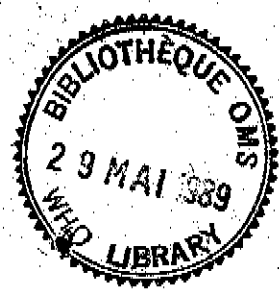


ICP/CEH 001/m07

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

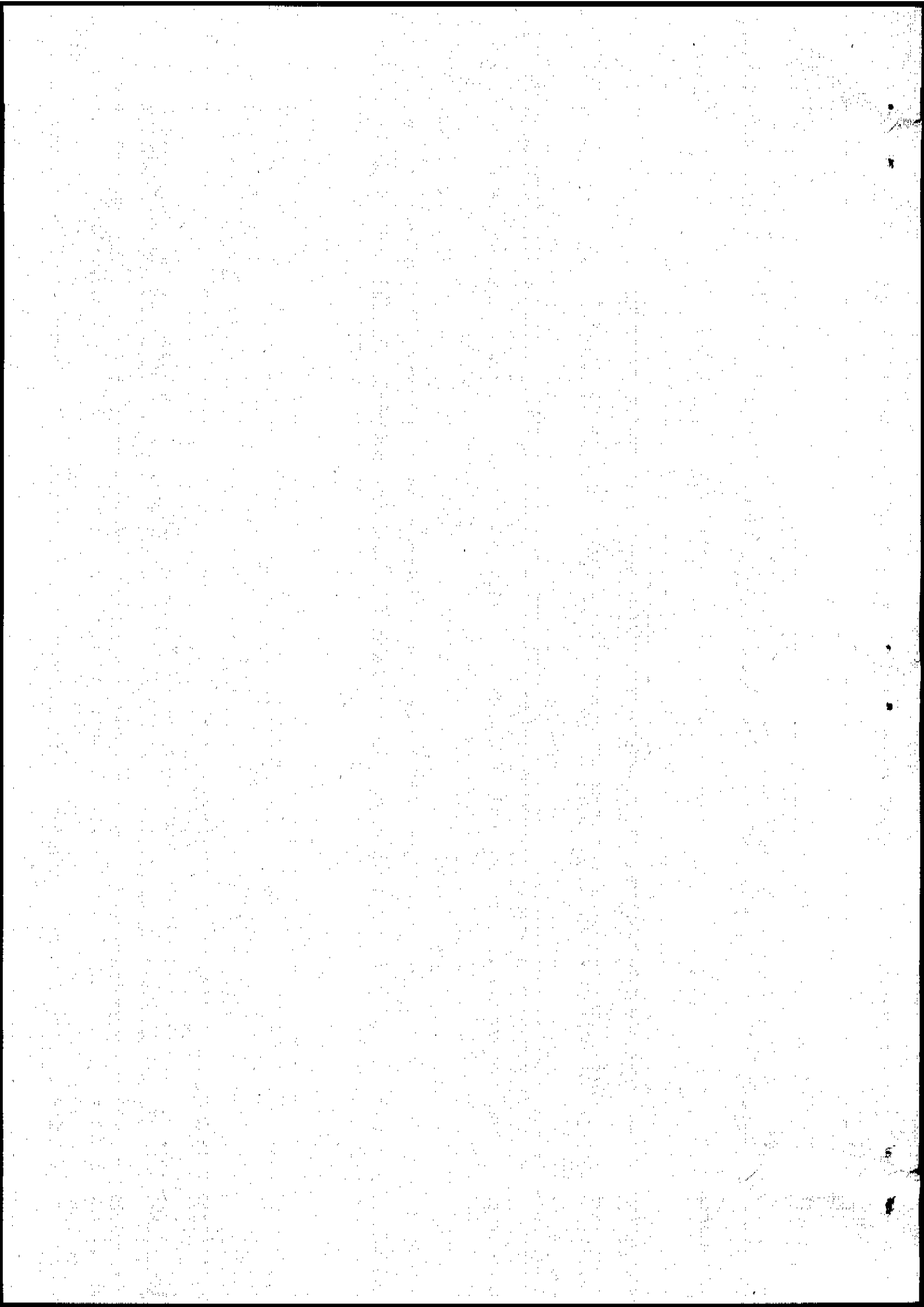
Cinquième rapport



Publié sous la double égide du Programme
des Nations Unies pour l'environnement et de
l'Organisation mondiale de la santé



ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
Bureau régional de l'Europe
Copenhague, 1986



