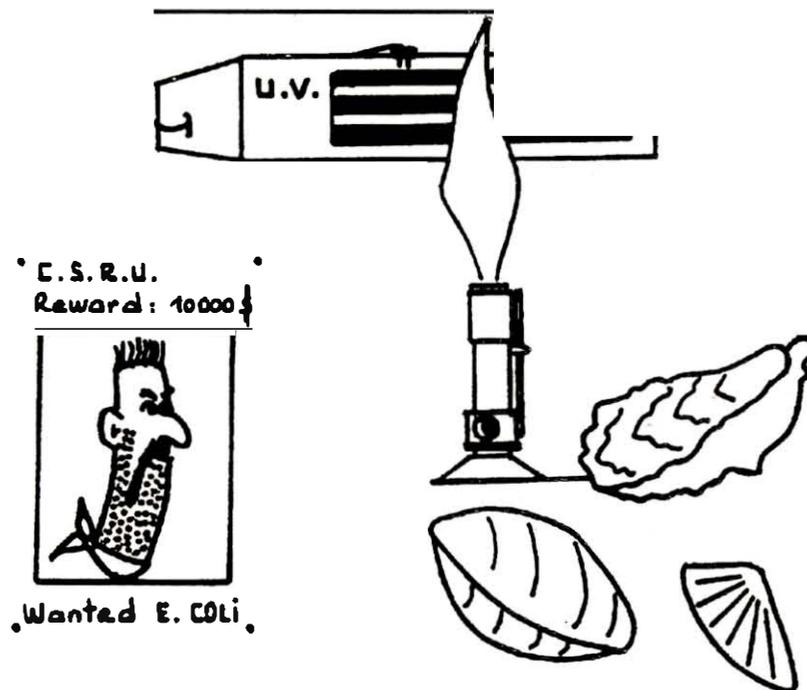


DENOMBREMENT RAPIDE DES COLIFORMES DANS LES COQUILLAGES

EFFICACITE DES MILIEUX A1 - M & MUG

Patrick MONTFORT



IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



INSTITUT FRANCAIS DE RECHERCHE POUR L'EXPLOITATION DE LA MER

Adresse : IFREMER 13 rue de Kerose Le Roudouic 29110 CONCARNEAU

DIRECTION DES RESSOURCES VIVANTES

DEPARTEMENT CONTROLE ET SUIVI DES
RESSOURCES ET DE LEUR UTILISATION

STATION/LABORATOIRE CONCARNEAU

AUTEURS (S) : Patrick MONTFORT		CODE : DRV-89.027-CSRU/ CONCARNEAU
TITRE : DENOMBREMENT RAPIDE DES COLIFORMES DANS LES COQUILLAGES <i>EFFICACITE DES MILIEUX A1 - M & MUG</i>		date : tirage nombre : Nb pages : Nb figures : Nb photos :
CONTRAT (intitulé) N° _____		DIFFUSION libre <input type="checkbox"/> restreinte <input type="checkbox"/> confidentielle <input type="checkbox"/>

RESUME

Le dénombrement des coliformes fécaux constitue la référence en matière d'évaluation de la salubrité des zones conchylicoles, de la qualité des bivalves destinés à la consommation humaine. Chacun jugera de l'intérêt et de l'efficacité que peut présenter une investigation diligente en ce domaine. Or, les techniques microbiologiques utilisées à l'heure actuelle se révèlent incompatibles avec ces objectifs voire avec les impératifs des laboratoires. Nous avons donc entrepris de tester deux nouveaux milieux (A1-M et MUG) afin de juger de leur fiabilité. L'étude statistique fait apparaître une corrélation étroite entre le milieu A1-M et le bouillon BLBV, nous confortant dans la poursuite de cette application à savoir l'évaluation de la fréquence du nombre de faux positifs et faux négatifs. Cette ultime étape devrait nous permettre de formuler un avis circonstancié sur l'opportunité d'une substitution à la méthode normalisée.

mots clés : Conchyliculture, salubrité, microbiologie, coliformes, technique



1 - GENERALITES - OBJECTIFS

2 - CARACTERES GENERAUX DES COLIFORMES

3 - METHODOLOGIE

3.1 - METHODE BLBU

3.2 - METHODE A1M

3.3 - METHODE MUG

4 - RESULTATS - INTERPRETATION

4.1 - TABLEAUX DES RESULTATS

4.2 - REPARTITION EN POURCENTAGES

4.3 - ANALYSE STATISTIQUE

4.3.1 - PROTOCOLE MATHEMATIQUE

4.3.2 - COMPARAISON BLBU/A1M

4.3.3 - CORRELATION BLBU/A1M

4.3.4 - COMPARAISON BLBU/MUG

4.3.5 - CORRELATION BLBU/MUG

5 - DISCUSSION - CONCLUSION

6 - BIBLIOGRAPHIE

7 - ANNEXES

7.1 - COMPOSITION DU MILIEU BLBU ET DILUANT

7.2 - COMPOSITION DU MILIEU A1 M

7.3 - COMPOSITION DU MILIEU MUG

7.4 - SENSIBILITE DE LA METHODE MUG

7.5 - PROTOCOLE ANALYTIQUE

1 - GENERALITES - OBJECTIFS

Les germes pathogènes tels salmonelles, shigelles, vibrions, yersinia, etc... sont susceptibles de contaminer les coquillages et en conséquence engendrer des toxi-infections alimentaires dont le seuil de gravité dépend des facteurs propres à l'individu (âge, état général) d'une part et des paramètres intrinsèques aux micro-organismes d'autre part (souches incriminées, taux de concentration bactérienne).

Toutefois, la recherche et l'identification de ces germes potentiellement dangereux présents dans le milieu marin sont relativement délicates, de technique complexe et d'un coût élevé. Aussi s'est-on attaché à mettre en évidence d'autres bactéries, indicatrices de la présence probable de germes pathogènes dont l'origine fécale est le plus fréquemment mise en cause.

Le suivi et le contrôle de la qualité bactériologique des coquillages reposent donc sur le dénombrement des germes témoins de contamination fécale dont les caractéristiques essentielles sont ainsi définies :

- Spécificité de l'habitat fécal
- Mise en évidence d'autant plus aisée que la quantité de germes est plus importante
- Résistance analogue aux germes pathogènes dans le milieu récepteur
- Technique aisée à mettre en oeuvre et fiabilité des résultats

Deux groupes de bactéries, les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux ont été retenus dans ce but avec néanmoins une plus grande signification apportée par le premier groupe cité.

La technique normalisée nécessite indubitablement une lourdeur analytique incompatible avec les contraintes du laboratoire et les impératifs de santé publique. Le but de cette étude sera donc de tenter de remédier à ces inconvénients et d'évaluer voire améliorer la fiabilité de nouvelles techniques A1 modifié (A1-M) et Méthyl4Umbelliféryl Glucuronide (MUG) afin de les substituer à la méthode standard. Les avantages majeurs que présentent ces procédés peuvent se résumer ainsi :

- Réduire les délais entre le prélèvement et les résultats.
- Alléger la technique et ainsi dégager du temps agent à d'autres programmes.
- Assurer une organisation plus rationnelle au sein du laboratoire.

L'articulation de ce travail se fera en deux étapes successives, l'une destinée aux moyens de tests statistiques à déterminer la méthode la plus reproductible, l'autre plus qualitative chargée de confirmer la spécificité du milieu retenu (fréquence des faux positifs et faux négatifs), d'apprécier les différences éventuelles entre les espèces échantillonnées.

