

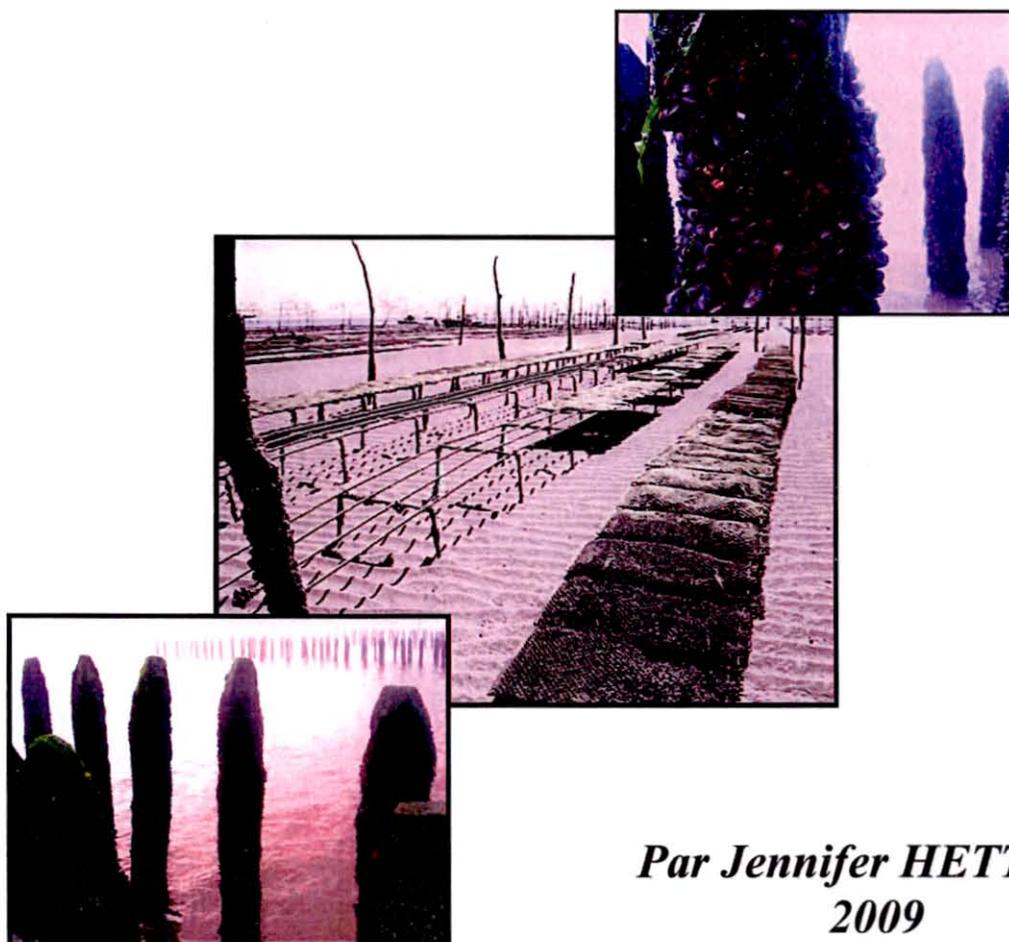


Institut Universitaire de Technologie
de La Rochelle
Département de Génie Biologie
15 rue François de Vaux de Foletier
17026 La Rochelle cedex 1

ifremer

Ifremer
Laboratoire LER/PC
De Ronce les Bains
17390 Mus de Loup

Contrôle de l'étalonnage de la méthode de dénombrement des Escherichia coli présumés par impédancemétrie



*Par Jennifer HETTICH
2009*

Institut Universitaire de Technologie
de La Rochelle
Département de Génie Biologie
15 rue François de Vaux de Foletier
17026 La Rochelle cedex 1

Ifremer
Laboratoire LER/PC
De Ronce les Bains
17390 Mus de Loup

*Contrôle de l'étalonnage de la méthode de
dénombrement des Escherichia coli présumés
par impédancemétrie*

**Stage de fin d'étude validant un
Diplôme Universitaire de Technologie en Génie Biologique
option industrie Alimentaire et Biologique
par Jennifer HETTICH
Avril-Juin 2009**

**Maîtres de stage : Monsieur Jean-Côme Piquet et Mademoiselle
Cyrielle Montaubin
Tuteur pédagogique : Monsieur Jean-Pierre Ingremeaud**

Remerciement

Je tiens tout d'abord à remercier Mr Jean Côme Piquet et Mlle Cyrielle Montaubin responsable technique microbiologique et responsable technique suppléant, mes maîtres de stage, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire de microbiologie de l'Ifremer de La Tremblade ainsi que pour tous les conseils apportés tout au long de ce stage sur la façon de travailler au laboratoire. Tout comme je remercie les conseils de Mme Mathilde Noyer, Technicienne analyste microbiologique. Et Olivier Courtois, responsable assurance qualité.

Je tiens également à remercier Mr Jean Prou, chef de la station et chef du laboratoire environnement ressources des pertuis charentais (LER/PC) de m'avoir ouvert les portes de son établissement.

Je remercie plus généralement la totalité des personnes qui travaille à l'Ifremer de La Tremblade, ainsi que l'ensemble des stagiaire qui ont contribué au bon déroulement de ce stage.

Et enfin je tiens à remercier particulièrement Mr Guillaume Sorton, professeur de physique chimie, qui m'a beaucoup aidé ces quatre dernières années et sans qui je n'en serai pas là aujourd'hui.

Sommaire

INTRODUCTION	2
I. PRESENTATION DE L'IFREMER	3
A. La station de La Tremblade	3
B. Le laboratoire LER/PC	3
C. L'unité de microbiologie du LER/PC	5
II. CONTEXTE ET OBJECTIFS	6
A. Contamination microbiologique des coquillages	6
B. <i>E. coli</i> : l'Indicateur de contamination fécale	7
C. Le REMI	7
III. MATERIELS ET METHODES	8
A. Présentation de la méthode NPP	8
1. Principe	8
2. Protocole	8
3. Avantages et inconvénient	12
B. Présentation de la méthode Impédancemétrique	12
1. Principe	12
2. Protocole	14
C. Le contrôle de l'étalonnage	15
1. Principe	15
2. Protocole	15
3. Contamination artificielle des coquillages	16
4. Analyse statistique	16
IV. RESULTATS ET DISCUSSIONS	17
A. Les résultats	17
B. L'analyse statistique	17
C. Discussion et perspectives	22
1. Discussion	22
2. Perspectives	23
CONCLUSION	24
BIBLIOGRAPHIE	25
ANNEXES	26

Introduction

L'unité de microbiologie de l'Ifremer de La Tremblade, dans laquelle j'ai effectué mon stage de deuxième année de DUT de Génie Biologie option Industrie Alimentaire et Biologique, appartient au laboratoire Environnement Ressource des Pertuis Charentais (LER/PC). Ce laboratoire qui est chargé de la surveillance de la qualité des eaux du bassin Marennes-Oléron a reçu une accréditation par le COFRAC (Comité français d'accréditation) en 2001.

La technique du nombre le plus probable (NPP), méthode de référence et la technique par impédancemétrie sont les méthodes utilisées pour le dénombrement des germes recherchés par le laboratoire. La méthode impédancemétrique est utilisée en routine pour le réseau de surveillance de la qualité microbiologique des zones de production. Cette méthode rapide permet de réagir rapidement en cas de pollution. La méthode impédancemétrique est une méthode indirecte qui est étalonnée par rapport à la méthode NPP.

Afin de s'assurer qu'il n'existe pas de dérive de la méthode impédancemétrique, un contrôle de l'étalonnage de la méthode est réalisé chaque année. Le but de cette validation interne étant de vérifier que les résultats obtenus par impédancemétrie sont équivalents avec ceux obtenus selon la méthode de référence NPP.

Les missions qui m'ont été confiées sont le contrôle de l'étalonnage de l'analyseur par impédancemétrie déjà en service au laboratoire, et le contrôle d'un autre appareil avant sa mise en service. Les années précédentes le contrôle de l'étalonnage été confié à un stagiaire mais ne concernait que l'analyseur déjà en service. La quantité de travail nécessaire à la réalisation des missions qui m'ont été confiées cette année est donc plus importante.

I. Présentation de l'Ifremer

L'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) est un établissement public à caractère industriel et commercial (EPIC), créé par le décret du 5 juin 1984 et modifié ensuite selon les décrets du 18 février 1998 puis celui de 2002.

Cet organisme est sous la tutelle des ministères chargés de la recherche, des pêches, et des cultures marines, de l'équipement, de l'aménagement du territoire et de l'environnement.

L'Ifremer est composé de 78 laboratoires répartis sur 26 stations situés le long du littoral métropolitain et dans les DOM-TOM. Les stations sont rattachées à 5 centres (Boulogne, Brest, Nantes, Toulon et Tahiti) le siège étant situé à Issy les Moulineaux. L'organisme emploie 1500 salariés et dispose d'un budget annuel de 235 millions d'euros.

A. La station de La Tremblade

La station Ifremer de La Tremblade est rattachée au centre administratif de Nantes. La station est implantée en Charente Maritime, au niveau de l'embouchure de la Seudre, dans le premier bassin conchylicole d'Europe : Marennes-Oléron. Elle est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance de l'environnement du littoral.

Cette station héberge 2 laboratoires :

- Une partie du **laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais** (LER/PC).
- L'essentiel des effectifs du **laboratoire Génétique et Pathologie** (LGP) du département Amélioration génétique, Santé animale et Environnement. Les objectifs sont l'acquisition de connaissances dans les domaines de l'amélioration génétique, du contrôle des performances et de la santé des espèces d'intérêt en aquaculture marine.