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

Cinquième rapport sur une réunion mixte OMS/PNUE

Marseille
18-23 novembre 1985



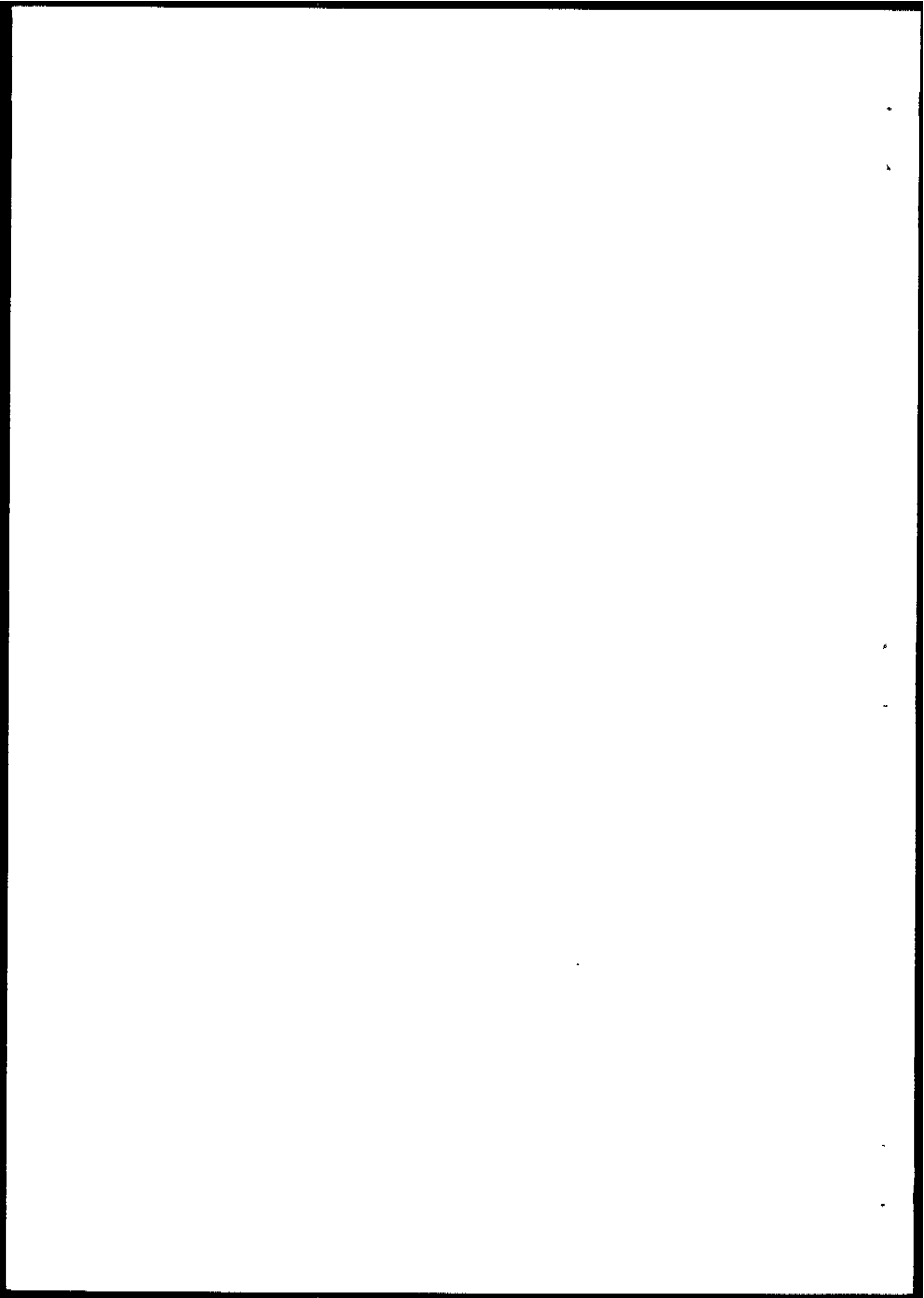
ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE
Bureau régional de l'Europe
Copenhague, 1986

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>
Avant-propos	1
1. Ouverture de la réunion	2
2. Thème et objet de la réunion	4
3. Election du bureau	4
4. Adoption de l'ordre du jour	4
5. Organisation de la réunion et de l'exercice en laboratoire	5
6. Etude du projet révisé de directives sur la surveillance continue des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques	5
7. Examen critique des projets de méthodes de référence pour la détermination des coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux dans l'eau de mer, par la méthode MPN (NPP)	6
8. Examen critique des résultats de l'exercice de laboratoire	6
9. Action future et recommandations	7
Annexe 1 : Résultats de l'exercice d'interétalonnage	8
Annexe 2 : Méthodes microbiologiques destinées à la surveillance de la qualité des eaux côtières	17
Annexe 3 : Liste des participants	24



AVANT-PROPOS

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.

A l'origine, 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 - Phase I), réalisée entre 1976 et 1981, visait à acquérir des informations de base sur l'état de la pollution marine dans la région et à constituer le cadre d'un système de surveillance de cette nature. Au cours de cette phase, des activités ont été entreprises par l'Organisation mondiale de la santé (OMS), en collaboration avec le programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE), en vue d'établir des méthodes normalisées d'échantillonnage et d'analyse bactériologique. Ces méthodes ont été essentiellement élaborées grâce à un projet pilote sur la surveillance de la qualité des eaux côtières de la Méditerranée (MED POL VII), réalisé entre 1976 et 1981 et coordonné conjointement par l'OMS et le PNUE. Ce projet pilote visait essentiellement à l'étude des paramètres bactériologiques et connexes en vue de la surveillance continue de la zone côtière à usage récréatif, des zones d'élevage de crustacés et de mollusques et de ses espèces marines. Pendant l'exécution de ce projet, on a cherché à se doter de méthodes normalisées; cela s'est toutefois révélé difficile dans la mesure où les laboratoires méditerranéens étaient habitués de longue date à des méthodes différentes de détermination des principaux paramètres microbiologiques.

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. Dans les autres pays, on met la dernière main aux programmes à cette fin, pour présentation et exécution.

Aux fins de la comparaison des résultats fournis par les divers laboratoires et en vue de leur synthèse en un panorama régional d'ensemble, l'élaboration d'une série exhaustive de méthodes de référence a été entreprise par le programme du PNUE pour les mers régionales, en collaboration avec les institutions spécialisées intéressées des Nations Unies. Dans ce cadre, l'OMS et le PNUE ont à ce jour élaboré conjointement des méthodes de référence pour l'échantillonnage et l'analyse des principaux organismes indicateurs bactériens présents dans l'eau de mer et les bivalves, y compris, le cas échéant, les méthodes de culture pour filtration sur membranes (MF) et de dosage par dilution en tubes multiples (méthode NPP - nombre le plus probable). Les laboratoires nationaux participant au programme MED POL se servent de ces méthodes de référence normalisées, qui font l'objet de révisions et de mises à jour régulières.

Pour permettre 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 à 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), le troisième, à l'Institut Pasteur, à Tunis (12-16 novembre 1984) et le quatrième à l'Institut d'océanographie et des pêches de Split (15-20 avril 1985).

Le présent exercice d'interétalonnage et la réunion de consultation (le cinquième et dernier de cette série) était organisé par l'OMS et le PNUE, en collaboration avec le laboratoire départemental de santé publique de Marseille (France), dans le cadre de MED POL - Phase II. Comme pour les exercices précédents, son principal objet était de permettre aux participants de procéder à des titrages de paramètres bactériens dans des échantillons d'eau de mer, de crustacés et de mollusques identiques, selon les méthodes de référence normalisées élaborées par le PNUE/OMS.