2 - CARACTERES GENERAUX DES COLIFORMES

Les coliformes sont des germes ubiquitaires, rencontrés dans l'intestin de l'homme mais que l'on retrouve également dans d'autres environnements (eau, air, sol). Sous ce terme, on regroupe les genres escherichia, klebsiella, citrobacter, enterobacter.

Ce groupe représenté par des bactéries appartenant à la famille des entérobactéries se caractérise par leur aptitude à fermenter le lactose avec production de gaz en 48h à 30 ou 37°C. Cependant, certaines souches de cette entité n'offrent pas toutes les qualités d'un bon indice de contamination fécale. Il a donc fallu augmenter la spécificité du test afin de bénéficier d'une meilleure assurance quant à l'origine de la pollution. Les coliformes fécaux, bacilles à gram négatif, asporulés, anaerobie-facultatifs, oxydase négatif, réduisant les nitrates en nitrites et fermentant le glucose, possèdent les caractéristiques de la famille des entérobactéries. Capables de fermenter le lactose à 44°C avec production de gaz, ils procurent une signification satisfaisante, renforcée par la faculté de certaines souches d'élaborer de l'indole à partir d'un acide aminé le tryptophane. Parmi les coliformes, seuls e.coli et quelques souches de klebsiella révèlent ces propriétés. Les principaux critères biochimiques de ce genre sont répertoriés dans le tableau 1.

3 - METHODOLOGIE

L'ensemble des techniques qui vont être développées dans cet essai du dénombrement des coliformes fécaux s'effectuent en milieu liquide selon la méthode du nombre le plus probable (méthode de Mac Grady) en trois séries de trois tubes (annexe 5).

3.1 - METHODE BOUILLON LACTOSE BILIE AU VERT BRILLANT (BLBV)

La préparation de l'échantillon de même que le protocole analytique font référence à la circulaire interministérielle du 25/04/88 relative au contrôle bactériologique des coquillages. Le dénombrement des bactéries fécales s'effectue dans le cas présent en deux étapes successives :

- Une première phase dite présomptive où l'on met en évidence les coliformes totaux.
- Une deuxième phase confirmative révélant les coliformes fécaux, indicateurs d'une souillure fécale.

3.2 - METHODE A1 MODIFIEE (A1-M)

Le milieu A1 a été élaboré par Andrews et Fresnell en 1972 pour la recherche quantitative des coliformes fécaux dans les eaux d'estuaires après incubation à 44.5°C pendant

TABLEAU 1 : CRITERES D'IDENTIFICATION BIOCHIMIQUES DES COLIFORMES

	ESCHERICHIA	KLEBSIELLA	ENTEROBACTER	CITROBACTER
GLUCOSE & GAZ	+	+	+	+
LACTOSE	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	d
INDOLE	+	d	-	-
RM	+	-	-	+
UP	-	+	+	-
CITRATE SIMMONS	-	+	+	+
MOBILITE	+	-	+	+
UREE	-	+	-	d
GELATINE	-	-	+ lent	-

. Toutes les espèces sont oxydase - , nitrate reductase

. d : Variable, irrégulier

24h. En 1978, Hunt proposa une modification en assurant un étuvage à 37°C pendant 3h suivi d'une incubation au bain-marie à 44.5°C pendant 21h. Par la suite, cette technique fut extrapolée aux coquillages. Andrews (1979), Hunt (1978) et Standrige (1981) estiment ce milieu modifié A1-M tout à fait fiable pour le dénombrement de la flore fécale dans la matière vivante. Kaysner (1987) quant à lui, indique que l'utilisation de ce milieu pour estimer la salubrité des huîtres est moins sûre du fait que des bactéries n'appartenant pas aux coli-formes peuvent également procurer des réactions positives (confirmation d'e.coli dans 57.5% des cas positifs).

3.3 - METHODE METHYL4 UMBELLIFERYL GLUCURONIDE (MUG)

L'utilisation d'un composé fluorescent pour la recherche d'e.coli a été rapporté par Mead au cours de l'année 1955. En 1976, Kilian et Bulow font état d'activités glycosidases parmi les entérobactéries et démontrent que la faculté β glucuronidase est spécifique d'e.coli. Feng et Hartman (1982) testèrent 633 souches d'entérobactéries parmi lesquelles 96% des e.coli, 17% des salmonelles et 40% des shigelles se révèlent positives, les autres genres ne démontrant aucune activité enzymatique. Le Minor montra que sur les 4000 souches examinées, 30% des salmonelles possèdent l'enzyme de dégradation. Récemment Littel remarque une activité glucuronidase parmi quelques espèces de streptocoques.

Le méthyl 4 umbelliféryl glucuronide introduit dans un milieu (liquide ou solide) est dégradé par l'enzyme d'e.coli et produit de l'umbelliférol glucuronide, composé qui fluoresce sous lumière uv à une longueur d'onde de 366nm. Divers auteurs ont souligné les avantages de cette technique :

- Gain de temps.
- sensibilité de la méthode (annexe 4).
- Détection des souches anaérogènes ou peu aérogènes (5% de la flore).
- Déceler des e.coli bien que d'autres germes masquent la production de gaz (p.vulgaris 1/10000).
- récupérer un plus grand nombre de bactéries stressées.

Cependant, quelques obstacles restent à éclaircir en fonction de la nature des produits échantillonnés et notamment le nombre de faux positifs dont les chercheurs évaluent le pourcentage respectivement à 4.8% pour Robinson (1984), 9% pour Feng et Hartman et seulement 3.8% selon Alvarez (1984). Peterson (1987) quant à lui estime les résultats significativement différents au seuil de 5%, les pourcentages variant entre 22% plus faibles et 92% plus élevés. Koburger et Miller (1985) annoncèrent des anomalies au cours de la détection d'e.coli dans les huîtres; ils émettent l'hypothèse qu'il ne serait pas possible d'incorporer le MUG directement dans le milieu Lauryl Sulfate Tryptose en raison des fausses réac-

tions inhérentes à l'enzyme endogène de l'huître.

4 - RESULTATS - INTERPRETATION

4.1 - TABLEAUX DES RESULTATS cf. tableaux 2 et 3

4.2 - REPARTITION DES RESULTATS EN POURCENTAGES cf. tableau 4 et 5

4.3 - ANALYSE STATISTIQUE

4.3.1 - DEMARCHE STATISTIQUE

L'approximation de la distribution à une courbe de Gauss conditionne le choix des tests à adopter et en conséquence leur puissance et corrélativement leur efficacité. L'estimation à une loi normale sera évaluée par la méthode graphique, plus rapide et tout aussi fiable (droite de Henry). La figure 2 montre que les données s'écartent notablement d'une droite. On préférera dans ces conditions opérer une transformation appropriée de la variable $X = \log X$. On remarquera cette fois (figure 3) que le tracé est approximativement linéaire d'où une assimilation de la distribution à une loi normale.

Dans le cadre de cet essai, nous allons déterminer dans un premier temps si les échantillons examinés appartiennent effectivement à la même population à l'aide de la comparaison des moyennes (méthode des couples utilisés pour les séries appariées), puis nous tenterons d'estimer le degré de liaison entre les techniques (méthode des moindres carrés).