La station comprend notamment une écloserie d'huîtres et un marais expérimental. Elle dispose d'équipements lourds de laboratoire : séquenceur automatique, cytomètres en flux, microscope électronique à transmission, salle de manipulation de radio-éléments.

B. Le laboratoire LER/PC

Le laboratoire Environnement Ressources des Pertuis Charentais (LER/PC) est né le 1^{er} Janvier 2004, par la fusion de deux laboratoires de la Direction de l'Environnement Littoral (La Rochelle et La Tremblade) et d'un laboratoire de la Direction des Ressources Vivantes (La Tremblade). Il met en œuvre des réseaux de surveillance de l'environnement littoral qui lui permettent une collecte d'information sur le littoral.

Parmi les réseaux de surveillance nationaux :

- Le ROCCH qui a pour objectif l'évaluation des niveaux et des tendances des contaminants chimiques et des paramètres généraux de la qualité du milieu, ainsi que la surveillance des effets biologiques des contaminants.
- Le REPHY, **réseau du phytoplancton toxique et des phycotoxines**, permettant également le suivi des populations naturelles de phytoplancton et de ses évolutions.
- Le REMI, **réseau de contrôle microbiologique** des zones de production conchylicoles. Mon sujet de stage concerne les analyses réalisées au LER/PC pour ce réseau de surveillance. Le réseau et son fonctionnement seront détaillés par la suite.

Ce laboratoire, a une aire de compétence qui s'étend de Saint Gilles croix de Vie en Vendée à la rive droite de la Gironde, y compris les îles de Ré, d'Aix et d'Oléron. Et dispose de 2 implantations géographiques à La Rochelle et La Tremblade.

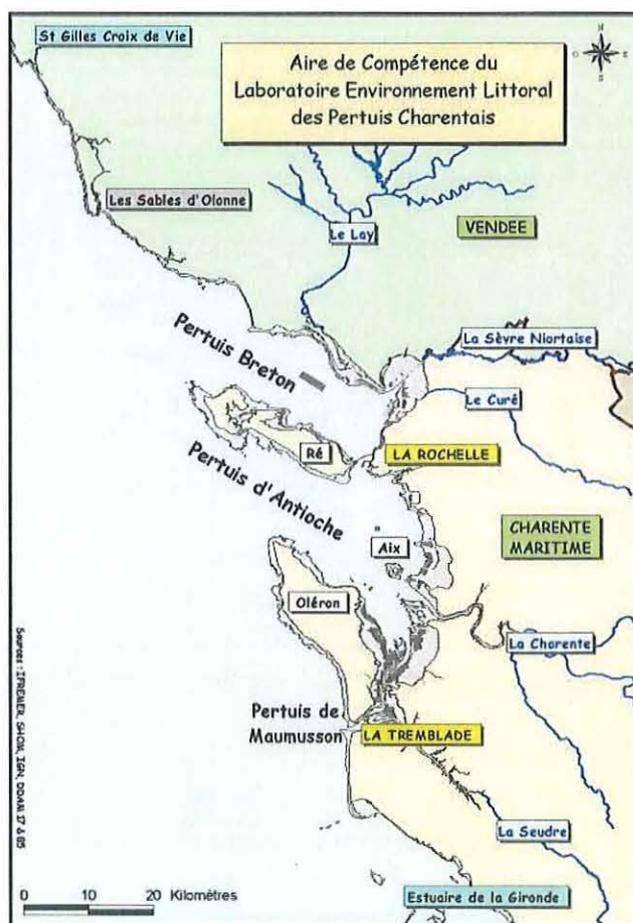


Figure 1 : Aire de compétence du Laboratoire Environnement Littoral des Pertuis Charentais.

C. L'unité de microbiologie du LER/PC

L'unité microbiologique est implantée sur le site de La Tremblade. Le laboratoire de microbiologie a ainsi mis en place une démarche d'assurance de la qualité ayant abouti à une accréditation par le COFRAC en 2001. Cette accréditation reconnaît un haut niveau de confiance dans les résultats d'analyse du laboratoire. Son activité principale est la mise en œuvre du réseau de surveillance microbiologique REMI. Le laboratoire assure également les analyses des études de dépistage des sources de pollutions microbiologiques et participe aux activités d'avis pour l'aménagement du littoral. Il collabore avec le **Laboratoire National de Référence** pour les évolutions méthodologiques. C'est dans l'unité de microbiologie que j'ai réalisé mon stage.

II. Contexte et objectifs

A. Contamination microbiologique des coquillages

Les germes pathogènes d'origine fécale peuvent être à l'origine de toxi-infection alimentaire. Les germes incriminés sont des virus (norovirus, Hépatite A...) ou des bactéries (*Salmonella*...). Les symptômes sont en général d'ordre gastrique ou intestinal.

En effet, les activités humaines et animales peuvent être à l'origine de contaminations fécales du milieu marin. L'assainissement des eaux usées, l'épandage des lisiers, les rejets d'industries agro alimentaires, la faune sauvage sont des sources de contamination fécales régulièrement incriminées. Les pollutions peuvent atteindre directement le milieu marin lorsqu'elles ont lieu sur le littoral ou parvenir jusqu'à la mer par les bassins versants des fleuves.

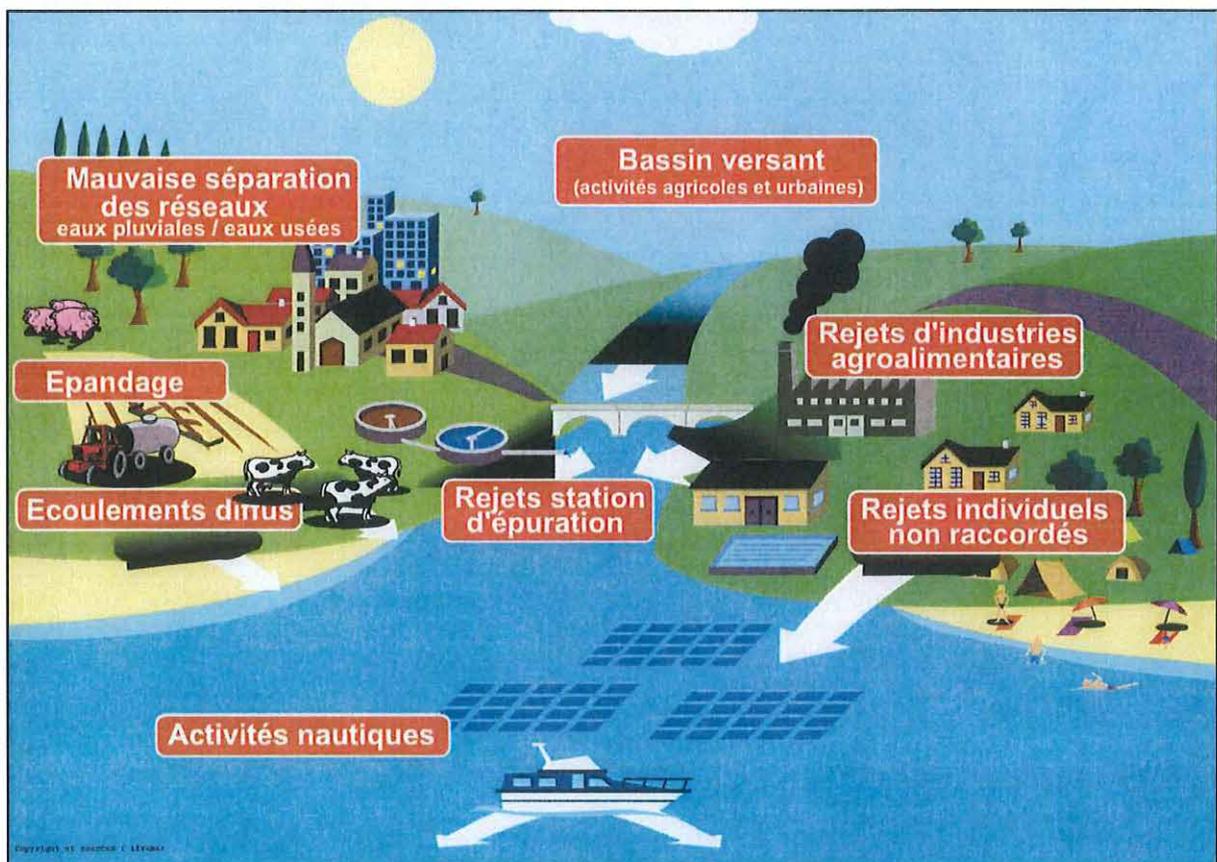


Figure 2 : les sources de contamination fécale.

Le risque de contamination des coquillages est aggravé par plusieurs facteurs :

- Ils se situent dans des zones proches du littoral et en zone estuarienne et sont donc à proximité des sources de pollutions.
- les coquillages possèdent le pouvoir de filtrer jusqu'à 5L d'eau par heure et concentrent ainsi les microorganismes présents dans l'eau.

B. *E. coli* : l'Indicateur de contamination fécale

Les analyses permettant de rechercher l'ensemble de ces organismes pathogènes d'origine fécale sont longues, complexes et coûteuses. La stratégie de surveillance de la qualité microbiologique des coquillages est donc basée sur l'utilisation d'un indicateur de contamination fécale : *E.coli*. Cette bactérie indicatrice permet d'évaluer le risque de présence des pathogènes, c'est l'indicateur réglementaire utilisé.