La réunion de consultation se proposait les objectifs ci-après :

- examen des résultats de l'exercice, afin de définir les problèmes techniques de méthodologie et de contrôle de la qualité;
- nouvel examen des projets de méthodes de référence pour le dosage des coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux dans l'eau de mer, par la technique des dilutions en tubes multiples (NPP);
- nouvel examen des projets de directives révisées sur la surveillance continue des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage des crustacés et des mollusques;
- formulation de recommandations sur les aspects pertinents du programme à long terme de surveillance continue et de recherche.

Des représentants des institutions françaises 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 en Algérie, en Egypte, en Espagne, en Grèce, en Israël, en Italie, à Malte, au Maroc, en Tunisie et en Yougoslavie, participant au même programme. En outre, les organisations internationales suivantes avaient été invitées à se faire représenter : Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO), Commission océanographique intergouvernementale (COI), Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture (Unesco), Organisation météorologique mondiale (OMM) et Agence internationale de l'énergie atomique (AIEA).

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

La réunion était organisée à la faculté de médecine de l'Université de Marseille du 12 au 23 novembre 1985. Y ont participé seize conseillers temporaires venus de France et neuf, 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 conjointement représentés par un seul fonctionnaire. 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. Il évoque dans leurs grandes lignes les composantes du Plan d'action pour la Méditerranée, dans le cadre duquel cette activité a été organisée, et rappelle le profond attachement de l'OMS au Plan d'action pour la Méditerranée. Il souligne l'importance que revêt la surveillance régulière des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques, compte tenu des risques pour la santé liés à la baignade dans des eaux polluées ou à la consommation de fruits de mer contaminés. L'orateur souligne que la série en cours d'exercices d'interétalonnage constitue une activité scientifique visant à assurer la comparabilité des méthodes et des résultats et à favoriser les contacts professionnels entre scientifiques participant au programme MED POL. Il exprime la gratitude de l'OMS pour les efforts consentis par le Laboratoire départemental de santé publique pour organiser la réunion et pour les locaux fournis par la Faculté de médecine, enfin pour la collaboration assidue du coordonnateur national français de MED POL.

Le Dr P. Giraud, représentant le doyen de la Faculté de médecine de Marseille, souhaite la bienvenue aux participants au nom de la Faculté. Il est heureux que cet exercice ait lieu dans son institution, son thème étant dans le droit fil des travaux de la Faculté de médecine. A cet égard, la Faculté se félicite de pouvoir collaborer avec l'OMS et espère que la coopération en cours pourra être renforcée.

M. J. Cornibert accueille les participants au nom de la Préfecture des Bouches-du-Rhône. Il est heureux que l'OMS ait choisi Marseille pour y organiser cet exercice. La cité phocéenne est en effet la quatrième ville du bassin méditerranéen sur le plan de l'importance, et la vie même de la cité est axée autour de la mer. Il n'est donc pas surprenant que le grand public se préoccupe de la lutte contre la pollution marine, et un certain nombre d'usines de traitement ont été construites ces dernières années. M. Cornibert rappelle que d'importants efforts de la part de tous les gouvernements sont exigés dans les domaines de la santé et de l'environnement pour améliorer l'état de santé dans le bassin méditerranéen.

M. E. Weygand, président du Conseil général, s'adresse lui aussi aux participants, rappelant que le problème de la pollution de la Méditerranée n'est pas nouveau. Par contre, l'initiative politique est assez récente; auparavant, la mer Méditerranée était considérée comme un dépotoir susceptible d'absorber toutes les matières chimiques et bactériologiques qui y étaient rejetées. Il tient à exprimer sa satisfaction de ce que le laboratoire départemental de santé publique ait été choisi pour le présent exercice. L'orateur mentionne encore les efforts en cours pour accroître le nombre d'usines de traitement et souligne l'importance de la coopération internationale pour épurer le bassin méditerranéen. Les réunions et exercices de ce type constituent la base nécessaire pour permettre aux autorités nationales d'élaborer et d'exécuter les mesures de contrôle qui s'imposent. Il souhaite aux participants un exercice fructueux débouchant sur des résultats concrets.

M. P. Balland, coordonnateur national de MED POL, souligne l'importance de la coopération du système des Nations Unies au Plan d'action pour la Méditerranée. Il se réfère aux Critères d'hygiène de l'environnement pour les eaux côtières à usage récréatif que les Etats méditerranéens ont récemment adoptés à titre transitoire. Le bassin méditerranéen se caractérise par une variété de systèmes culturels et de groupes ethniques; il n'en est pas moins possible de s'entendre sur une méthodologie commune, tout à fait indispensable. Le présent exercice se propose cela comme son principal objectif et l'accent doit être mis sur des méthodes d'évaluation qui doivent être précises. L'orateur attend avec intérêt le rapport sur les résultats de l'ensemble de la série d'exercices d'interétalonnage sur les méthodes microbiologiques, dont la présente activité constitue le cinquième et dernier. Les effets sur la santé de la pollution des eaux représentent eux aussi un problème d'importance. Au nom du Ministère français de l'environnement, M. Balland souhaite que le présent exercice soit couronné de succès.

Mme le Dr Bernadette Carcassonne, directrice du Laboratoire départemental de santé publique, remercie toutes les institutions qui avec elle ont participé à l'organisation du présent exercice et en particulier la Faculté de médecine et l'Université d'Aix. Après avoir brièvement évoqué les programmes nationaux français dans le domaine de la surveillance bactériologique des eaux côtières et des organismes marins et fait référence aux exercices précédents de la série qui visaient à permettre aux participants de différents pays de comparer leurs méthodes et leurs résultats, elle exprime l'espoir que le présent exercice sera aussi riche d'enseignement que les précédents.

2. Thème et objet de la réunion (point 2 de l'ordre du jour)

Le Dr L.J. Saliba expose le thème et la portée de l'exercice et de la réunion de consultation. Il est capital, au cours de l'exercice de laboratoire, que tous les participants suivent les instructions de l'institution hôte et appliquent les méthodes de référence pertinentes. Chaque participant a sans doute ses préférences et des méthodes qui lui sont propres, mais l'objet de l'exercice étant de déterminer la comparabilité des résultats obtenus, il importe essentiellement de suivre une seule et même méthodologie. L'orateur explique encore que les participants seront appelés à réviser les projets de méthode 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. Toutes ces méthodes sont désormais disponibles en anglais et en français.