TABLEAU 2 : RESULTATS COLIMETRIQUES DES COQUILLAGES
(NOMBRE CARACTERISTIQUE)

DATE	ESPECES	BLBU. CT	BLBU. CF	A1M24	A1M48	MUG24	MUG48
20/6/88	MOULE	333	330	331	331G 331GI	330 310	330F 330FG
20/6/88	MOULE	321	310	300	300 300	330 320	331 331
20/6/88	COQUE	330	310	010	210 210	331 331	332 332
20/6/88	MOULE	320	300	100	300 300	030 010	330 220
20/6/88	MOULE	333	320	110	310 310	330 320	330 320
27/6/88	OLIVE	333	333	333	333 333	333 333	333 333
27/6/88	OLIVE	333	333	333	333 333	333 333	333 333
27/6/88	MOULE	333	333	333	333 333	333 333	333 333
04/7/88	MOULE	310	210	330	331 321	330 310	330 320
04/7/88	H CREUSE	310	310	310	310 310	300 300	330 300
04/7/88	MOULE	330	310	320	320 320	330 320	333 320
04/7/88	PALOURDE	330	210 * 310 °	310	320 320	330 310	333 310
04/7/88	OLIVE	333	310 * 333 °	333	333 333	333 333	333 333
04/7/88	OLIVE	331	300 * 331 °	321	321 321	331 331	331 331
04/7/88	H CREUSE	330	300	000	310 310	320 220	330 330

08/8/88	H CREUSE	100	100	000	100 100	100 000	330 100
08/8/88	H CREUSE	320	320	310	310 310	311 000	311G 310FG
08/8/88	PALOURDE	310	100	100	100 100	010 010	330 210
08/8/88	MOULE	311	211	000	200 200	010 010	330 320
08/8/88	SPIRULE	100	100	000	100 100	030 000	130 100
08/8/88	CLAM	100	000	000	100 100	200 100	330 100
08/8/88	MOULE	000	000	000	000	030 000	030 000
22/8/88	MOULE	333	320	332	332 332	331 331	332 331
22/8/88	MOULE	333	330	331	333 321	333G 330FG	333G 330FG
22/8/88	H CREUSE	331	300	110	310 310	300 300	300 300
22/8/88	PALOURDE	320	200	110	310 300	320 220	333 320
22/8/88	H CREUSE	331	100	221	331 000	301 000	330 300
22/8/88	H CREUSE	320	000	010	110 000	300 G 020 F	300G 000FG
29/8/88	MOULE	333	322	331	331 331	332 212	332 332
29/8/88	MOULE	331	331	331	331 331	031FG 331G	332 332
29/8/88	H CREUSE	311	311	210	310 310	220 220	330 320

29/8/88	H CREUSE	320	310	310	330 330	331G 031FG	333G 332FG
29/8/88	SPIRULE	320	100	000	200 100	220 010	330 110
29/8/88	MOULE	321	200	000	100 000	030 010	330 010

G : GAZ+

I : INDOLE+

F : FLUORESCENCE+

* : LECTURE A 24 H

° : LECTURE A 48 H

TABLEAU 3: RESULTATS COLIMETRIQUES DES COQUILLAGES
(NOMBRE DE GERMES/100 ML)

POW	COQUIL	BLBU	A1M24	A1M48	MUG24	MUG48
1	MOULES	1440	2760	2760	258	1440
2	MOULES	258	138	138	558	2760
3	COQUES	258	24	90	2760	6600
4	MOULES	138	24	138	24	126
5	MOULES	558	42	258	558	558
6	OLIVES	14400	1740	14400	14400	14400
7	OLIVES	14400	14400	14400	14400	14400
8	MOULES	14400	14400	14400	14400	14400
9	MOULES	90	1440	900	258	558
10	H CREUSES	258	258	258	138	138
11	MOULES	258	558	558	558	558
12	PALOURDES	258	258	558	258	258
13	OLIVES	14400	14400	14400	14400	14400
14	OLIVES	2760	900	900	2760	2760
15	H CREUSES	138	10	258	126	1440
16	H CREUSES	24	10	24	10	24
17	H CREUSES	558	258	258	10	258
18	PALOURDES	24	24	24	10	90
19	MOULES	120	10	54	10	558
20	SPIRULES	24	10	24	10	24
21	CLAMS	10	10	24	24	24
22	MOULES	10	10	10	10	10
23	MOULES	558	6600	6600	2760	2760
24	MOULES	1440	2760	900	1440	1440
25	H CREUSES	138	42	258	138	138
26	PALOURDES	54	42	138	126	558
27	H CREUSES	24	168	10	10	138
28	H CREUSES	10	18	10	10	10
29	MOULES	1260	2760	2760	168	6600
30	MOULES	2760	2760	2760	78	6600
31	H CREUSES	450	90	258	126	558
32	H CREUSES	258	258	1440	78	6600
33	SPIRULES	24	10	24	24	42
34	MOULES	54	10	10	24	24

TABLEAU 4 : REPARTITION DES RESULTATS EN % (BLBV/A1-M)
 APRES CALCUL DE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 0.95

TOTAL	BLBV = A1-M		BLBV > A1-M		BLBV < A1-M	
	nombre	%	nombre	%	nombre	%
34	30	88	-	0	4	12

TABLEAU 5 : REPARTITION DES RESULTATS EN % (BLBV/MUG)
 APRES CALCUL DE L'INTERVALLE DE CONFIANCE A 0.95

TOTAL	BLBV = MUG		BLBV > MUG		BLBV < MUG	
	nombre	%	nombre	%	nombre	%
34	24	70.6	-	0	10	29.4

Figure 2: Normalite de la distribution

Fréq. Cumulée (%)