Son utilisation est possible car il possède tous les critères nécessaires :

- Sa présence et son taux doivent être corrélés à l'incidence des toxico-infections alimentaires.
- Spécificité : il ne doit appartenir qu'à la flore fécale et ne doit pas être présent naturellement dans l'environnement.
- Justesse : l'indicateur ne doit pas se multiplier dans l'environnement marin et sa survie dans l'environnement doit être proche de celle des germes pathogènes afin que l'indication soit exacte.
- Sensibilité : son taux doit excéder celui des germes pathogènes afin de jouer un rôle d'alarme et pallier le caractère aléatoire de la recherche de germes pathogènes le plus souvent en faible nombre.
- La cinétique d'accumulation et d'épuration de l'indicateur dans les coquillages doit être proche de celle des germes pathogènes.

C. Le REMI

Le REMI est le réseau de surveillance microbiologique des zones de production de coquillages. Les résultats sont utilisés pour la mise à jour du classement de zone. Les zones de productions sont délimitées géographiquement et un indice de qualité leur est attribué en fonction des résultats du REMI. Il existe 4 niveaux de qualité allant de A (meilleure qualité) à D (mauvaise qualité). Les conchyliculteurs possédant des concessions en zone A peuvent commercialiser directement leur coquillages, pour les zones B et C, les coquillages doivent être purifiés avant commercialisation, en zone D la commercialisation est interdite.

En cas de pollution occasionnelle constatée par les résultats du REMI, les zones de production peuvent être provisoirement fermées jusqu'au retour à des niveaux de contamination normaux.

Les analyses microbiologiques du REMI sont des analyses d'*E.coli* dans les coquillages. La méthode de référence est une méthode NPP, en routine l'Ifremer a développé une méthode rapide : l'impédancemétrie. Cette méthode permet d'avoir des délais de réaction rapide (15 heures) en cas de pollution contre 72 heures pour la méthode NPP. La méthode impédancemétrique doit garantir que les résultats obtenus sont équivalents à ceux de la méthode de référence par un contrôle de l'étalonnage. Ce travail constitue l'objet de mon stage.

III. Matériels et méthodes

A. Présentation de la méthode NPP

1. Principe

La méthode du nombre le plus probable (NPP) est la méthode référence utilisée pour le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés dans les coquillages marins. Cette méthode qui est décrite dans la norme NF V 08-600 consiste en une répétition de dilution en série. Pour chaque dilution, des répétitions de recherche (présence/absence) d'*E. coli* présumés sont réalisées. Le nombre de recherches positives par dilution forme un nombre caractéristique qui est transformé en nombre le plus probable d'*E. coli* par une table statistique dite de Mann.

Pour chaque recherche d'*E. coli*, deux étapes sont nécessaires, une étape présomptive où les coliformes totaux sont recherchés, puis une étape confirmative où on dénombre les *E. coli* présumés.

2. Protocole

L'ensemble des milieux de culture est décrit en annexe p 26.

Suspension mère

Les coquillages sont ouverts dans la zone de stérilité du bec bunsen à l'aide d'un couteau stérilisé à l'alcool. La CLI (Chair et Liquide Intervalvaire) est alors récupérée dans un bol broyeur. La quantité nécessaire de CLI doit être comprise entre 75 et 100g et il faut au minimum 6 individus pour un bon échantillonnage.

Cette opération s'effectue à l'aide d'un diluteur comprenant une balance et une pompe (DILUMAT). On réalise ensuite une dilution au 1/3 grâce au DILUMAT qui effectue cette opération automatiquement en calculant la quantité de diluant (TS) à verser en fonction de la masse de CLI introduite. On broie alors le contenu du bol pendant 45 secondes (15 à vitesse lente et 30 à vitesse rapide) puis on laisse décanter pendant 20 minutes, ce qui permet aux microorganismes stressés de se revivifier. Les grosses particules (coquilles, fragments de chair) décanter au fond du bol. On obtient alors 3 phases (Figure 3).

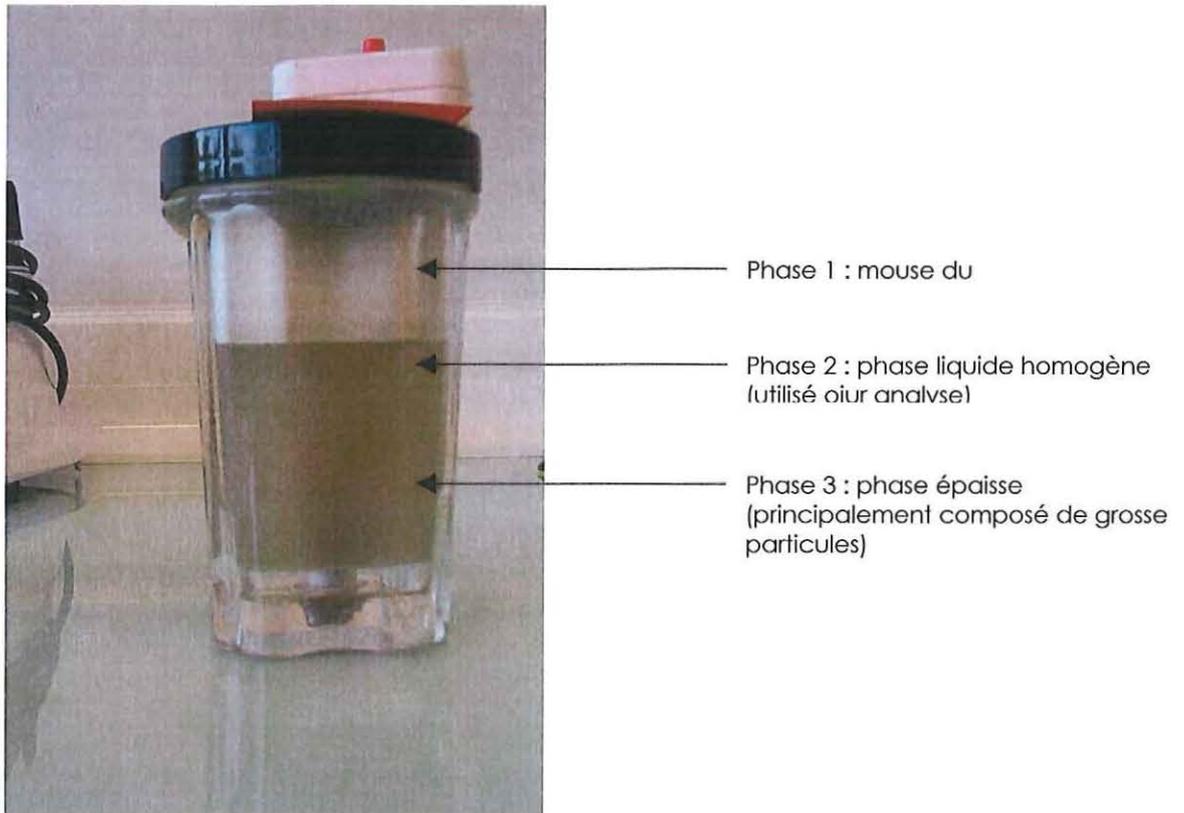


figure 3 : bol broyeur en décantation

La suspension obtenue à ce stade est une dilution au 1/3. On prélève alors dans la phase homogène 60 ml que l'on introduit dans un flacon de 140 ml de tryptone sel (TS 140). La dilution obtenue est alors au 1/10.

Culture présomptive

On procède à l'ensemencement des 4 séries de cinq tubes. Le milieu utilisé est un milieu d'enrichissement sélectif BTLS (Bouillon Lauryl Sulfate Tryptose) double concentration pour la première dilution et simple concentration pour les dilutions suivantes

Les tubes sont ensemencés à partir de la suspension au 1/10^{ème}. L'ensemble des dilutions est alors incubé pendant 48 heures \pm 2 heures dans une étuve à 37°C \pm 1°C.

Le BTLS permet la croissance sélective des coliformes totaux dans chacun des tubes ensemencés. Le Lauryl Sulfate de sodium inhibe le développement de la flore secondaire contaminante. Le développement rapide des Coliformes, provoque la fermentation du lactose responsable d'un dégagement gazeux qui est piégé et observable après incubation grâce à des cloches de Durham (petites cloches en verre).