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

Mme le Dr Bernadette Carcassonne est portée à la présidence, le Dr R. Mujeriego, à la vice-présidence, Mmes le Dr Yona Yoshpe-Purer et le Dr Françoise Sinigre sont élues co-rapporteurs. 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)

Mme le Dr Bernadette Carcassonne expose le programme de travaux pratiques et décrit les procédures applicables. Des instructions détaillées sur les procédures de laboratoire sont à la disposition des participants, ainsi qu'un programme et un calendrier. Les méthodes de référence normalisées devront être employées pour les procédures plus détaillées. La présidente évoque aussi les imprimés fournis aux participants, sur la base desquels les résultats de l'exercice complet feront l'objet d'une analyse statistique. Les participants adoptent le programme provisoire. On trouvera les instructions détaillées aux participants en Annexe 2.

6. Etude du projet révisé de directives sur la surveillance continue des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques (point 6 de l'ordre du jour)

Les participants examinent le projet révisé de méthodes de référence PNUE/OMS No 1 : directive pour la surveillance continue des eaux côtières à usage récréatif et des zones d'élevage de crustacés et de mollusques (document ICP/CEH 001 m07/6) avant sa publication officielle, en anglais et en français, dans la série des méthodes de référence. Il a été décidé de tenir compte, dans la version finale, notamment des points ci-après :

- la définition des eaux côtières à usage récréatif devrait couvrir aussi le sable des plages;
- les indicateurs de qualité de l'eau à visée sanitaire devraient être fondés sur des études épidémiologiques;
- en prévision de programmes de surveillance continue, les cartes et relevés topographiques utilisés devraient être les plus récents, et il conviendrait d'indiquer la date à laquelle ces cartes ou relevés ont été établis lorsqu'on la connaît;
- pendant la saison des baignades, il conviendrait, outre les prélèvements normaux à intervalles bimensuels, de procéder après chaque chute de pluie importante à des prélèvements sur les plages, au voisinage des points de déversement;
- en matière de surveillance des plages à usage récréatif - c'est-à-dire de la partie située au-dessus de la ligne d'affleurement de l'eau - il faudrait recommander l'examen microbiologique du sable, de préférence en vue de la surveillance continue des mêmes organismes que dans l'eau de mer, et déterminer la présence de champignons. Il conviendrait de procéder aux observations et mesures relatives aux plages au moment précis des prélèvements d'eau de mer dans la zone considérée;
- la classification de McKay et Garber, relative à la surveillance des plages, devrait être à la base d'une version modifiée, distinguant des paramètres obligatoires et facultatifs, et les méduses devraient être classées parmi ces derniers;
- aux fins de la surveillance élargie des zones à usage récréatif ou affectées à l'élevage des crustacés et des mollusques, les biotoxines revêtent un intérêt considérable en tant que paramètres de surveillance;

- il faudrait continuer de doser la présence de Staphylococcus aureus aux fins de la surveillance élargie. En outre, selon des indications récentes, il semblerait que les staphylocoques totaux pourraient constituer un bon indicateur de pollution, encore que cela doive être vérifié par des recherches plus approfondies;
- l'utilisation de Clostridium perfringens en tant qu'organisme de surveillance continue est encore à l'étude. On peut en tirer une indication de la contamination virale en raison de sa plus grande résistance par rapport à d'autres organismes indicateurs, néanmoins, il est malaisé de le détecter dans l'eau de mer;
- on peut se servir, aux fins de l'échantillonnage des sédiments pour analyse microbiologique d'un matériel plus simple que les dispositifs d'échantillonnage de fond de Van Donsel-Geldreich et les carotteurs triples d'Albrechtsen. Des descriptions de ce matériel pourraient être fournies.

7. Examen critique des projets de méthodes de référence pour la détermination des coliformes totaux, coliformes fécaux et streptocoques fécaux dans l'eau de mer, par la méthode MPN (NPP) (point 7 de l'ordre du jour)

Les participants examinent les projets de méthodes de référence pour la détermination de a) les coliformes totaux dans l'eau de mer, selon la technique NPP (document ICP/CEH 001 m07/9), b) les coliformes fécaux dans l'eau de mer par la méthode NPP (document ICP/CEH 001 m07/10) et c) les streptocoques fécaux dans l'eau de mer par la méthode NPP (document ICP/CEH 001 m07/11). Aucun amendement spécifique n'a été proposé, mais il a été décidé que, lors des révisions ultérieures des documents, il conviendrait de donner davantage de détails sur les méthodes de comptage des colonies et sur les procédures d'évaluation des résultats. On a notamment fait remarquer que KF-agar n'est pas un milieu suffisamment sélectif pour le dosage des streptocoques fécaux et donne lieu à des faux positifs. M-Enterococcus agar est un meilleur milieu mais peut cependant entraîner des faux négatifs. Les participants ont décidé qu'il faudrait procéder à des études comparatives entre ces deux milieux.

8. Examen critique des résultats de l'exercice de laboratoire (point 8 de l'ordre du jour)

Les participants ont examiné les résultats de l'exercice d'inter-talonage (cf. Annexe 1). Les principaux problèmes concernent a) les disparités entre résultats obtenus par divers participants et b) les différences entre les résultats obtenus selon les méthodes NPP et de filtration sur membranes, respectivement. Ils ont jugé normal que les tests NPP donnent des comptages plus élevés que la méthode de filtration sur membranes. Les divergences peuvent cependant être imputables à des erreurs de comptage des colonies ou à l'élaboration de la moyenne des dénombrements individuels. Le comptage des colonies a été examiné. Selon l'un des participants, pour les coliformes fécaux chaque colonie bleue, y compris celles dont le centre est brun, devrait être comptée. De même, pour les streptocoques fécaux, il faudrait compter les colonies roses avec les rouges. Il est également apparu certaines disparités selon les participants dans le calcul de la moyenne entre le nombre de colonies sur deux membranes de réplification. La plupart des participants font la moyenne des deux dénombrements. D'autres ne prennent une moyenne simple que si la différence entre les deux est inférieure à 50%. En cas

contraire, ils inscrivent le chiffre le plus élevé ou le plus faible (selon que les conditions particulières exigent que l'on soit strict ou tolérant). Considérant les différentes méthodes d'interprétation et d'évaluation des résultats appliquées par les participants dans leur institution d'origine et compte tenu aussi de la difficulté relative de normaliser ces aspects pour en faire des méthodes officielles de référence, on a conclu que les résultats de l'exercice sont satisfaisants dans l'ensemble.