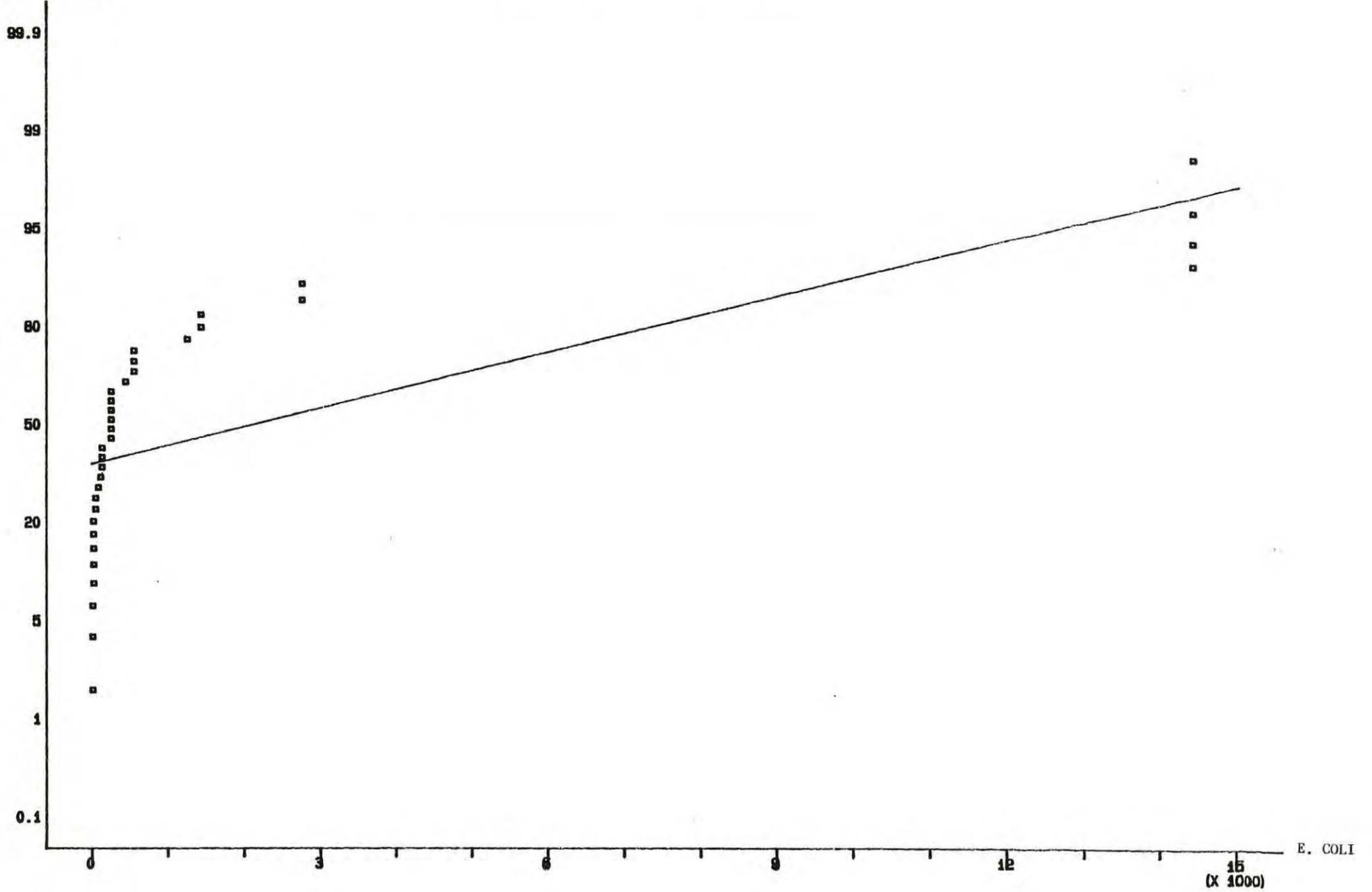


FIGURE 3 : Normalite X-logX

Fréq. Cumulée (%)

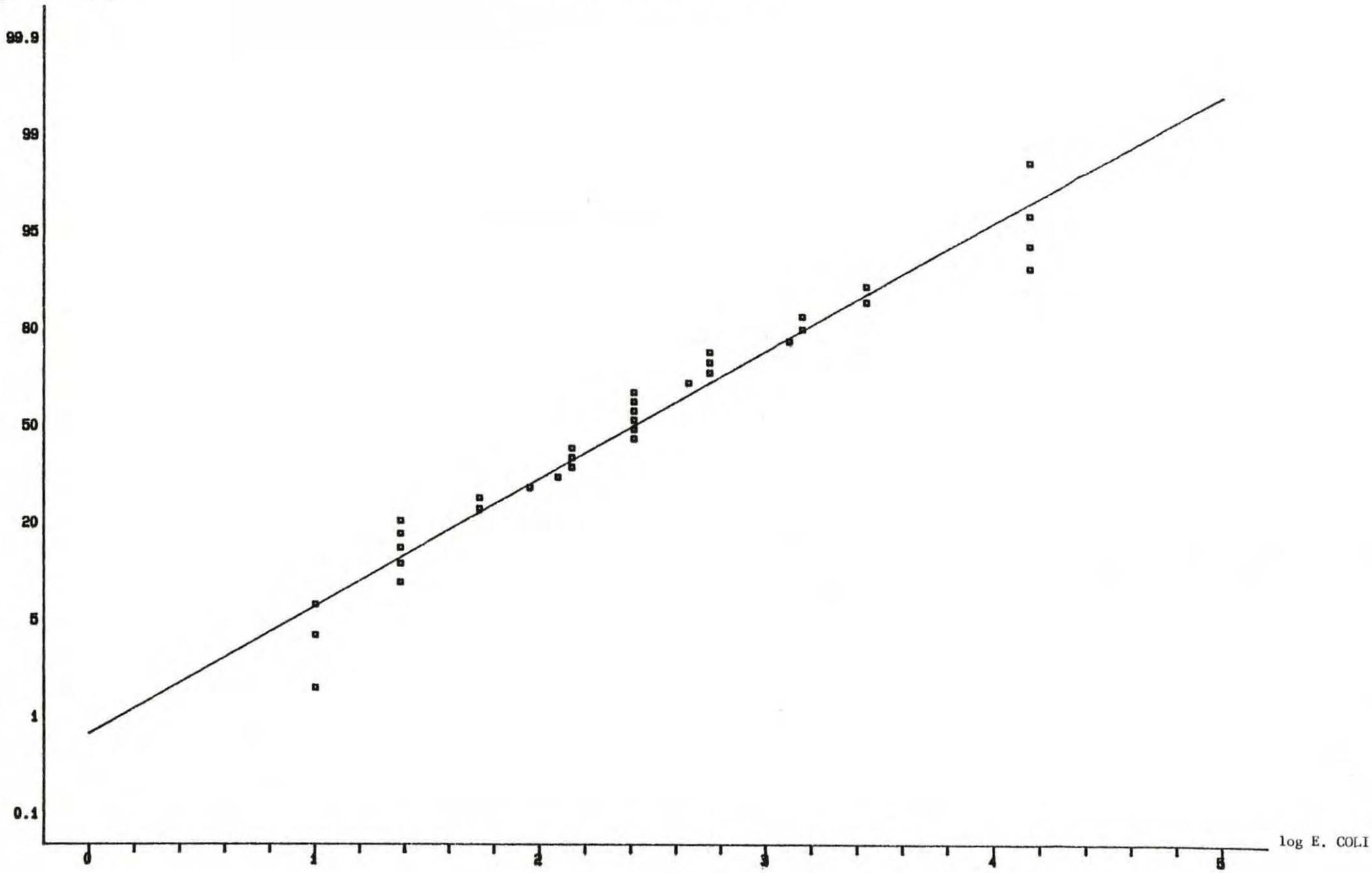


TABLEAU 6 : COMPARAISON DES MOYENNES BLBU/A1-M

$X_i = \log A - \log B$	N_i	$N_i X_i$	$N_i X_i^2$
-1.07191	1	-1.07191	1.148991
-1	1	-1	1
-0.746743	1	-0.746743	0.557625
-0.407485	1	-0.407485	0.166044
-0.380211	1	-0.380211	0.144560
-0.340538	1	-0.340538	0.115966
-0.335014	2	-0.670028	0.224469
-0.282546	1	-0.282546	0.079832
-0.271741	1	-0.271741	0.073843
0	13	0	0
0.204121	1	0.204121	0.041665
0.241593	1	0.241593	0.058367
0.271741	2	0.543482	0.147686
0.335014	2	0.670028	0.224469
0.346787	1	0.346787	0.120261
0.380211	1	0.380211	0.144560
0.457378	1	0.457378	0.209195
0.486666	1	0.486666	0.236844
0.732394	1	0.732394	0.536401
	34	-1.109	5.231