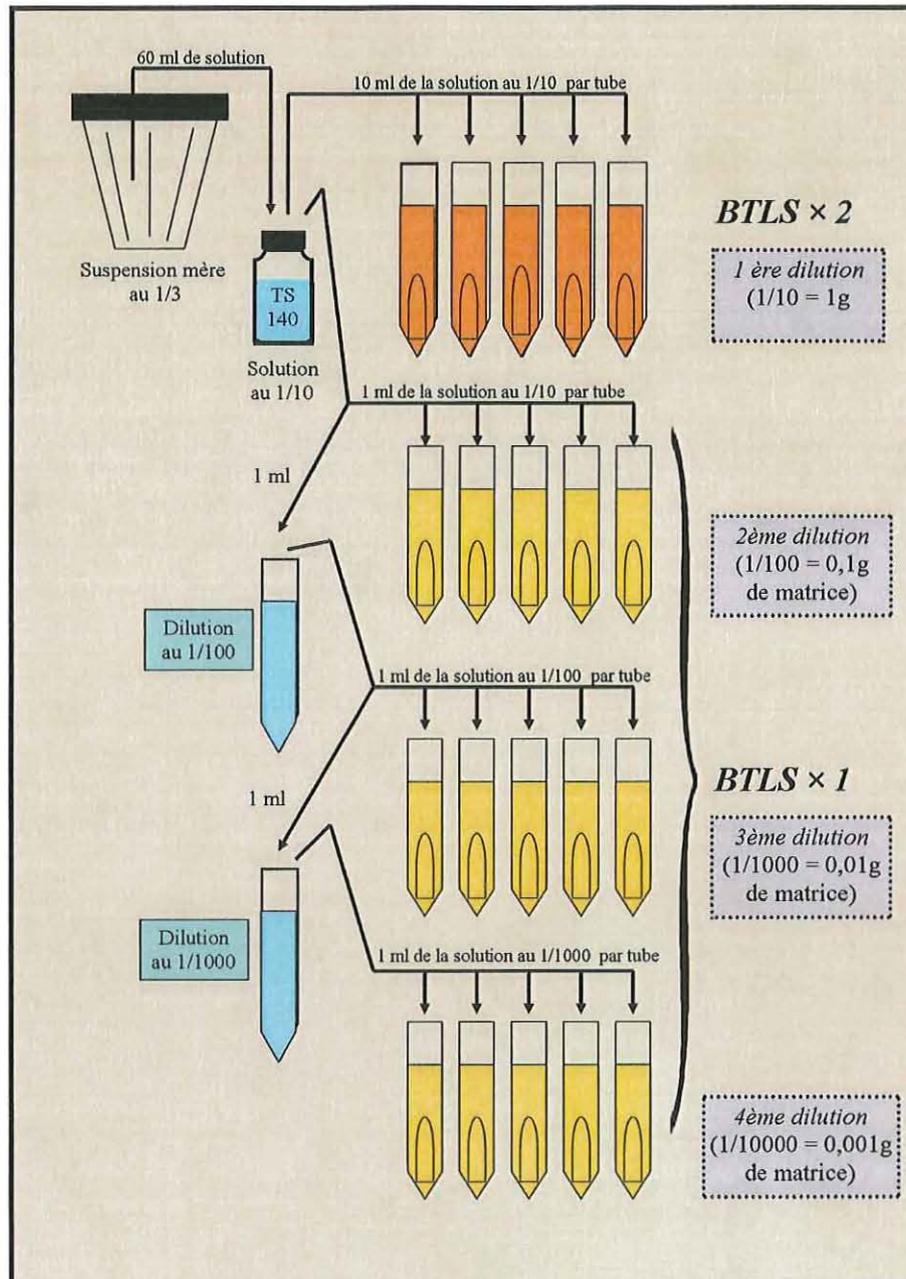


Figure 4 : protocole de la méthode NPP

Culture confirmative

Il s'agit pour cette partie de la méthode de repiquer l'ensemble des tubes positifs de la culture présomptive, c'est-à-dire présentant un trouble et un dégagement gazeux. Les tubes sont repiqués dans un tube d'eau peptonée exempte d'indole (EPI) et dans un tube de bouillon EC.

Ils sont ensuite incubés dans des bains marie à $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures \pm 1 heure. Le milieu EC doublement sélectif inhibe les microorganismes Gram positif et certain négatif grâce à la présence de sels biliaries. La tryptone et le lactose constituent les ressources azotées et énergétiques pour la croissance des coliformes.

Le développement rapide des coliformes, provoque la fermentation du lactose responsable d'un dégagement gazeux qui est piégé et observable après incubation à 44°C grâce à des cloches de Durham. Incubé à 44°C, le milieu EC permet de sélectionner les coliformes thermotolérants.

L'EPI n'est pas un milieu sélectif mais contient du Tryptophane, qui permet à *E.coli* de produire de l'indole. La présence d'indole est révélée par l'ajout de réactif de Kovacs après incubation. Une réaction positive se traduit par la formation d'un anneau de couleur rouge en surface.

Les tubes de BTLS repiqués en milieu EC et EPI sont considérés positifs s'il y a simultanément dégagement gazeux dans le milieu EC et production d'indole dans le milieu EPI correspondant.

Lecture des résultats

On obtient alors un certain nombre de tubes positifs par dilution, qui correspond à une combinaison à 4 chiffres. Il faut ensuite retenir une série de 3 chiffres successifs parmi les 4 disponibles. Ce choix est réalisé selon 2 cas :

- **Au moins une dilution relève 5 tubes positifs :**

Choisir la dilution la plus élevée révélant 5 tubes positifs ainsi que les deux dilutions plus élevées suivant immédiatement.

- **Aucune dilution ne révèle 5 tubes positifs :**

Le premier cas ne peut être appliqué, on choisit les 3 dilutions les plus élevées de la série.

La combinaison de 3 chiffres ainsi obtenue est transformée en nombre le plus probable d'*E.coli* présumés grâce à la table de Mann. Cette table donne un indice de probabilité de la combinaison obtenue, seules les combinaisons de catégorie 1 ou 2 sont exploitables.

Cette table nous donne pour les différentes combinaisons un coefficient NPP calculé pour 1g du CLI. Ce coefficient est alors multiplié par 100 afin de le rapporter à 100g de CLI. Enfin, pour tenir compte du facteur de dilution on multiplie le nombre obtenu par l'inverse de la dilution la plus faible de la combinaison à trois chiffres retenus (selon la norme NF V 08-600).

$$E.coli \text{ présumés}/100g \text{ de CLI} = \text{coefficient de table} * 100 * (1/\text{dilution})$$

Exemple de calcul :

5 dilutions successives :	1g	1/10g	1/100g	1/1000g
Nombres de tubes positifs pour chacune des 5 séries :	5	5	3	2

La combinaison retenue est : 532.

La catégorie du résultat est 1, le résultat est acceptable.

Le coefficient NPP est 14.

Le résultat est donc de $14 \times 100 \times 10 = 14\ 000$ *E.coli* présumés pour 100g de CLI.

3. Avantages et inconvénient

Il s'agit d'une méthode assez simple à mettre en œuvre car elle ne nécessite pas de matériel sophistiqué ou une grande technicité.

Mais cette méthode comporte aussi des inconvénients. Les résultats ne sont observables qu'au bout de 72h (contre 10h pour la méthode impédancemétrique) ce qui ne permet pas une intervention rapide lorsqu'il y a des alertes dues à des contaminations fécales. C'est une méthode qui nécessite 3 milieux de cultures, qu'il faut préparer à l'avance, alors que l'unique milieu que l'on trouve dans l'autre méthode est prêt à l'emploi. De plus, la méthode est longue au niveau de ces manipulations, car beaucoup de tubes sont à ensemercer puis à repiquer.

B. Présentation de la méthode Impédancemétrique

1. Principe

L'impédancemétrie est une technique indirecte où la mesure d'un signal électrique dans un milieu de cultureensemencé permet de déduire la concentration en bactérie de l'échantillon. La mesure électrique réalisée est une mesure d'impédance ou de résistance, en pratique c'est la conductance qui est mesurée (l'inverse de la résistance).

Grâce à l'amélioration des connaissances sur le métabolisme bactérien, les scientifiques du 20^{ème} siècle se sont aperçus qu'il existait une relation entre les activités métaboliques des microorganismes et les variations de la conductance des cultures microbiennes. En effet le catabolisme bactérien dégrade les molécules faiblement chargées, tel que les glucides ou les lipides, en plus petites molécules électriquement chargées comme l'acide lactique, l'acide acétique ou le bicarbonate. Ce qui tend, lors de la croissance bactérienne, à augmenter globalement la conductance du milieu (Figure 5).

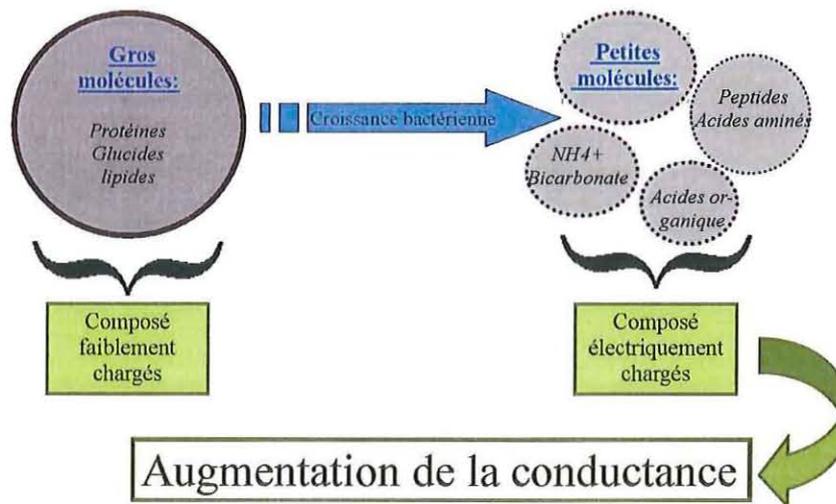


Figure 5 : effet de croissance microbienne sur la conductance du milieu de culture.

La variation, en fonction du temps, de la conductance d'un milieu de culture où croissent des bactéries est comparable à une courbe de croissance bactérienne classique (figure 6). Celle-ci présente une phase de latence durant laquelle la conductance est constante et une phase de croissance exponentielle. La phase de latence est inversement proportionnelle à la concentration initiale en bactéries dans le milieu ensemencé.

On mesure donc le temps de la phase de latence, cette durée appelée temps de détection est transformée en nombre de bactéries grâce à un étalonnage préalablement réalisé. Lors de cet étalonnage, un grand nombre d'échantillons sont analysés en double par une méthode de référence et par impédancemétrie. Les résultats obtenus permettent d'établir l'étalonnage utilisé en routine.