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

Les recommandations ci-après ont été formulées :

- Des exercices d'interétalonnage des paramètres microbiologiques devront être poursuivis dans le cadre du programme de surveillance MED POL. Cela pourrait être réalisé à l'échelon d'un ou plusieurs pays méditerranéens, afin que puisse être maintenu un niveau satisfaisant dans le contrôle de qualité et pour assurer l'obtention de résultats comparables.
- On devrait étudier la possibilité de faire préparer, par des laboratoires choisis dans les pays méditerranéens, des séries d'échantillons d'eau de mer identiques à partir d'un même prélèvement et de les distribuer à d'autres laboratoires. Cela permettrait de comparer les résultats obtenus dans les conditions de travail habituelles de chaque laboratoire.
- Des sessions de formation aux techniques microbiologiques ainsi qu'aux méthodes d'évaluation des résultats devraient être organisées dans la région méditerranéenne.
- Les méthodes de référence devraient être régulièrement mises à jour en fonction de l'évolution des techniques ainsi que des rapports issus des laboratoires participant au programme MED POL.
- De nouvelles méthodes de référence devront être établies pour la détermination d'autres paramètres (bactériologiques et mycologiques) choisis en fonction du milieu étudié : eau, sable, sédiments.

Annexe 1

RESULTATS DE L'EXERCICE D'INTERETALONNAGE
Marseille, 18-23 novembre 1985

Introduction

L'activité entreprise a pour objet de permettre aux participants de procéder au dosage des concentrations microbiennes dans les mêmes échantillons d'eau de mer et de bivalves par des méthodes uniformes, puis de comparer les résultats obtenus a) entre les divers participants pour chaque paramètre (coliformes fécaux et streptocoques fécaux) et b) entre les deux méthodes (de la filtration sur membranes et des dilutions en tubes multiples) employées pour les échantillons d'eau de mer.

Organisation et méthodes

Les participants travaillent individuellement. Chacun analyse deux échantillons d'eau de mer (échantillon I provenant d'une zone légèrement polluée et échantillon II, d'une zone modérément polluée) et un échantillon de bivalves.

Dans les échantillons d'eau de mer on recherche les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux par les méthodes des dilutions en tubes multiples (NPP) et des cultures pour filtration sur membranes; les échantillons de bivalves sont examinés pour le dosage des coliformes fécaux par la méthode NPP.

On a donné aux participants des instructions pour les travaux pratiques en laboratoire avec les détails voulus sur le matériel, les milieux de culture et les réactifs fournis et un plan de travail pour les différents dosages. Les participants ont suivi pour chaque dosage les méthodes spécifiées, dont la méthode de référence applicable pour chacun des paramètres.

Résultats

On trouvera aux tableaux 1 à 4 un relevé des dénombrements effectués par chaque participant sur les filtres à membranes, pour les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux présents dans chaque échantillon d'eau de mer. Le tableau 5 reproduit les calculs relatifs aux densités d'organismes, sur la base de ces comptages, ainsi qu'une analyse statistique. S'agissant du premier échantillon (eau de mer modérément polluée), les participants ont compté de 9 à 44 coliformes fécaux par 100 ml, avec une moyenne de 21 et un écart type de 8. Sur les 18 résultats, 13 se trouvaient dans la fourchette moyenne $\pm 1,0$ écart type. Les dénombrements relatifs aux streptocoques fécaux, pour 100 ml, allaient de 16 à 51, avec une moyenne de 26 et un écart type de 9. Sur les 18 résultats, 13 se plaçaient dans la fourchette moyenne $\pm 1,0$ écart type.

Pour le deuxième échantillon (eau de mer légèrement polluée), on a dénombré entre 2 à 26 coliformes fécaux pour 100 ml, avec une moyenne de 8 et un écart type de 6. Sur les 18 résultats, 13 se situaient dans la moyenne $\pm 1,0$ écart type. Les comptages de streptocoques fécaux variaient entre 14 et 106 pour 100 ml, avec une moyenne de 57 et un écart type de 22. Sur les 18 résultats, 14 se situaient dans la moyenne $\pm 1,0$ écart type.

Les résultats individuels du nombre le plus probable (MPN) pour les deux mêmes paramètres (coliformes fécaux et streptocoques fécaux), dans les deux mêmes échantillons d'eau de mer, sont reproduits au tableau 6, avec une analyse statistique. Pour l'échantillon modérément pollué, les nombres de coliformes fécaux variaient entre 17 et 70 pour 100 ml, avec une moyenne de 43 et un écart type de 18. Sur les 18 dénombrements, 12 étaient dans la moyenne $\pm 1,0$ écart type. Les estimations de streptocoques fécaux allaient de 4 à 23 pour 100 ml avec une moyenne de 11 et un écart type de 6. Sur les 18 estimations, 10 étaient dans la moyenne $\pm 1,0$ écart type.

Dans l'échantillon légèrement pollué, les coliformes fécaux variaient entre 2 et 22 pour 100 ml, avec une moyenne de 7 et un écart type de 5. Sur les 18 comptages, 15 étaient dans la moyenne $\pm 1,0$ écart type. On a trouvé de 6 à 130 streptocoques fécaux pour 100 ml, avec une moyenne de 31 et un écart type de 31. Sur 18 comptages, 15 se situaient dans la moyenne $\pm 1,0$ écart type.

Les résultats individuels pour les coliformes fécaux dans l'échantillon de bivalves figurent au tableau 7. Ils vont de 0,0 à 13,0 par gramme de chair, avec une moyenne de 1 et un écart type de 3,7. Sept dénombrements ont donné zéro. Sur les 11 autres, 10 se situaient dans la moyenne ± 1 écart type.

Conclusions

Du point de vue statistique, les résultats ne sont pas suffisamment significatifs bien que, dans chaque cas, ils aient été affectés par une ou deux lectures aberrantes. Il est évident que les disparités se situent essentiellement au niveau de l'interprétation des résultats obtenus (c'est-à-dire le dénombrement des colonies) et non pas dans les méthodes elles-mêmes.