$$M = -1.109/34 = -0.0326$$

$$S^2 = 1/34 - 1(5.23 - (-1.109)^2/34) = 0.157$$

$$S^2/N = 0.157/34 = 0.00463$$

$$S/\sqrt{N} = 0.068$$

$$\epsilon = m - 0 / (S/\sqrt{N}) = 0.0326/0.068$$

$$\epsilon = 0.48$$

TABLEAU 7 : COMPARAISON DES MOYENNES BLBU/MUG

$X_i = \log A - \log B$	N_i	$N_i X_i$	$N_i X_i^2$
-1,407924	2	-2,815848	3,9645
-1,029289	1	-1,029289	1,05944
-1,018484	1	-1,018484	1,03731
-1,01424	1	-1,01424	1,02868
-0,792392	1	-0,792392	0,62788
-0,759668	1	-0,759668	0,57709
-0,719673	1	-0,719673	0,51793
-0,694275	1	-0,694275	0,48202
-0,667453	1	-0,667453	0,44549
-0,574031	1	-0,574031	0,32951
-0,380211	1	-0,380211	0,14456
-0,378635	1	-0,378635	0,14336
-0,335014	1	-0,335014	0,11223
-0,243038	1	-0,243038	0,05907
-0,093421	1	-0,093421	0,00873
0	14	0	0
0,039508	1	0,039508	0,00156
0,271741	1	0,271741	0,07384
0,335014	1	0,335014	0,11223
0,352183	1	0,352183	0,12403
	34	-10,517	10,849

$$M = -10,517/34 = -0,309$$

$$S^2 = 1/34 - 1(10,849 - (-10,517^2/34)) = 0,230$$

$$S^2/N = 0,230/34 = 0,00677$$

$$S/\sqrt{N} = 0,0823$$

$$\epsilon = m - 0 / (S/\sqrt{N}) = 0,309/0,0823$$

$$\epsilon = 3,75$$

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + bX$

Dependent variable: logA1M48

Independent variable: logBLBU

Parameter	Estimate	Standard Error	T Value	Prob. Level
Intercept	0.094368	0.192276	0.490794	.62692
Slope	0.981057	0.0743506	13.195	.00000

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	Prob. Level
Model	27.97770	1	27.97770	174.1082	.00000
Error	5.142126	32	.160691		
Total (Corr.)	33.119825	33			

Correlation Coefficient = 0.919098
 Std. Error of Est. = 0.400863

R-squared = 84.47 percent

Regression Analysis - Linear model: $Y = a + bX$

Dependent variable: logMUG48

Independent variable: logBLBU

Parameter	Estimate	Standard Error	T Value	Prob. Level
Intercept	0.514684	0.230434	2.23354	.03263
Slope	0.914965	0.0891058	10.2683	.00000

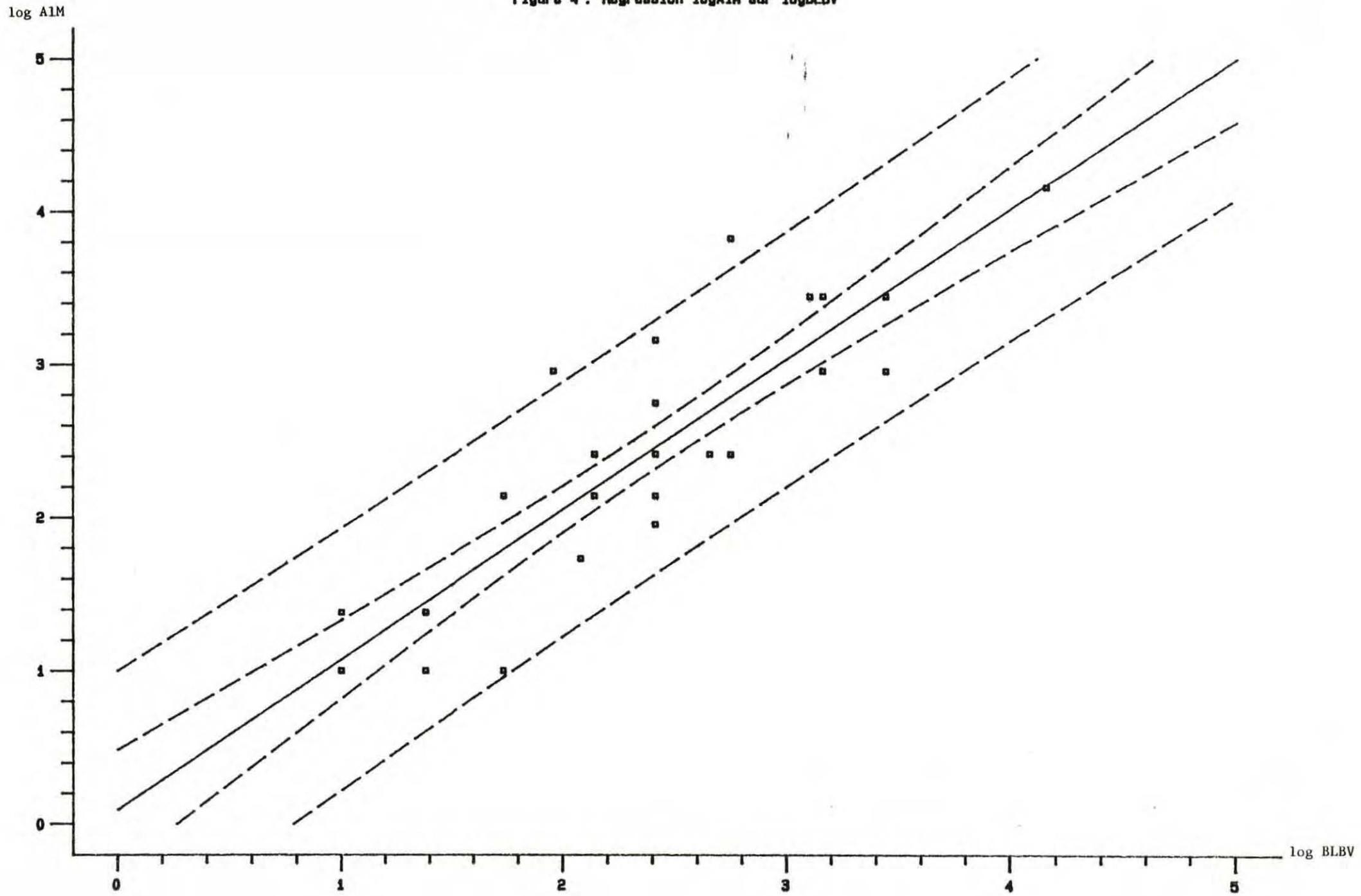
Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	Prob. Level
Model	24.33509	1	24.33509	105.4381	.00000
Error	7.385591	32	.230800		
Total (Corr.)	31.720677	33			

Correlation Coefficient = 0.875881
 Std. Error of Est. = 0.480416

R-squared = 76.72 percent

Figure 4 : Regression logA1M sur logBLBV



5 - DISCUSSION - CONCLUSION

Les résultats récapitulés au tableau 2 nous permettent de formuler quelques observations quant aux milieux testés. Tout d'abord, on signalera que la technique de référence employée de manière littérale peut engendrer de grossières erreurs en sous évaluant la contamination. En effet, les tubes Lac- et Indole+ en 24h considérés globalement comme négatifs peuvent se révéler positifs au bout de 48h d'incubation (Lac+ et Indole+). Ce mécanisme résulte d'une fermentation tardive du lactose par certaines souches d'e.coli (~ 5% des souches).

Le milieu A1-M décrit par les auteurs comme spécifique d'e.coli peut dans cette étude faire l'objet d'une certaine réserve compte-tenu de l'écart observé entre les tubes gazogènes d'une part et les tubes Indole+ d'autre part. S'agit-il là d'une suspicion non fondée de souches Indole- ou encore d'une difficulté de mise en évidence de cette amine de dégradation; la deuxième étape de cette étude devrait à cet égard nous fournir quelques éclaircissements. On peut d'ores et déjà signaler que la révélation de l'Indole sur ce milieu n'est pas aussi instantanée que sur l'eau peptonée probablement en raison de la composition du bouillon et notamment la présence d'une quantité de lactose qui perturberait l'activité enzymatique. Une agitation énergique du tube est quelquefois indispensable à l'apparition de l'anneau violet.