Info: A 409	Tellines
Mesure. N° :	7849
Incub. :	B
Pos. :	12
Tps d'origine de détection:	7,70 heures
Nombre de Bactéries:	4,1E+2

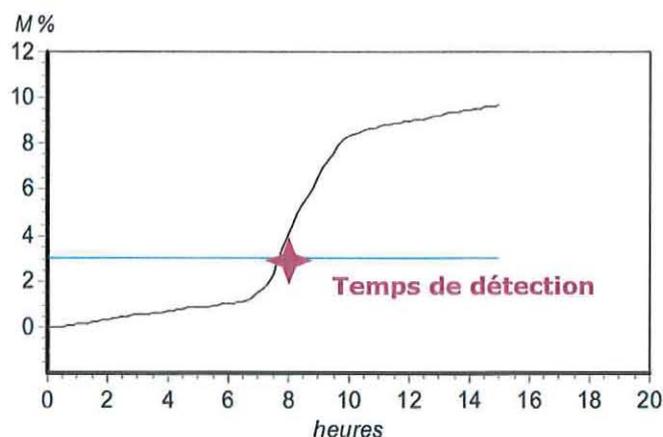


Figure 6 : exemple de courbes d'impédance.

2. Protocole

Description de l'analyseur microbiologique.

L'analyseur microbiologique utilisé est le Bac Trac 4300 Microbiological Analyser de chez SY-LAB. Cet analyseur mesure la variation de conductance dans les milieux de culture contaminés par des microorganismes tels que les *Escherichia coli*.

Le Bac Trac se compose de deux incubateurs, qui peuvent chacun contenir 32 cellules. L'analyseur est contrôlé par ordinateur à l'aide d'un logiciel appelé BAC MONITOR. La température peut être réglée dans chaque bloc par le PC, celle-ci peut aller de 0°C à 65°C à $\pm 0,1^\circ\text{C}$. Elle est ici maintenue à $44^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$, température optimale de croissance des *Escherichia coli* présumés. (Figure 7)



Figure 7 : photo des Bac Trac 83 et Bac Trac 84 reliés par ordinateur

Les cellules du Bac Trac sont en plastique et composées de 4 électrodes qui permettent la mesure de la conductance. Chaque cellule contient 7,5 ml du milieu sélectif Bi-média prêt à l'emploi (annexe). Ces cellules sont stériles, l'opercule qui les ferme est retiré et remplacé par un bouchon en plastique lors de l'ensemencement. Pour chaque échantillon 2 cellules sont ensemencées.

Les cellules une fois ensemencées sont placées dans l'incubateur, il est nécessaire de les tourner afin de bien connecter les électrodes. Puis les informations concernant l'échantillon sont rentrées dans le logiciel BAC MONITOR qui effectuera alors des mesures toutes les 10 minutes. L'ordinateur enregistre alors l'ensemble des données et trace les courbes représentant l'impédance en fonction du temps. Il est aussi capable de déterminer le temps de détection et calcule automatiquement le nombre d *Escherichia coli* présumés grâce à l'étalonnage paramétré.

Le résultat final est la moyenne géométrique des résultats des 2 cellules

C. Le contrôle de l'étalonnage

1. Principe

Le contrôle de l'étalonnage constitue mon sujet de stage, le laboratoire possédant un appareil en service et un autre en attente de mise en service j'ai réalisé deux contrôles de l'étalonnage. C'est une vérification de l'équivalence des résultats de la méthode impédancemétrique avec les résultats de la méthode de référence : le NPP. Sa fréquence est annuelle et permet de vérifier l'absence de dérive dans le temps qui pourrait être lié à un vieillissement de l'appareil et de son système de mesure électrique.

Le contrôle de l'étalonnage est décrit dans la norme NF V08-600, pour cela au minimum 20 échantillons doivent être analysés en double par les 2 méthodes. Les niveaux de contamination doivent couvrir l'ensemble de la gamme de mesure, et pour cela il faut faire appel à des contaminations artificielles. On réalise une régression linéaire avec les résultats obtenus, et l'équation de la régression doit avoir un coefficient directeur proche de 1 et une ordonnée à l'origine voisine de 0. Dans le cas inverse l'équivalence des résultats n'est pas prouvée.

2. Protocole

Pour chaque échantillon, une suspension mère commune est préparée. A partir de cette suspension, 2 analyses NPP sont réalisées et une analyse impédancemétrique. Le résultat de l'analyse impédancemétrique est comparé à la moyenne géométrique des deux résultats NPP.

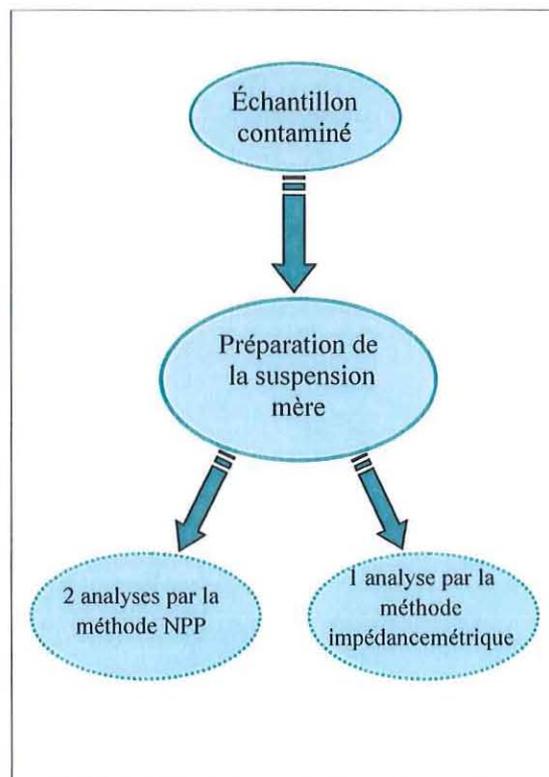


Figure 8 : schéma de l'organisation générale du contrôle de l'étalonnage.

3. Contamination artificielle des coquillages

Pour le contrôle de l'étalonnage la gamme de concentration en *Escherichia coli* présumés dans 100 g de CLI doit être comprise entre 130 et 1.10^5 . Or la contamination des échantillons dans le milieu naturel n'est pas facile à estimer. De plus le bassin de Marennes-Oléron possède une bonne qualité microbiologique et ne permet pas d'obtenir les niveaux de contamination souhaités. La contamination des coquillages a donc lieu artificiellement avec de l'effluent de station d'épuration. En effet celle ci est autorisée par la norme NF V 08-106 (dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants : technique par impédancemétrie direct) qui permet alors de mieux cibler le niveau de contamination.

Cette technique par balnéation des coquillages dans de l'eau de mer additionnée d'effluent de station d'épuration permet d'avoir une contamination assez représentative d'une contamination naturelle.

4. Analyse statistique

La relation entre les concentrations d'*Escherichia coli* présumés déterminée par la technique NPP (NPP) et par la technique impédncemétrique (N) est évaluée au moyen du modèle linéaire

$$\text{Log}_{10}N = a + b \log_{10} NPP$$

La validité de l'étalonnage est confirmée si l'équation ci dessus est égale à l'équation théorique $\log_{10}N = \log_{10}NPP$, c'est-à-dire :

- Si l'ordonnée à l'origine n'est pas significativement différente de 0, ce qui est équivalent à dire que la valeur 0 est à l'intérieur de l'intervalle de confiance à 95% de la valeur estimée (a) de l'ordonnée à l'origine.

$$0 \in [a - 1,96S(a), a + 1,96S(a)] \quad \text{avec } S(a) \text{ erreur-type de } a.$$

- Si la pente n'est pas significativement différente de 1, ce qui est équivalent à dire que la valeur 1 est à l'intérieur de l'intervalle de confiance à 95% de la valeur estimée (b) de la pente.

$$1 \in [b - 1,96S(b), b + 1,96S(b)] \quad \text{avec } S(b) \text{ erreur-type de } b.$$

IV. Résultats et discussions

A. Les résultats

L'ensemble des résultats obtenus sont regroupés dans deux tableaux se situant en annexe p 29 et p 30.

Lors du contrôle de l'étalonnage des analyseurs microbiologiques, 42 essais ont été réalisés pour chacun des deux Bac Trac. Mais tous ces essais ne sont pas exploitables.

Pour chacune des méthodes NPP et impédancemétrique, il existe des seuils de quantification avec des limites hautes et basses. Pour la méthode NPP, la limite basse est de 18 *E.coli*/100ml et la limite haute est de 160 000 *E.coli*/100ml. Pour la méthode impédancemétrique, la limite basse est de 130 *E.coli*/100ml et la limite haute de 60 000 *E.coli*/100ml. A chaque essai du contrôle de l'étalonnage, si un des résultats obtenus ne se situe pas dans ces limites, l'essai est inexploitable.

Les essais pour lesquels la différence entre NPP et Bac Trac est supérieure à 0.5 log sont écartés car jugés aberrants.

Après avoir écarté tous les résultats non exploitables, il ne me reste plus que 20 résultats exploitables pour le Bac Trac 83 et 21 pour le Bac Trac 84. 20 résultats au minimum sont nécessaires pour réaliser l'analyse statistique. Ce nombre d'essais ayant été atteint, l'analyse statistique peut donc être effectuée.