La corrélation entre les deux méthodes (filtration sur membrane et NPP) dans l'analyse des échantillons d'eau de mer a été assez satisfaisante, compte tenu de toutes les variations et sources de disparités inhérentes à chacune des méthodes.

Tableau 1

RESULTATS MEMBRANES FILTRANTES

NOMBRE DE COLONIES - Echantillon 1

Coliformes fécaux

Vol. ml Participant	100	50	10	5	1	0,5
B05	0	6	1	1	0	0
B06	29	18	3	2	0	0
B07	22	14	0	0	0	0
B08	24	9	1	1	1	1
C09	25	14	2	0	0	0
C10	18	17	2	1	0	0
C11	16	8	0	0	0	0
C12	26	11	3	1	0	0
D13	44	7	3	1	0	1
D14	29	16	2	0	0	0
F21	12	7	2	0	0	0
F22	25	5	1	0	0	0
F23	9	7	4	2	0	0
F24	14	7	3	0	0	0
G25	30	22	5	0	0	0
G26	22	10	2	0	0	0
G27	15	12	8	1	0	0
G28	14	12	3	0	0	0
MOYENNE	22	11	2	1	1	1
ECART TYPE	8	5	2	1	0	0

Nombre de résultats compris entre la moyenne et n écarts-types (σ)

MOY. \pm 1 σ	14	12	13	6	1	2
MOY. \pm 1,5 σ	18	16	14	6	1	2
MOY. \pm 2 σ	16	17	15	8	1	2

Tableau 2

RESULTATS MEMBRANES FILTRANTES

NOMBRE DE COLONIES - Echantillon 1

Streptocoques fécaux

Vol. ml Participant	100	50	10	5	1	0,5
B05	36	19	5	1	0	0
B06	16	10	2	2	0	0
B07	21	7	1	1	0	0
B08	22	14	3	3	0	0
C09	51	9	5	1	0	2
C10	19	13	7	0	0	0
C11	42	12	6	2	0	5
C12	20	12	3	1	0	0
D13	16	13	2	4	1	0
D14	25	10	3	1	0	0
F21	29	9	3	2	0	0
F22	35	14	6	0	0	0
F23	28	15	3	2	0	0
F24	18	10	1	2	0	0
G25	19	16	4	3	1	1
G26	29	14	4	3	0	0
G27	24	11	2	2	0	0
G28	30	8	1	0	1	0
MOYENNE	26	12	3	2	1	2
ECART TYPE	9	3	2	1	0	2

Nombre de résultats compris entre la moyenne et n écarts-types (σ)

MOY. \pm 1 σ	13	11	10	6	3	2
MOY. \pm 1,5 σ	16	16	15	14	3	2
MOY. \pm 2 σ	17	17	17	14	3	3

Tableau 3

RESULTATS MEMBRANES FILTRANTES

NOMBRE DE COLONIES - Echantillon 2

Coliformes fécaux

Vol. ml Participant	100	50	10	5	1	0,5
B05	0	5	0	0	0	0
B06	0	13	1	0	0	0
B07	0	9	4	0	0	0
B08	0	4	1	0	0	0
C09	0	2	0	0	0	0
C10	0	3	1	1	0	0
C11	0	2	1	1	0	0
C12	0	3	1	0	0	0
D13	0	2	1	1	0	0
D14	0	3	2	0	0	0
F21	0	1	2	2	0	0
F22	0	1	1	0	0	0
F23	0	4	1	1	0	0
F24	0	3	1	1	0	0
G25	0	3	1	2	0	0
G26	0	8	0	1	1	0
G27	0	4	1	2	0	0
G28	0	5	2	1	0	0
MOYENNE	0	4	1	1	1	0
ECART TYPE	0	3	1	1	0	0

Nombre de résultats compris entre la moyenne et n écarts-types (σ)

MOY. \pm 1 σ	0	13	11	7	1	0
MOY. \pm 1,5 σ	0	16	14	7	1	0
MOY. \pm 2 σ	0	17	14	10	1	0

Tableau 4

RESULTATS MEMBRANES FILTRANTES

NOMBRE DE COLONIES - Echantillon 2

Streptocoques fécaux

Vol. ml Participant	100	50	10	5	1	0,5
B05	0	38	6	3	1	0
B06	0	31	4	1	0	0
B07	0	39	14	0	1	0
B08	0	7	4	4	2	0
C09	0	53	8	3	2	0
C10	0	19	8	2	0	0
C11	0	26	4	4	0	0
C12	0	28	12	2	0	0
D13	0	26	5	3	2	0
D14	0	27	13	4	0	1
F21	0	35	8	4	1	0
F22	0	29	6	3	3	0
F23	0	23	8	0	0	0
F24	0	45	8	8	1	0
G25	0	18	4	5	2	0
G26	0	28	6	3	1	1
G27	0	22	3	2	1	0
G28	0	29	3	1	2	0
MOYENNE	0	29	6	3	1	1
ECART TYPE	0	10	3	2	1	0

Nombre de résultats compris entre la moyenne et n écarts-types (σ)

MOY. \pm 1 σ	0	14	15	12	6	2
MOY. \pm 1,5 σ	0	15	15	15	11	2
MOY. \pm 2 σ	0	16	16	15	11	2

Tableau 5

RESULTATS MEMBRANES FILTRANTES

(100 ml d'eau côtière)

Identif. Participant	Echantillon 1		Echantillon 2	
	Coli. fécaux	Strepto. fécaux	Coli. fécaux	Strepto. fécaux
B05	12	36	10	76
B06	29	16	26	62
B07	22	21	18	78
B08	24	22	8	14
C09	25	51	4	106
C10	26	24	6	18
C11	16	42	4	52
C12	24	22	6	56
D13	44	16	4	52
D14	29	23	6	54
F21	12	29	2	70
F22	25	35	2	58
F23	9	28	8	46
F24	14	18	6	90
G25	30	19	6	36
G26	22	29	16	56
G27	15	24	8	44
G28	14	30	10	58
MOYENNE	21	26	8	57
ECART TYPE	8	9	6	22