La technique MUG montre également des variations non négligeables entre les tubes Fluor+ et Gaz+. On émettra l'hypothèse de faux positifs (souches agazogènes) ou encore une multiplication de germes non coliformes. Quelques essais ponctuels d'identification ont permis de déterminer un certain nombre de faux négatifs sans pour autant apporter une estimation satisfaisante du pourcentage incriminé. Un handicap général aux trois techniques indubitablement accentué pour le milieu MUG est l'évaluation de la fluorescence dans la série la moins diluée, rendue délicate par l'importance de la matière organique. Plutôt que d'envisager un ensemencement de 1 - 0.1 - 0.01 ml qui du point de vue de l'expression des résultats nous procure un seuil de détection trop élevé ainsi qu'une fourchette trop large, nous nous proposons d'opérer une dilution de l'échantillon au 1/5 qui éviterait cet inconvénient.

Les tableaux 4 et 5 indiquant la répartition des résultats en pourcentage font apparaître une correspondance plus étroite de la technique A1-M avec la méthode BLBU (88% de résultats équivalents). Les 12% restants étant supérieurs, ce milieu serait enclin à privilégier davantage le consommateur.

Au regard des variations marquées entre 24 et 48h d'incubation, le traitement statistique proprement dit portera sur sur cette seconde période. Il en ressort que contrairement à la relation BLBU/A1-M, la comparaison des moyennes BLBU/MUG par la méthode des couples présente une différence significative. Cependant, les écarts observés se révèlent pratiquement négligeables pour être détectables par la technique en milieu liquide. Une régression li-

néaire des données montre un ajustement plus fiable entre les techniques A1-M et BLBU dont les caractéristiques de la droite sont: Pente 0.98 et ordonnée à l'origine 0.22. Cette droite dont la pente est proche de 1 et l'ordonnée à l'origine voisine de 0 est assimilable à une bissectrice qui se place dans l'intervalle de confiance de la droite de régression. Dans le cas présent la variable x étant entachée d'erreurs de mesure, l'estimation de la pente de la droite de régression se trouve biaisée (sous-estimée). Les limites des intervalles de confiance et le niveau de confiance auquel ils correspondent sont différents des valeurs calculées. Ceci peut expliquer les points observés extérieurs aux limites supérieures des intervalles calculés (fig. 4 et 5). La variance expliquée par la régression est de 84.5%, 77% pour la méthode MUG. Les coefficients de corrélation sont respectivement $R_1=0.92$ et $R_2=0.88$. Sans rejeter d'emblée la technique MUG, force est de constater que le milieu A1-M procure un meilleur ajustement avec la méthode standard. Malgré l'inconvénient qui repose sur la nécessité de transférer les tubes au bain-marie après trois heures d'étuvage, ce milieu semble fournir des résultats encourageants dans le dénombrement rapide des coliformes fécaux. Aussi, il nous paraît opportun de poursuivre les investigations engagées afin de mieux appréhender la spécificité du bouillon et en définitive conclure de manière objective quant à son éventuelle utilisation.

- 1- ANDREWS et FRESNELL
Rapid recovery of E.Coli from estuarine water.
Appl. and Environ. Microb. mars 1972 Vol.23n°3 - 521-523
- 2- ANDREWS, DIGGS et WILSON
Evaluation of a medium for the rapid recovery of E.Coli
from snellfish.
Appl. Microb. 1975 vol.29 - 130-131
- 3- ANDREWS, RURAN, Mc CLURE et GENTILE
Use of two rapid A1 methods for the recovery of fecal
coliforms and E.Coli from selected food types.
I. of Food Science 1979 Vol.44 n°1 - 289-293
- 4- HUNT et SPRINGER
Comparaison of two rapid test procedures with the
standard EC test for recovery of fecal coliform bacteria
from shellfish growing waters.
Ass. of Off. An. Chem. 1978 Vol.61 n°6 - 1317-1323
- 5- KAYSNER et WEAGANT
Limitations of the A1-M method for fecal coliforms
enumeration in the pacific oysters.
J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1987 Vol.70 n°3 - 935-937
- 6- SOGAARD
Acomparative study of the performance of four liquid
media for rapid enumeration of fecal coliforms food.
Microb. Assoc. Inter. in food
- 7- STANDRIGE et DELFUNO
A1 medium alternative technique for fecal coliforms
organism enumeration in chlorinated wastewater.
Appl. Environ. Microb. 1981 Vol.42 n°5 - 918-920
- 8- ROWSE
Evaluation of media use in rapid methods for the MPN
method of fecal coliforms in the Sydney rock oysters.
J. of Food Prot. Fév. 1981 Vol 44 n°2 - 134-136
- 9- YOOUIDHYA et FLEET
An evaluation of the A1 Most probable number and the
Anderson and Baird-Parker plate count method for
enumerating E.Coli in the Sydney rock oyster.
J. of Appl. Bact. 1981 Vol.50 - 519-528
- 10- ALVAREZ
Use of fluorogenis assays for the enumeration of E.Coli
from selected food.
J. of Food Science 1984 Vol.49 - 1186-1188
- 11- DALHEN et LINDE
Screening plate method for detection of bacterial β
glucuronidase.
Appl. Microb. Dec. 1973 Vol.26 n°6 - 863-866

- 12- FENG et HARTMAN
Fluorogenic assays for immediate confirmation of E.Coli.
Appl. Environ. Microb. Vol 43 n°5 - 1320-1329
- 13- KOBURGER et MILLER
Evaluation of a fluorogenic MPN procedure for determining
E.Coli in oysters.
J. of Food Prot. Vol.48 n°3 - 244-245
- 14- PETERSON,NIERMAN,RUDE et PEELER
Comparaison of AOAC method and fluorogenic (MUG) assay
for enumerating E.Coli in foods.
J. of Food Science Vol.52 n°2 - 409-410
- 15- ROBINSON
Evaluation of a fluorogenic assay for detection of E.Coli
in foods.
Appl. Environ. Microb. Vol 48 n°2 - 285-288
- 16- BUESCHKENS et STILES
E.Coli variants for gaz and indole production at elevated
incubation temperatures.
Appl. Environ. Microb. Vol 48 n°3 - 601-605
- 17- HUSSONG,DAMARE,WEINER et COLWELL
Bacteria associated with false positive MPN coliform test
results for shellfish and estuaries.
Appl. Environ. Microb. Vol.41 n°1 - 35-45
- 18- MOTTES,Mc PHEARSON et DE PAOLA
Comparison of three international methods with APHA
method for enumerating of E.Coli in estuarine waters and
shellfish.
J.of Food Prot. Vol 47 n°7 - 557-561
- 19- SILLIKER,GABIS et MAY
Comparative studies on determination of coliforms using
the MPN procedure
J. of Food Prot. Vol 42 n°8 -638-644

ANNEXE 1 : COMPOSITION DU BOUILLON A LA BILE
ET AU VERT BRILLANT

PRINCIPE

La bile et le vert brillant inhibent fortement la croissance de la flore secondaire indésirable et notamment les proteus. La fermentation du lactose avec dégagement gazeux, témoin de la présence des coliformes, est mise en évidence au moyen de cloches de Durham.

