



*Essai de validation interne  
de la méthode de  
dénombrement des  
Escherichia coli présumés par  
impédancemétrie*

Laboratoire Ifremer DEL  
de la Tremblade

Rapport de stage réalisé par  
Vincent BILLOT

*Juin 2001*



# Remerciements

Je tiens particulièrement à remercier Mr Roger Kantin, chef du laboratoire DEL de la Tremblade, pour m'avoir permis de réaliser mon stage au sein de son laboratoire.

Je voudrais également remercier mon maître de stage, Mr Christian Auger, responsable Assurance Qualité, pour sa planification et son suivi durant ma période de stage, ainsi que pour l'ensemble de ses conseils lors de l'interprétation des résultats et lors de la réalisation de ce rapport.

Je remercie l'ensemble des techniciens du laboratoire de microbiologie : Mr Olivier Courtois, responsable du laboratoire de microbiologie, et responsable métrologie, pour ses conseils lors du déroulement des manipulations, ainsi que pour son aide et sa disponibilité tout au long de ce stage. Mr Didier Roesberg, Mr Jean-Côme Piquet et Melle Elodie Muraro, techniciens en microbiologie, pour leurs aides.

Je tiens également à remercier Mr Daniel Masson, adjoint au chef de laboratoire et responsable assurance qualité suppléant, ainsi que Melle Alice Vanhoutte-Brunier, en stage de DEA, pour leurs aides en matière de statistiques.

Je remercie plus généralement la totalité des personnes travaillant à l'Ifremer de la Tremblade, ainsi que les stagiaires, qui ont contribué au bon déroulement de ce stage.

Enfin, je tiens à remercier mon tuteur IUT, Mr Gérald Thouand, Maître de conférence, pour les conseils apportés lors de l'élaboration de ce rapport.



# Résumé

Le laboratoire de microbiologie de l'Ifremer DEL<sup>(\*)</sup> de la Tremblade utilise deux méthodes pour les dénombrements des *Escherichia coli* présumés dans la Chair et le Liquide Intervalvaire<sup>(\*)</sup> (C.L.I.) des coquillages marins vivants : la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP), utilisée en tant que méthode de référence, et la méthode par impédancemétrie, employée en routine.

Afin d'obtenir des résultats d'analyses microbiologique opposables au tiers, la Direction de l'Ifremer a demandé l'accréditation<sup>(\*)</sup> Cofrac<sup>(\*)</sup> du laboratoire pour ces deux méthodes. C'est dans cette optique que des essais de validation interne de la méthode par impédancemétrie par rapport à la méthode NPP devaient être effectués. Pour cela nous avons réalisé des comparaisons statistiques sur les résultats obtenus par les deux méthodes, pour l'analyse de six lots de coquillages (moules et huîtres).

Le travail a consisté à conduire, au sein d'une équipe de microbiologistes, des essais depuis la mise en contamination jusqu'à l'analyse des résultats. Ceci correspond aux actions principales suivantes : préparation des milieux de culture, préparation des matériels et verreries, préparation des coquillages, ensemencement et repiquage, lecture, décontamination, lavage des verreries et matériels.

L'étude a montré que pour les séries de dénombrements des *Escherichia coli* présumés<sup>(\*)</sup> obtenus pour les deux méthodes, les résultats obtenus sur un même lot de coquillages ne sont pas statistiquement corrélés. Toutefois, les comparaisons effectuées entre les résultats obtenus dans chacun des deux bains-marie du dispositif de dénombrement par impédancemétrie montrent que les résultats statistiques sont équivalents depuis les réglages apportés au niveau des systèmes de contrôle des températures.

# Sommaire

REMERCIEMENTS.....	1
RÉSUMÉ.....	2
SOMMAIRE.....	3
INTRODUCTION.....	5
PRÉSENTATION DE L'IFREMER.....	6
I- HISTORIQUE.....	6
II- PRÉSENTATION DE LA DIRECTION DE L'ENVIRONNEMENT ET DE L'AMÉNAGEMENT LITTORAL (DEL).....	7
III- LES PRINCIPAUX PARTENAIRES DE L'IFREMER.....	8
1/ L'Administration des Affaires Maritimes.....	9
2/ Les Sections Régionales Conchylicoles (SRC).....	9
3/ La Direction des Services Vétérinaires (DSV).....	9
4/ Les Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS), service Santé et Environnement.....	9
5/ Les Directions Départementales de l'Équipement (DDE).....	9
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	10
I- LES INDICATEURS DE QUALITÉ MICROBIOLOGIQUE RECHERCHÉS.....	10
1/ Caractéristiques générales.....	10
2/ L'indicateur recherché.....	10
II- PRÉSENTATION DE LA MÉTHODE PAR IMPÉDANCEMÉTRIE.....	11
1/ Principe de la méthode.....	11
2/ Avantages et inconvénients de cette méthode.....	12
3/ Calibrage de la méthode par impédancemétrie par rapport à la méthode NPP.....	13
MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	14
I- CHOIX DE L'ESPÈCE DE COQUILLAGES.....	14
II- CONTAMINATION DES COQUILLAGES.....	14
III- TRANSPORT DES ÉCHANTILLONS.....	14
IV- RÉCEPTION ET NETTOYAGE DES ÉCHANTILLONS.....	15
V- OUVERTURE DES COQUILLAGES ET PRÉPARATION DE LA SOLUTION MÈRE DE CLI.....	15
VI- PRÉPARATION DES MILIEUX DE CULTURE.....	16
1/ Méthode par impédancemétrie.....	16
2/ Méthode du nombre le plus probable.....	16
3/ Diluant pour broyat.....	18
VII- ENSEMENCEMENT.....	18
1/ Méthode par impédancemétrie.....	18
2/ Méthode du nombre le plus probable.....	19
3/ Quantité de solution mère nécessaire.....	19
VIII- MISE EN INCUBATION DES MILIEUX ENSEMENCÉS.....	20
1/ Méthode par impédancemétrie (système Malthus).....	20
2/ Méthode du nombre le plus probable (NPP).....	21
IX- LECTURE.....	21
1/ Méthode par impédancemétrie.....	21
2/ Méthode du nombre le plus probable (NPP).....	22
X- NETTOYAGE DES MATÉRIELS.....	23
XI- DESCRIPTION DES TESTS STATISTIQUES.....	24
1/ test de Kruskal-Wallis.....	24