B. L'analyse statistique

L'analyse est réalisée à partir des moyennes géométriques transformées en valeurs logarithmiques. L'analyse est réalisée selon les spécifications de la norme NF V08-106, à l'aide d'un logiciel statistique (Statgraphics), on peut établir une droite de régression entre les résultats NPP et les résultats d'impédancemétrie. Pour chaque essai on obtient un couple de valeur log (NPP), log (N), avec N pour la valeur impédancemétrique. Les valeurs NPP (méthode de référence) en abscisse comme variable indépendante et les valeurs d'impédance en ordonnée.

Bac Trac 83 :

REGRESSION LINEAIRE BACTRAC 83

$$\text{LOG}_{10}(\text{bactrac } 83) = 0.973222 + 0.751592 \cdot \text{LOG}_{10}(\text{NPP})$$

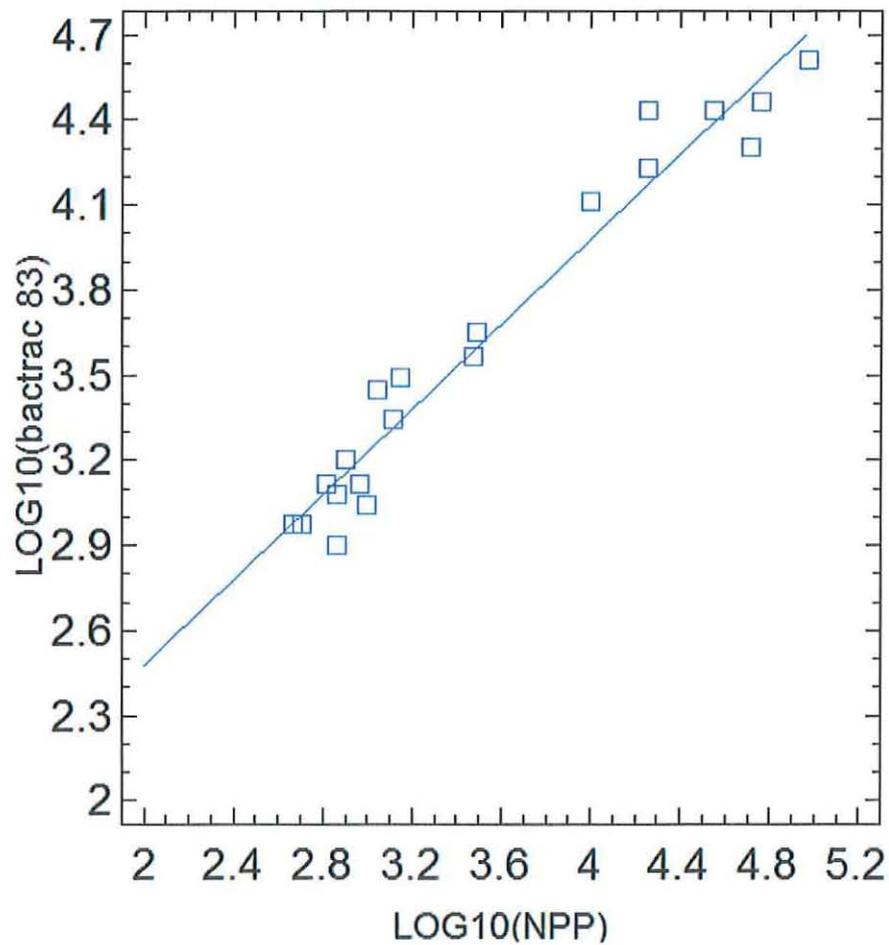


Figure 9 : droite de régression du Bac Trac 83.

Régression simple – log 10(bactrac 83) en fonction de log10(NPP)

Variable à expliquer: bactrac 83

Variable explicative: NPP

Modèle linéaire: $Y = a + b \cdot X$

Coefficients

	<i>Estimation des</i>	<i>Erreur</i>	<i>t</i>	<i>Probabilité</i>
	<i>moindres carrés</i>	<i>type</i>		
Ordonnée	0.968739	0.142543	6.79612	0.0000
Pente	0.753013	0.0394792	19.0737	0.0000

Coefficient de corrélation = 0.976143

R-carré = 95.2856 %

R-carré (ajusté pour les ddl) = 95.0236 %

L'intervalle de confiance à 95% de la pente de la régression est égal à :

- **Limite haute** : Pente +1.96 X erreur type de la pente :
 $0.753013 + 1.96 \cdot 0.0394792 = 0.82750923$
- **Limite basse** : Pente -1.96 X erreur type de la pente :
 $0.753013 - 1.96 \cdot 0.0394792 = 0.67563377$

l'intervalle de confiance à 95% de la pente ne comprend pas la valeur 1.

L'intervalle de confiance à 95% de l'ordonnée à l'origine est égal à :

- **Limite haute** : ordonnée +1.96 X erreur type de l'ordonnée :
 $0.968739 + 1.96 \cdot 0.142543 = 1.24812328$
- **Limite basse** : ordonnée -1.96 X erreur type de l'ordonnée :
 $0.968739 - 1.96 \cdot 0.142543 = 0.68935472$

l'intervalle de confiance à 95% de l'ordonnée à l'origine ne comprend pas la valeur 0.

Régression simple - log10(bactrac 84) en fonction de log10(NPP)

Variable à expliquer: log10(bactrac 84)

Variable explicative: log10(NPP)

Modèle linéaire: $Y = a + b \cdot X$

Coefficients

	<i>Estimation des moindres carrés</i>	<i>Erreur type</i>	<i>t</i>	<i>Probabilité</i>
Ordonnée	0.929703	0.204623	4.54349	0.0002
Pente	0.775938	0.0587255	13.213	0.0000

Coefficient de corrélation = 0.949658

R-carré = 90.1851 %

R-carré (ajusté pour les ddl) = 89.6685 %

L'intervalle de confiance à 95% de la pente de la régression est égal à :

- **Limite haute** : Pente +1.96 X erreur type de la pente :
 $0.775938 + 1.96 \cdot 0.0587255 = 0.89103998$
- **Limite basse** : Pente -1.96 X erreur type de la pente :
 $0.775938 - 1.96 \cdot 0.0587255 = 0.66083602$

l'intervalle de confiance à 95% de la pente ne comprend pas la valeur 1.

L'intervalle de confiance à 95% de l'ordonnée à l'origine est égal à :

- **Limite haute** : ordonnée +1.96 X erreur type de l'ordonnée :
 $0.929703 + 1.96 \cdot 0.204623 = 1.33076408$
- **Limite basse** : ordonnée - 1.96 X erreur type de l'ordonnée :
 $0.929703 - 1.96 \cdot 0.204623 = 0.52864192$

l'intervalle de confiance à 95% de l'ordonnée à l'origine ne comprend pas la valeur 0.

Le contrôle de l'étalonnage n'est pas vérifié pour les Bac Trac 83 et Bac Trac 84.

C. Discussion et perspectives

1. Discussion

Le laboratoire n'avait jusqu'à présent jamais obtenu de résultats non conforme lors des contrôles de l'étalonnage précédents. (Hass, Amiaud, Pineau,...), par ailleurs le laboratoire participe à des essais inter-laboratoires. Lors de ces essais les résultats de la méthode impédancemétrique du laboratoire sont comparés aux résultats d'un grand nombre d'autres laboratoires pratiquant les mêmes méthodes. Ces essais réalisés deux fois par an se sont avérés systématiquement conformes pour le laboratoire. Lors de ces essais on compare les résultats des deux méthodes (NPP et impédancemétrique) qui se sont avérés équivalents. (rapport EIL du LNR). Ce contrôle de l'étalonnage est donc en contradiction avec les résultats des essais inter-laboratoires.

L'absence de vérification du contrôle de l'étalonnage ne signifie pas forcément que l'analyseur Bac Trac fait l'objet d'une dérive de ses mesures. En effet le laboratoire, suite aux résultats que j'ai obtenus à déjà réalisé une analyse des causes possibles. Cette analyse reste à approfondir, mais d'ores et déjà plusieurs causes peuvent être suspectées.

L'ensemble des résultats obtenus lors de ce contrôle de l'étalonnage ont été validés par le responsable du laboratoire. Le système qualité du laboratoire accrédité par le COFRAC n'a pas identifié d'anomalies sur ces résultats.

Toutefois, on peut observer graphiquement sur les droites de régression (figure 9 et 10) que les répartitions des nuages de point ne sont pas homogènes. Les niveaux de contamination faibles sont plus représentés que les forts niveaux de contamination. Ce déséquilibre peut induire une erreur dans l'estimation de l'équation de la droite de régression.

Ce déséquilibre des niveaux de contaminations peut s'expliquer par les difficultés à bien cibler les niveaux atteints lors des contaminations artificielles. En effet, il existe de fortes incertitudes sur la concentration des effluents qui est évaluée grossièrement, et la filtration des coquillages est dépendante de nombreux facteurs : température, salinité de l'eau, taux de filtration des coquillages...).

L'utilisation d'huîtres sur la quasi-totalité des essais peut induire une erreur liée à un effet matrice. Il aurait été préférable de multiplier les essais réalisés avec des espèces plus variées (palourdes ou moules).

Suite à ce contrôle de l'étalonnage non conforme, le laboratoire va déterminer, avec l'aide du Laboratoire National de Référence (LNR), s'il s'agit ou non d'une dérive des analyseurs Bac Trac.

Le contrôle de l'étalonnage fait intervenir la méthode NPP et la méthode impédancemétrique, l'anomalie pourrait également provenir de la méthode NPP (dérive de la température des incubateurs, problème de qualité des fournisseurs de milieux de culture,...)

2. Perspectives

Le laboratoire va analyser les différentes causes possible avec l'aide du Laboratoire Nationale de Référence (LNR).