COMPOSITION

PEPTONE.....	10 g
LACTOSE.....	10 g
BILE DE BOEUF.....	20 g
VERT BRILLANT.....	0.0133 g
EAU.....	1000 ml

EMPLOI - INTERPRETATION

Dissoudre 60 g/l puis répartir en tubes à raison de 10 ml.
Autoclaver 15 mn à 121°C.

Les tubes présentant un dégagement gazeux franc dans la cloche de Durham seront considérés comme positifs.

ANNEXE 2 : COMPOSITION DU MILIEU A1-M

PRINCIPE

Le milieu A1-M considéré comme spécifique d'e.coli par Andrews et Fresnell permet de mettre en évidence la fermentation des sucres (lactose et salicine) par production de gaz recueilli dans une cloche de Durham.
Le triton X 100, ammonium quaternaire joue le rôle d'inhibiteur de la flore secondaire.
L'adjonction de tryptophane confirme la présence d'e.coli par formation d'indole.

COMPOSITION

TRYPTONE.....	20 g
LACTOSE.....	5 g
CHLORURE SODIUM.....	5 g
SALICINE.....	0.5 g
TRITON X 100.....	1 ml
TRYPTOPHANE.....	1 g
EAU.....	1000 ml

EMPLOI - INTERPRETATION

Dissoudre 31.5 g de milieu dans un litre d'eau distillée.
Répartir dans des tubes 16x160 à raison de 10 ml par tubes.
Stériliser à l'autoclave 10 mn à 121°C.

Etuver les échantillons 3h à 37°C puis les transférer dans un bain-marie à 44.5°C pendant 21h voire 45h.
Les tubes présentant simultanément du gaz dans la cloche de Durham et la formation d'un anneau rouge cerise en surface seront considérés comme positifs.

ANNEXE 3 : COMPOSITION DU MILIEU FLUOROCULT (BLBU-MUG)

PRINCIPE

La mise en évidence d'enzyme spécifique permet d'obtenir une identification rapide des bactéries. Les enzymes recherchées sont dite "enzymes constitutives", leur activité reste indépendante de la croissance bactérienne. Exceptées quelques rares souches de salmonelles et de shigelles, e.coli est la seule espèce parmi les entérobactéries qui est pourvue de l'enzyme β -Dglucuronidase. Cette dernière a la propriété de scinder le substrat 4 méthyl umbelliféryl β -Dglucuronide (MUG) pour produire de l'umbelliférone, composé fluorescent sous lumière UV (366 nm). L'apparition d'une fluorescence permet d'apprécier la présence d'e.coli.

Le développement de la flore secondaire est largement inhibé par la bile et le vert brillant. La mise en évidence d'e.coli se fait par observation d'une fluorescence sous lumière UV du milieu après incubation. Une fermentation avec dégagement gazeux et un résultat positif du test de l'indole permettent de confirmer la présence d'e.coli.

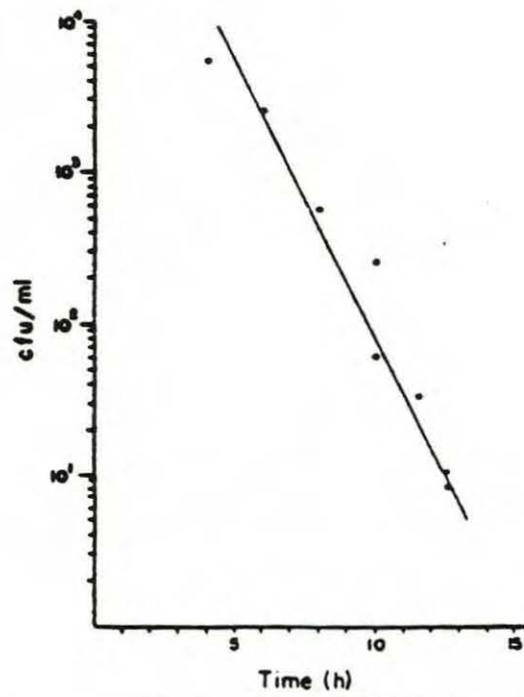
COMPOSITION

PEPTONE.....	10 g
LACTOSE.....	10 g
BILE DE BOEUF.....	20 g
VERT BRILLANT.....	0.0133 g
L-TRYPTOPHANE.....	1 g
4METHYL UMBELLIFERYL.....	0.1 g
EAU.....	1000 ml

EMPLOI - INTERPRETATION

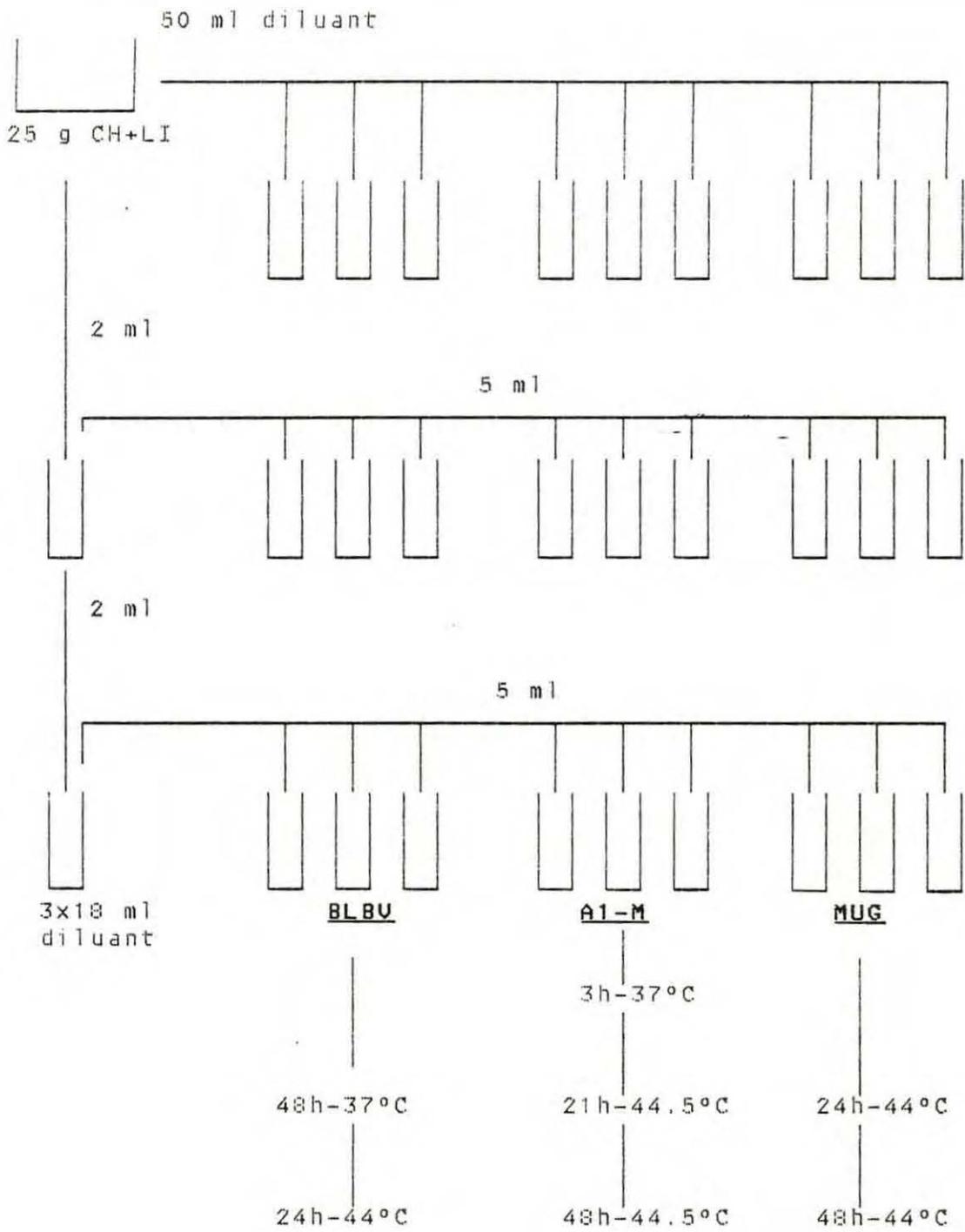
Dissoudre 61.5 g pour un litre d'eau distillée.
Distribuer en tubes à raison de 10 ml par tube.
Stériliser à l'autoclave 15 mn à 121°C.
Incuber 16 à 24 h à 37°C éventuellement à 44°C.
Lecture à l'aide d'une lumière UV de longueur voisine de 366 nm. L'observation d'une fluorescence bleu clair dans le bouillon correspond à la présence d'e.coli. L'apparition de gaz dans la cloche de Durham est caractéristique des coliformes et d'e.coli en particulier.