Nombre de résultats compris entre la moyenne et n écarts-types (σ)

MOY. \pm 1 σ	13	13	13	14
MOY. \pm 1,5 σ	17	16	16	14
MOY. \pm 2 σ	17	17	17	17

Tableau 6

RESULTATS TESTS NPP

(100 ml d'eau côtière)

Identif. Participant	Echantillon 1		Echantillon 2	
	Coli. fécaux	Strepto. fécaux	Coli. fécaux	Strepto. fécaux
B05	50	7	8	17
B06	21	13	4	9
B07	50	9	17	17
B08	50	14	8	50
C09	17	8	4	11
C10	30	22	11	22
C11	30	4	4	11
C12	22	17	9	27
D13	30	12	4	70
D14	50	4	7	130
F21	30	23	8	17
F22	50	13	4	26
F23	80	4	6	17
F24	70	4	2	34
G25	50	4	7	6
G26	30	22	22	13
G27	70	9	7	17
G28	50	11	11	80
MOYENNE	43	11	7	31
ECART TYPE	18	6	5	31

Nombre de résultats compris entre la moyenne et n écarts-types (σ)

MOY. \pm 1 σ	12	10	15	18
MOY. \pm 1,5 σ	15	15	16	16
MOY. \pm 2 σ	17	18	16	17

Tableau 7

RESULTATS BIVALVES

(1 g de chair)

Identif. Participant	Coliformes fécaux
B05	13,0
B06	1,3
B07	0,0
B08	1,7
C09	0,0
C10	0,0
C11	0,8
C12	0,7
D13	0,2
D14	0,0
F21	0,0
F22	0,4
F23	0,2
F24	0,0
G25	0,4
G26	0,2
G27	0,8
G28	0,0
MOYENNE	1,0
ECART TYPE	3,7

Nombre de résultats compris entre la moyenne et n écarts-types (σ)

MOY. \pm 1 σ 10
MOY. \pm 1,5 σ 10
MOY. \pm 2 σ 10

Annexe 2METHODES MICROBIOLOGIQUES DESTINEES A LA SURVEILLANCE DE LA QUALITE
DES EAUX COTIERES

ORGANISATION DES TRAVAUX PRATIQUES

I Identification des participants

Chaque participant sera distingué par une lettre (identification de la paillasse) et deux chiffres (identification de la place). Cette désignation ne devra pas être modifiée pendant toute la durée de l'exercice.

II Echantillons

Chaque participant trouvera sur sa paillasse deux flacons vissés de 500 ml contenant deux échantillons d'eau côtière graduellement polluée :

- un échantillon "I" d'eau faiblement polluée
- un échantillon "II" d'eau moyennement polluée

Chaque participant trouvera également un échantillon de bivalves.

III Matériel de laboratoireMéthode de culture en tubes multiples

Chaque participant aura sur sa paillasse ou dans son tiroir le matériel suivant :

- 2 portoirs identiques de 15 tubes chacun : 5 tubes de bouillon A-1 double concentration et 10 tubes de bouillon A-1 simple concentration
- 2 portoirs identiques de 15 tubes chacun : 5 tubes de Rothe double concentration et 10 tubes de Rothe simple concentration.

Ces tubes serviront à l'analyse des 2 échantillons d'eau côtière I et II : détermination des NPP des coliformes fécaux (méthode directe) et streptocoques fécaux (phase présomptive).

- 1 portoir de 15 tubes : 5 tubes de bouillon lactosé double concentration et 10 tubes de bouillon lactosé simple concentration. Ces tubes serviront à la détermination du NPP des coliformes fécaux (phase présomptive) dans l'échantillon de bivalves.
- 5 pipettes stériles graduées de 10 ml
- 10 pipettes stériles graduées de 1 ml
- des pipettes de Pasteur pour les repiquages.

Le matériel constitué sera distribué en temps voulu et se présentera comme suit :

- tubes de bouillon lactosé au vert brillant,
 - tubes d'eau peptonée, réactif de Kovacs,
- pour la phase confirmative des coliformes fécaux dans l'échantillon de bivalves,

- tubes de milieu de Litsky pour la phase confirmative des streptocoques fécaux dans l'eau de mer, ainsi que de tubes d'eau peptonée pour une confirmation (facultative) des coliformes fécaux dans l'eau de mer.

Méthode de filtration sur membranes

- un équipement de filtration (pour 2 personnes) : trompe à eau, une unité de filtration (entonnoir, support de membrane), une fiole à vide;
- des membranes filtrantes, conditionnées séparément;
- des pipettes graduées (2 pipettes de 50 ml, 10 pipettes de 10 ml, 4 pipettes de 1 ml);
- 12 boîtes de Petri contenant de la gélose FC, pour la culture sur membrane filtrante des coliformes fécaux;
- 12 boîtes de Petri contenant de la gélose "Enterococcus agar" pour la culture sur membrane filtrante des streptocoques fécaux;
- 3 flacons de 90 ml chacun d'eau tamponnée à utiliser pour la préparation des dilutions décimales (10⁻¹, 10⁻²) des eaux à analyser;
- 3 flacons de 500 ml d'eau tamponnée à utiliser pour le rinçage entre chaque filtration.

IV Etiquetage

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

- son code d'identification (couple lettre-nombre)
- l'indication de l'échantillon I, II ou BI (bivalves)
- les volumes en ml d'eau filtrée non diluée (100, 50, 10, et 5 ml) ou le volume d'eau diluée (10 et 5 ml) en indiquant le degré de dilution : D1 pour (10⁻¹) et D2 pour (10⁻²).

V Répartition des manipulations

Lundi 18 novembre 1985 - 14h30 - 18 heures

Dénombrement des coliformes fécaux et streptocoques fécaux par la méthode de filtration sur membrane (MF) des échantillons I et II, selon le schéma suivant :

échantillon I : de la dilution la plus forte au volume le plus élevé, la filtration sera effectuée sur gélose FC, pour le dénombrement des coliformes fécaux, et sur gélose "Enterococcus agar", pour le dénombrement des streptocoques fécaux.

échantillon II : même procédure.