Les difficultés à bien cibler les niveaux de contamination peuvent être à l'origine d'un contrôle non conforme. La contamination des coquillages par trempage dans des effluents de station d'épuration dilués en eau de mer est difficile à maîtriser. Une meilleur modélisation de la contamination des coquillages en fonction des paramètres importants (température, salinité, espèces des coquillages,...) permettrait de résoudre ce problème. Des travaux sont actuellement en cours au laboratoire du LER/PC.

Le contrôle de l'étalonnage décrit dans la norme NF V 08-106 fait intervenir de nombreux facteurs (NPP, impédance, répartitions des niveaux de contaminations,..) . un contrôle non conforme ne permet pas de mettre en évidence une dérive des analyseurs. Ce point de la norme est actuellement en discussion à l'AFNOR dans le cadre de la révision de la norme.

Le responsable technique de l'unité microbiologique du LER/PC, fait partie des experts chargés de travailler à la révision de cette norme. La solution envisagée pour remplacer le contrôle de l'étalonnage est un contrôle interne de type témoin positif. L'analyse régulière de ces témoins positifs de concentration connues permettrait de constater la dérive éventuelle des analyseurs. Avec ces témoins positifs, la méthode NPP ou la répartition des niveaux de contamination ne pourraient pas être la cause d'un contrôle non conforme.

Conclusion

Ce stage, qui s'est déroulé au sein de l'unité microbiologique du LER/PC de La Tremblade, avait pour but de réaliser le contrôle de l'étalonnage des analyseurs microbiologiques Bac Trac 83 et Bac Trac 84. Ces analyseurs microbiologiques étant utilisés en routine pour la méthode impédancemétrique dans le cadre du suivi sanitaire des zones de production.

Cette méthode rapide, étalonnée par rapport à la méthode de référence NPP doit être vérifiée annuellement. Le laboratoire vérifie ainsi l'équivalence des résultats des deux méthodes. Les modalités de ce contrôle sont décrites dans la norme analytique NF V 08-106.

Après avoir réalisé tout les essais nécessaires au contrôles des deux analyseurs du laboratoire, les résultats se sont avérés non conformes . Après une analyse des causes réalisée par le laboratoire, la validité des résultats pris en compte à été confirmée. En revanche, la mauvaise répartition des niveaux de contamination peut être à l'origine du contrôle non conforme. Une autre cause possible serait une dérive métrologique des incubateurs de la méthodes NPP. L'analyse des causes va se poursuivre avec l'expertise du Laboratoire Nationale de Référence pour déterminer s'il s'agit d'une dérive de la méthode impédancemétrique ou non.

Le contrôle de l'étalonnage tel que décrit dans la norme actuelle présente l'inconvénient de dépendre de nombreux facteurs, un résultat non conforme n'étant pas forcément synonyme d'une dérive des analyseurs Bac Trac. D'ailleurs la norme actuellement en révision à l'AFNOR comprendra de nouvelles dispositions pour remplacer le contrôle de l'étalonnage actuel.

D'un point de vue personnelle, ce stage m'a apporté une expérience professionnelle au sein d'un laboratoire de microbiologie. Il m'a permis d'obtenir une certaine autonomie, organisation ainsi que d'acquérir des connaissances sur le milieu marin. De plus travailler dans un laboratoire accrédité avec ses exigences et sa rigueur a été très enrichissant, tout comme l'utilisation de la technique par impédancemétrie qui n'est pas commune.

Bibliographie

Sites Internet :

- SY LAB, SY LAB Bac Trac 4300. <http://sylab.com/bactrac.htm>, consulté le 20 mai 2009.
- IFREMER (2006), <http://www.ifremer.fr/lerpc/> , mise à jour le 13/05/2009, consulté le 27 avril 2009.

Rapport :

- J-C.Piquet, C.Auger, C.Montaubin, DOP/LER/PC, Contamination microbienne du milieu marin, mars 2005, 11 pages.
- C.Montaubin, Ifremer, Laboratoire LER/PC, Dossier microbiologique, (M14PRO01), crée le 26 février 2008, révisé le 09 juillet 2009, 11 pages.
- J.Hass, Rapport de stage LER/PC La Tremblade, Validation de la méthode de dénombrement des *Escherichia coli* présumés par impédancemétrie, 2007, 23 pages.
- N.Amiaud, Rapport de stage LER/PC La Tremblade, étalonnage de la méthode de dénombrement des *Escherichia coli* présumés par impédancemétrie, 2005, 49 pages
- J.Pineau, Rapport de stage DEL La Tremblade, Validation interne de la méthode de dénombrement des *Escherichia coli* présumés par impédancemétrie, 2003, 70 pages.
- Norme NF V 08-600, Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants, Technique du nombre le plus probable, octobre 2000, 16 pages.
- Norme NF V 08-106, Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants, Technique indirect par impédancemétrie direct, janvier 2002, 16 pages.
- T.RIBEIRO, A.PAUSS, (2007), Utilisation de l'impédancemétrie pour le suivi d'activités microbiennes, Bull.Soc.Fr.Microbiol.,22, pages 108 à 114.

Annexes

Compositions et principes des milieux de culture :

- ✗ **BTLS** (Bouillon à la Trypose et au Laurylsulfate)
- ✗ **Tryptone-sel** (TS)
- ✗ **Eau Peptonée Exempt d'Indole** (EPI)
- ✗ **Bouillon EC**
- ✗ **Milieu BiMedia** (laboratoire SY-LAB)
- ✗ **Réactif de KOVACS**

✗ **BTLS** (Bouillon à la Trypose et au Laurylsulfate)

Tryptone	20 g
Lactose	5 g
Phosphate dipotassique	2,75 g
Phosphate monopotassique	2,75 g
Chlorure de sodium	5 g
Laurylsulfate de sodium	0,1 g
Eau distillée	1000 ml

Le bouillon à la Tryptose et au Laurylsulfate est un milieu d'enrichissement sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des coliformes dans les eaux, les produits laitiers et les autres produits alimentaires.

Le milieu a été formulé par Malmann et Darby qui ont montré, en 1941, que parmi un grand nombre d'agents mouillants, le Laurylsulfate s'avérait être le meilleur agent sélectif ne présentant pas d'effet inhibiteur vis-à-vis des coliformes.

Lévine a ensuite démontré que ce milieu réduisait le nombre de faux positifs en inhibant les cultures de bactéries sporulées gazeuses.

Principe :

Le Laurylsulfate de sodium inhibe le développement de la flore secondaire contaminante. Le développement rapide des coliformes produit un dégagement gazeux issu de la fermentation du lactose. Celui-ci est piégé grâce à une cloche en verre nommée cloche de Durham.

En raison de son excellent pouvoir nutritif, ainsi qu'à la présence de tampons phosphates, le bouillon Laurylsulfate permet aux coliformes de se développer rapidement et de produire un dégagement gazeux important par fermentation du lactose, même avec de faibles inoculum.

✗ **Tryptone-sel (TS)**

Tryptone	1,0 g
Chlorure de sodium	8,5 g
Eau distillée	1000 ml

Le bouillon tryptone-sel est un diluant destiné à la préparation des suspensions-mères de laits en poudre et concentrés, de produits laitiers, des coquillages marins vivants et des autres produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est également utilisé pour effectuer des dilutions décimales.

Principe :

Le chlorure de sodium permet d'obtenir une solution isotonique, c'est-à-dire une solution ayant la même tension osmotique partout. La tryptone assure la revivification des microorganismes ayant subi des traitements subléthaux, c'est-à-dire qui risquent de provoquer leur mort.

x eau peptonée Exempt d'Indole :

Tryptone	10 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

Ce milieu est surtout utilisé au cours du test de Mackenzie pour l'identification d'*Escherichia coli* par la production d'indole.

Principe :

L'Eau Peptonée exempt d'Indole permet la culture des germes ne présentant pas d'exigences particulières.

En aérobiose, *Escherichia coli* dégrade le tryptophane en indole par l'intermédiaire d'une tryptophanase. L'indole produit est révélé par le réactif de Kovacs.

x Bouillon EC :

Tryptone	20 g
Lactose	5 g
Sels biliaires n°3	1.5 g
Phosphate dipotassique	4 g
Phosphate monopotassique	1.5 g
Chlorure de sodium	5 g
Eau distillée	1000 ml

Le bouillon EC est un milieu d'enrichissement sélectif utilisé pour la recherche d'*E.coli* et des coliformes dans les échantillons alimentaires et tous prélèvements susceptibles d'en contenir.

Principe :

La présence de sels biliaires assure l'inhibition des microorganismes Gram positif et certains Gram négatif mais vont au contraire permettre la croissance d' *E.coli* et des coliformes.

La tryptone et le lactose constituent respectivement les ressources azotées et énergétiques pour la croissance d'*E.coli*.
Les phosphates permettent de tamponner le milieu de façon à augmenter sa capacité de récupération.

✗ **Milieu BiMedia (laboratoire SY-LAB) :**

Milieu impédancemétrie prêt à l'emploi contenant:

- Digestat enzymatique de caséine
- Extrait de levure
- Chlorure de sodium
- Laurylsulfate de sodium
- Tryptone
- Lactose
- Eau distillée

Principe :

Une peptone optimisant les variations de conductance dues à l'activité métabolique bactérienne ;

Du lactose métabolisé par les seuls microorganismes possédant une β -galactosidase,

(les macro - molécules que sont la peptone et le lactose permettent d'optimiser les variations de conductance en fonction de leur dégradation en composés électriquement chargés. Ce qui augmente la conductance du milieu en fonction du développement des *Escherichia coli*.)