ANNEXE 4 : SENSIBILITE DE LA METHODE MUG



Relationship between the initial cell count and the time that fluorescence occurred in LTB-MUG medium.

ANNEXE 5 : PROTOCOLE ANALYTIQUE



Année 1988

DRV-88.030-RH	Utilisation de l'écho-intégration en recherche halieutique (analyse de 5 campagnes effectuées dans le Golfe de Gascogne de 1983 à 1987).	Nantes
DRV-88.031-RA	Mise au point d'une stratégie de pré-grossissement intensif en nurserie de naissains de palourdes (<i>Ruditapes philippinarum</i>) et d'huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>) dans la région de la Baie de Bourgneuf.	Bouin
DRV-88.032-RA	Surveillance écologique et halieutique Site de PENLY - Année 1987	Nantes
DRV-88.033-RH	Elevage, Pêche et Programmes d'étude des stocks du «Lambi» <i>Strombus gigas</i> (Gastéropode : Strombidae) dans deux pays de la Caraïbe : îles Turks et Caicos, Porto-Rico.	Brest

Année 1989

DRV-89.001-RH	Chaîne de traitement des statistiques de pêche maritime	Boulogne
DRV-89.002-CSR	Etude sanitaire (1986-1987) de la petite mer de Gavres (Morbihan)	La Trinité
DRV-89.003-CSR	Etude relative à la qualité des eaux conchylicoles : la Basse Normandie	Ouistreham
DRV-89.004-RA	Contrat de Plan Etat-Région Bretagne Relance de l'huître plate Rapport de synthèse 1984-1988	La Trinité/ La Tremblade
DRV-89.005-RA	Contrat de Plan Etat-Région Bretagne Relance de l'huître plate Rapport d'avancement des travaux 1988	La Trinité/ La Tremblade
DRV-89.006-RA	Elevage larvaire extensif de bar (<i>Dicentrarchus labrax</i>) en milieu naturel dans les marais salés de l'Ile de Ré (Côte Atlantique Française)	Crema-l'Houmeau
DRV-89.007-CSR	Etude sanitaire (1987-1988) de la côte de Guidel-Ploemeur-Larmor-Plage (Morbihan)	La Trinité
DRV-89.008-RA	Application des recherches de fertilisation et stimulation dans l'élevage de la crevette impériale (<i>Penaeus japonicus</i>)	Crema-l'Houmeau
DRV-89.009-RH	Etude d'une gestion optimale des pêcheries de langoustine et de poissons démersaux en mer celtique Tome 1	Lorient

DRV-89.010-RH	Etude d'une gestion optimale des pêcheries de langoustine et de poissons démersaux en mer celtique Tome 2	Lorient
DRV-89.011-RH	Etude d'une gestion optimale des pêcheries de langoustine et de poissons démersaux en mer celtique Tome 3	Lorient
DRV-89.012-RA	Situation zoosanitaire des coquillages en méditerranée (1985-1987)	Sète
DRV-89.013-RA	La biodéposition dans les aires ostreicoles. Son rôle dans la concentration de la matière organique et de contaminants potentiels; son impact sur le sédiment	Crema-L'Houmeau
DRV-89.014-RA	Aération-circulation en bassins d'élevage intensif de crevettes peneides. Profils remarquables des courbes de teneur en oxygène dissous.	Tahiti
DRV-89.015-RH	Les ressources halieutiques de l'étang de Berre	Sète
DRV-89.016-RA	Dévasement expérimental de tables conchylicoles dans l'étang de Thau. Impact sur le milieu et sur les mollusques	Sète
DRV-89.017-RH	Surveillance écologique et halieutique Site de Flamanville - Année 1987	Nantes
DRV-89.018-RA	Estimation des stocks de moules dans le Pertuis breton en 1988	L'Houmeau
DRV-89.019-RA	Etude des potentialités aquacoles de la plaine du Gol	La Réunion
DRV-89.020-RA	Développement de l'aquaculture tropicale à l'IFREMER	Tahiti
DRV-89.021-RA/SDA	Projet d'élevage du loup en mer : Etude technico-économique du prégrossissement et du grossissement	Palavas
DRV-89.022-RA/SDA	Projet d'élevage du loup : Etude technico-économique de l'écloserie	Palavas
DRV-89.023-RA	Guide du télécaptage de larves d'huîtres <i>Crassostrea Gigas</i>	Ouistreham
DRV-89.024-RA	Tri d'alevins de loup et de dorade au stade juvénile (0,2 - 12 g)	Palavas
DRV-89.025-RA	Filtration biologique adaptée à l'élevage larvaire de pénéides	Tahiti
DRV-89.026-RA	Estimation du captage d'huîtres plates sur coques de moules en suspension, en 1988.	La Trinité
DRV-89.027-CSRU	Dénombrement rapide des coliformes dans les coquillages <i>Efficacité des milieux AI - M & MUG</i>	Concarneau

LISTE DE DIFFUSION RIDRV

=====

- 2 exemplaires SDP/NANTES
- 2 exemplaires SDP/BREST
- 2 exemplaires DRV/PUB/PARIS
- Directions opérationnelles :
 - * DERO/PARIS
 - * DIT/PARIS
 - * DREC/PARIS
- tous Centres France métropolitaine et Outre Mer :
 - * Boulogne (1ex)
 - * Brest (1ex)
 - * Nantes (2ex)
 - * Toulon (1ex)
 - * Tahiti (1ex)
- tous Chefs de Département DRV :
 - * RA/PARIS
 - * RH/NANTES
 - * CSRU/NANTES
 - * UVP/NANTES
 - * SDA/PARIS
- toutes stations DRV France métropolitaine et Outre mer :
 - * ARCACHON
 - * BOUIN
 - * BOULOGNE
 - * BREST
 - * CONCARNEAU
 - * CREMA L'HOUMEAU
 - * NOIRMOUTIER
 - * OUISTREHAM
 - * PALAVAS
 - * ST MALO
 - * LA ROCHELLE
 - * LA TREMBLADE
 - * LA TRINITE
 - * LORIENT
 - * CORSE
 - * SETE
 - * GUYANE
 - * MARTINIQUE
 - * REUNION
 - * ST PIERRE ET MIQUELON