	_____	_____

Test results (see table 1)

_____ MPN in MacConkey broth and parallel test for indole
_____ faecal coliforms/100 ml of sea-water
_____ 95% confidence limits

Comments:

^a Distribué aux participants en anglais seulement.

FORM 3^a

SHELLFISH

MULTIPLE TEST TUBE METHOD
FAECAL COLIFORMS

Working group No. _____

Date: _____ April 1985

Members of group : _____

Aliquots
transferred
ml

Faecal coliform test
number of positive reactions

	Lactose 36° C 24 ^h 48 ^h	MacConkey 44,5° C 24 ^h 48 ^h	Indole test 44,5° C 24 ^h 48 ^h
10	_____	_____	_____
1	_____	_____	_____
0,1	_____	_____	_____
0,01	_____	_____	_____
0,001	_____	_____	_____

Test results (see table 2)

_____ MPN in MacConkey broth and parallel test for indole
_____ faecal coliforms/g shellfish flesh
_____ 95% confidence limits

Comments:

^a Distribué aux participants en anglais seulement.

Annexe 3

LISTE DES PARTICIPANTS

CONSEILLERS TEMPORAIRES

- Mme Svjetlana Andreis
Institut de la santé publique, Zagreb (Yougoslavie)
- M. Jean Belian
Conseil national de la recherche scientifique, Centre de recherches marines, Jounieh (Liban)
- Dr Abdul Fattah Boargob
Académie nationale de la recherche scientifique, Tripoli (République socialiste de la Jamahiriya arabe libyenne)
- Mme V. Buttignoni
Institut de protection sanitaire, Pula (Yougoslavie)
- M. B. Cihangir
Université Dokuz Eylul, Institut des sciences et de la technologie marines, Izmir (Turquie)
- Mme Fatma Gungor
Université Dokuz Eylul, Institut des sciences et de la technologie marines, Izmir (Turquie)
- Dr D. Hrsak
Institut Rudjer Boskovic, Centre de recherche marine, Zagreb (Yougoslavie)
- Dr N. Krstulovic
Institut d'océanographie et des pêches, Split (Yougoslavie)
- Mme R. Marusic
Faculté du génie civil, Université de Zagreb, Zagreb (Yougoslavie)
- M. G. Papageorgiou
Laboratoire général de l'Etat, Nicosie (Chypre)
- Dr N. Platzner
Ministère de la santé, Service de santé publique de la circonscription de Beer-Sheeva (Israël)
- Mme K. Margeta
Institut de la santé publique, Rijeka (Yougoslavie)
- M. M. Solic
Institut d'océanographie et des pêches, Split (Yougoslavie)
- Dr M. Stambuk
Institut de la santé publique, Split (Yougoslavie)

M. B. Stjepcevic
Institut de biologie marine, Kotòr (Yougoslavie)

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

Bureau régional de l'Europe

Dr L.J. Saliba^a

Spécialiste scientifique principal, Bureau du projet OMS/EURO, Unité de coordination du Plan d'action pour la Méditerranée, Athènes (Grèce)

^a Représentant aussi l'unité PNUE MED, Athènes.