Du Laurylsulfate de sodium, inhibiteur de la flore compétitive ;

Du chlorure de sodium qui améliore la vitesse de multiplication des coliformes pendant la phase de croissance exponentielle.

✗ **Réactif de KOVACS :**

- n-Butanol
- Acide chlorhydrique
- Diméthylamino-4-benzaldéhyde

Principe :

De nombreux microorganismes peuvent décomposer en acide pyruvique, ammoniacque et indole, le tryptophane abondamment présent dans les peptones tryptiques.

L'indole réagit avec le diméthylamino-4-benzaldéhyde en donnant un colorant rouge foncé.

Le tryptophane donnant aussi une réaction colorée avec le diméthylamino-4-benzaldéhyde, doit être séparé de l'indole. Ceci est obtenu avec du butanol qui extrait sélectivement l'indole.

Tableaux de valeurs :

espèce	Bactrac 83				NPP				V effluent
	bloc A	bloc B	moyenne géo	log	résultat 1	résultat 2	moyenne	log	
huîtres	13000	8000	1.0E+04	4.00	92000				1L
huîtres	39000	34000	3.6E+04	4.56		4900			1L
huîtres	50000	34000	4.1E+04	4.61	160000	54000	9.3E+04	4.97	1L
huîtres	49000	64000	5.6E+04	4.75	54000				1L
huîtres	5200	3800	4.5E+03	3.65	2800	3500	3.1E+03	3.50	100mL
huîtres	23000	17000	2.0E+04	4.30	28000	92000	5.1E+04	4.71	100mL
huîtres	18000	16000	1.7E+04	4.23	24000	14000	1.8E+04	4.26	100mL
huîtres	13000	10000	1.2E+04	4.06					100mL
moules	2400	3900	3.1E+03	3.49	2400	790	1.4E+03	3.14	1 mL
moules	430	5100			790	1400	1.1E+03	3.02	1mL
moules	2800	9600	5.2E+03	3.72	790	3300	1.6E+03	3.21	1 mL
moules	2300	590	1.2E+03	3.08	1100	490	7.3E+02	2.87	1mL
huîtres	1700	1000	1.3E+03	3.12	1100	790	9.3E+02	2.97	1,5 mL
huîtres	3100	3100	3.1E+03	3.49	1300	330	6.5E+02	2.82	1,5 mL
huîtres	790	1600	1.1E+03	3.05	790	1300	1.0E+03	3.01	1,5 mL
huîtres	1800	1500	1.6E+03	3.22	490	1300	8.0E+02	2.90	1,5 mL
huîtres	89 (<130)	320	3.2E+02	2.51					1 mL
huîtres	1200	<130			49	170	9.1E+01	1.96	1mL
huîtres	41 (<130)	110	1.1E+02	2.04	170	230	2.0E+02	2.30	1 mL
huîtres		1000			490	490	4.9E+02	2.69	1mL
huîtres	100000	83000	9.1E+04	4.96	>160000	160000	1.6E+05	5.20	1L
huîtres	73000	52000	6.2E+04	4.79	92000	160000	1.2E+05	5.08	1L
huîtres	37000	38000	3.7E+04	4.57	54000	92000	7.0E+04	4.85	1L
huîtres	190000	2.0E+05	1.9E+05	5.29					1L
huîtres	12000	14000	1.3E+04	4.11	13000	7900	1.0E+04	4.01	150 mL
huîtres	31000	28000	2.9E+04	4.47	92000	35000	5.7E+04	4.75	150 mL
huîtres	27000	28000	2.7E+04	4.44	35000	35000	3.5E+04	4.54	150mL
huîtres	26000	29000	2.7E+04	4.44	24000	13000	1.8E+04	4.25	150 mL
huîtres	2300	3500	2.8E+03	3.45	490	490	4.9E+02	2.69	1,8 Ml
huîtres	430	1500	8.0E+02	2.90	490	1100	7.3E+02	2.87	1,8 Ml
huîtres	920	5500	2.2E+03	3.35	1300	1300	1.3E+03	3.11	1,8 Ml
huîtres	640	1400	9.5E+02	2.98	490	460	4.7E+02	2.68	1,8 Ml
huîtres	1000	1600	1.3E+03	3.10	460	940	6.6E+02	2.82	1,8 Ml
huîtres	810	1100	9.4E+02	2.97	790	330	5.1E+02	2.71	1,8 Ml
huîtres	2000	730	1.2E+03	3.08	1700	410	8.3E+02	2.92	35mL
huîtres	1900	1700	1.8E+03	3.25	400	1300	7.2E+02	2.86	35mL
huîtres	1000	1500	1.2E+03	3.09	410	790	5.7E+02	2.76	35mL
huîtres	3000	2600	2.8E+03	3.45	1700	700	1.1E+03	3.04	35mL
huîtres	2300	3600	2.9E+03	3.46	480	1700	9.0E+02	2.96	80mL
huîtres	3500	3900	3.7E+03	3.57	1700	5400	3.0E+03	3.48	80mL
huîtres	1800	2200	2.0E+03	3.30	9200	5400	7.0E+03	3.85	80mL
huîtres	4500	5300	4.9E+03	3.69	700		7.0E+02	2.85	80mL

- 1 résultat non compris dans les limites de détection, ou de catégorie NPP non acceptable
- différence entre NPP et Bactrac supérieure à 0.5 log

Figure 11 : ensembles des valeurs obtenues pour le Bac Trac 83.

bac trac 84				résultat NPP				
bloc A	bloc B	moyenne géo	log	résultat 1	résultat 2	moyenne	log	V effluent
11000	6600	8.5E+03	3.93	92000				1L
43000	29000	3.5E+04	4.55		4900			1L
55000	30000	4.1E+04	4.61	180000	54000	9.3E+04	4.97	1L
83000	55000	6.8E+04	4.83	54000				1L
10000	3800	6.2E+03	3.79	2800	3500	3.1E+03	3.50	100mL
27000	12000	1.8E+04	4.26	28000	92000	5.1E+04	4.71	100mL
26000	12000	1.8E+04	4.25	24000	14000	1.8E+04	4.26	100mL
18000	non conf	1.6E+04						100mL
3400	4000	3.7E+03	3.57	2400	790	1.4E+03	3.14	1mL
3200	1100	1.9E+03	3.27	790	1400	1.1E+03	3.02	1mL
4100	6400	5.1E+03	3.71	790	3300	1.6E+03	3.21	1mL
1700	3600	2.5E+03	3.39	1100	490	7.3E+02	2.87	1mL
2900	710	1.4E+03	3.16	1100	790	9.3E+02	2.97	1,5 mL
1600	1300	1.4E+03	3.16	1300	330	6.5E+02	2.82	1,5 mL
2700	1600	2.1E+03	3.32	790	1300	1.0E+03	3.01	1,5 mL
2500	770	1.4E+03	3.14	490	1300	8.0E+02	2.90	1,5 mL
530	37(<130)							1mL
950	450	6.5E+02	2.82	49	170	9.1E+01	1.96	1mL
450	1300	7.6E+02	2.88	170	230	2.0E+02	2.30	1mL
170	760	3.6E+02	2.56	490	490	4.9E+02	2.69	1mL
140000	84000	1.1E+05		>180000	160000	1.6E+05	5.20	1L
87000	70000	7.8E+04	4.89	92000	160000	1.2E+05	5.08	1L
48000	38000	4.3E+04	4.63	54000	92000	7.0E+04	4.85	1L
160000	200000	1.8E+05	5.25					1L
14000	16000	1.5E+04	4.18	13000	7900	1.0E+04	4.01	150 mL
42000	26000	3.3E+04	4.52	92000	35000	5.7E+04	4.75	150 mL
33000	25000	2.9E+04	4.46	35000	35000	3.5E+04	4.54	150mL
34000	29000	3.1E+04	4.50	24000	13000	1.8E+04	4.25	150 mL
1100	5100	2.4E+03	3.37	490	490	4.9E+02	2.69	1,8 MI
1300	1500	1.4E+03	3.15	490	1100	7.3E+02	2.87	1,8 MI
1500	1300	1.4E+03	3.15	1300	1300	1.3E+03	3.11	1,8 MI
1200	1400	1.3E+03	3.11	490	460	4.7E+02	2.68	1,8 MI
1500	1400	1.4E+03	3.16	460	940	6.6E+02	2.82	1,8 MI
1800	1900	1.8E+03	3.27	790	330	5.1E+02	2.71	1,8 MI
2100	1900	2.0E+03	3.30	1700	410	8.3E+02	2.92	35mL
960	1100	1.0E+03	3.01	400	1300	7.2E+02	2.86	35mL
1100	1100	1.1E+03	3.04	410	790	5.7E+02	2.76	35mL
2100	1300	1.7E+03	3.22	1700	700	1.1E+03	3.04	35mL
3500	4700	4.1E+03	3.61	480	1700	9.0E+02	2.96	80mL
4300	3800	4.0E+03	3.61	1700	5400	3.0E+03	3.48	80mL
1700	2100	1.9E+03	3.28	9200	5400	7.0E+03	3.85	80mL
5400	7100	6.2E+03	3.79	700		7.0E+02	2.85	80mL

- 1 résultat non compris dans les limites de détection, ou de catégorie NPP non acceptable
- différence entre NPP et Bactrac supérieure à 0.5 log

Figure 12 : ensemble de valeurs obtenues pour le Bac Trac 84.