Mardi 19 novembre 1985 - 9 heures à midi

Détermination par les tests NPP des coliformes fécaux et streptocoques fécaux (phase présomptive) par la méthode de culture en tubes multiples sur les échantillons I et II.

- 14h30 à 18 heures

Détermination par les tests NPP des coliformes fécaux (phase présomptive) dans l'échantillon de bivalves.

Lecture des coliformes fécaux sur les membranes filtrantes, échantillons I et II.

Mercredi 20 novembre 1985 - 9 heures à midi

Lecture des coliformes fécaux échantillons I et II
Repiquages

- 14h30 à 18 heures

Lecture des streptocoques fécaux sur MF
Lecture des coliformes totaux (bivalves) et repiquages

Jeudi 21 novembre 1985 - 9 heures à midi

Lecture et repiquage des streptocoques fécaux en milieu liquide (NPP)
Lecture des tests de confirmation coliformes fécaux en milieu liquide (NPP)

- 14h30 à 18 heures

Lecture des résultats de la phase confirmative des NPP des coliformes fécaux dans les bivalves (par g de chair de bivalve)

Vendredi 22 novembre 1985 - 9 heures à midi

Lecture de la phase confirmative des NPP des streptocoques fécaux des échantillons I et II d'eau de mer. Fin des travaux pratiques. Inscription des résultats.

- après-midi libre

Formulaire 1

- RESULTATS MEMBRANES FILTRANTES -

Date:

Echantillon:

IDENTIFICATION DU PARTICIPANT:

Volume d'eau filtrée ml	Dilutions utilisées	NOMBRE DE COLONIES PAR MEMBRANE	
		Coliformes fécaux	Streptocoques fécaux
100	1		
50	1		
10	1		
5	1		
10	10^{-1}		
5	10^{-1}		
10	10^{-2}		
Concentration microbienne en colonies / 100 ml			

Formulaire 2

RESULTATS TEST NPP

COLIFORMES FECAUX

Date:

Echantillon:

IDENTIFICATION DU PARTICIPANT:

ETAPES	VOLUMES ml	10	10	10	10	1	1	1	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Test Direct (Bouillon A-1) 44°C																
Confirmation (indole/eau peptonée) 44°C																

Formule des cultures positives après le test direct:

NPP / 100 ml des coliformes fécaux:

Formulaire 3

RESULTATS TEST NPP

- streptocoques fécaux -

Date:

Echantillon:

IDENTIFICATION DU PARTICIPANT:

ETAPES	10	10	10	10	10	10	1	1	1	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Volumes ml																		
Phase présumptive (Milieu de Rothe)																		
Phase confirmative (Milieu de Litsky)																		

Formule des cultures positives:

NPP / 100 ml des streptocoques fécaux:

Formulaire 4

RESULTATS TEST NPP

Bivalves

Date: IDENTIFICATION DU PARTICIPANT:

ETAPES	Volumes ml	10	10	10	10	1	1	1	1	1	1	0,1	0,1	0,1	0,1
Phase présumptive (Bouillon lactosé) 37°C															
Phase confirmative (Bouillon vert brillant) 44°C															
Phase confirmative (indole / eau peptonée) 44°C															

Formule des cultures positives

NPP / 1g de chair des coliformes fécaux:

Annexe 3

LISTE DES PARTICIPANTS
CONSEILLERS TEMPORAIRES

- M. R. Ben Aissa
Institut Pasteur de Tunis
Tunis (Tunisie)
- Dr P. Bernard *
INSERM - Unité 40
Nice (France)
- Mme M.C. Bertrand *
Cellule de lutte contre les pollutions marines
Service maritime des Bouches-du-Rhône
Marseille (France)
- M. G. Bonhomme *
Laboratoire départemental de santé publique
Marseille (France)
- Mme S. Bourzeix *
Hôpital Salvator
Service du professeur de Micco
Marseille (France)
- Mme B. Carcassonne *
Directrice
Laboratoire départemental de santé publique
Marseille (France)
- M. El-Hadi Chamekh
Laboratoire d'hygiène municipal de la ville d'Alger
Alger (Algérie)
- Mme P. Chauvet *
Laboratoire départemental de santé publique
Marseille (France)
- M. V. Gauci
Département des travaux publics
Laboratoire de bactériologie
Usine d'épuration Sant Antnin
Marsasçala (Malte)
- Mme M.J. Gevaudan *
Hôpital Salvator
Service du professeur de Micco
Marseille (France)
- Mme A. Guetchidjian *
Laboratoire départemental de santé publique
Marseille (France)

- Mme Ch. Gulian *
Hôpital Salvator
Service du professeur de Micco
Marseille (France)
- Dr M.N. Loubaris
Institut national d'hygiène
Rabat (Maroc)
- Dr S. Mathonnet *
CERBOM, Ecotoxicologie
Nice (France)
- M. A. Medail *
Laboratoire municipal de Toulon
Toulon (France)
- Mme C. Meynard *
2 Trav. Régny
Marseille (France)
- M. P. Mola *
Laboratoire municipal de chimie et bactériologie
Marseille (France)
- Professeur R. Mujeriego
Escuela Técnica Superior D'Enginyers de Camins
Canals i Ports
Universita Politecnica de Barcelona
Barcelone (Espagne)
- Mme S. Rousseau *
Directeur adjoint
Laboratoire départemental de santé publique
Marseille (France)
- Dr Afaf Mohamed Saleh
Bactériologie des eaux, laboratoires centraux
Ministère de la santé
Le Caire (Égypte)
- Mme M. Santoni *
Laboratoire départemental de santé publique
Marseille (France)
- Mme F. Sinigre *
Institut Bouisson Bertrand
Montpellier (France)
- Dr S. Sobot
Département de la planification et de la protection de l'environnement
Comité de la construction, du logement, des travaux publics et de la
protection de l'environnement de la République socialiste de Croatie
Zagreb (Yougoslavie)

Mme D. Spala

Projet de lutte contre la pollution de l'environnement
Athènes (Grèce)

Mme le Dr Y. Yoshpe-Purer

Laboratoire de santé publique A. Felix
Tel-Aviv (Israël)

ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE

Bureau régional de l'Europe

Dr L.J. Saliba **

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

* Non pris en charge par l'OMS

** Représentant aussi l'unité PNUE MED, Athènes