---

2/ Test de Kolmogorov-Smirnov.....	26
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>27</b>
I- COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS POUR LES ANALYSES EFFECTUÉES DU 07/04/2001 AU 16/05/2001	27
1/ Comparaison pour la vérification de la corrélation entre les deux méthodes.....	27
2/ Comparaison des résultats obtenus dans les deux bains-marie du système par impédancemétrie.....	28
II- COMPARAISON DES RÉSULTATS OBTENUS POUR LES ANALYSES EFFECTUÉES DU 25/04/2000 AU 16/06/2000	
.....	29
1/ Comparaison pour la vérification de la corrélation entre les deux méthodes.....	29
2/ Comparaison des résultats obtenus dans les deux bains-marie du système par impédancemétrie.....	30
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>32</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>33</b>
<b>GLOSSAIRE.....</b>	<b>34</b>
<b>TABLE DES ANNEXES.....</b>	<b>35</b>

# Introduction

Le laboratoire Ifremer DEL de la Tremblade en Charente Maritime a mis en place un programme de mise sous assurance qualité de ses analyses microbiologiques. Afin de pouvoir fournir à ses partenaires et tutelles des résultats d'analyses microbiologique concernant les coquillages marins vivants opposables aux tiers, la Direction de l'Ifremer a décidé de demander l'accréditation des deux méthodes employées pour le dénombrement des *Escherichia coli* présumés; à savoir la méthode par impédancemétrie (système Malthus) utilisée en routine et la méthode du nombre le plus probable (méthode NPP) employée en tant que technique de référence. Cette demande impose donc la validation de la méthode par impédancemétrie par rapport à la méthode NPP, afin que les résultats obtenus par l'une ou par l'autre de ces méthodes soient équivalents au regard de la pollution microbiologique du littoral.

Des analyses ont été menées l'an dernier selon les deux méthodes dans le but de déterminer si la corrélation était établie, et également entre les deux bains-marie de la méthode par impédancemétrie. Les comparaisons effectuées ont conduit aux conclusions suivantes : la corrélation entre les deux méthodes a été observée, par contre les résultats obtenus dans les deux bains-marie utilisés pour la méthode par impédancemétrie étaient significativement différents. De nouveaux réglages du système Malthus ayant été effectués, il devenait nécessaire, dans le cadre de la demande d'accréditation, de vérifier si la corrélation entre les deux méthodes était maintenue, et de vérifier si les deux bains-marie conduisaient à des résultats statistiquement identiques.



# Présentation de l'Ifremer

## I- Historique

L'Ifremer (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) est un établissement public à caractère industriel et commercial créé par le décret du 5 juin 1984. Il résulte de la fusion du Centre National d'Exploitation pour les Océans (CNEXO) et de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (ISTPM). L'Ifremer est placé sous la tutelle :

- du ministère de l'Education nationale de la Recherche et de la Technologie ;
- du ministère de l'Agriculture et de la Pêche ;
- du ministère de l'Équipement, du Logement et des Transports.

L'Ifremer est composé de 78 laboratoires ou services de recherche répartis dans 24 stations ou centres sur le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM.

L'Ifremer est installé à la Tremblade depuis sa création. D'autres organismes l'ont précédé :

- 1913 : Création de l'AEIO (Association d'Encouragement des Industries Ostréicoles et conchylicoles française) à la Tremblade
- 1918 : Création de l'OSTPM (Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes)
- 1928 : Le laboratoire de l'AEIO devient à la Tremblade l'OSTPM.
- 1953 : Transformation de l'OSTPM en ISTPM (Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes)
- 1954 : L'inspection sanitaire et le laboratoire de biologie sont individualisés à la station de la Tremblade.
- 1984 : Création de l'Ifremer.

L'Ifremer est ainsi organisée en six directions différentes :

- Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral (DEL)
- Direction des Ressources Vivantes (DRV)
- Direction des Recherches Océanographiques (DRO)
- Direction de la Technologie Marine et des Systèmes d'Information (DTMSI)
- Direction des Navires océanographiques et de l'Intervention Sous-marine (DNIS)

- Direction des Moyens et Opérations Navals (DMON)

L'Ifremer est présent dans 24 sites répartis sur tout le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM. L'institut comprend 5 centres (Boulogne, Brest, Nantes, Toulon et Tahiti) et d'une vingtaine de stations rattachées à ces centres. Le siège est situé à Paris (Issy-les-Moulineaux).

La station Ifremer de la Tremblade est implantée en Charente Maritime, dans le premier bassin conchylicole d'Europe, et son aire de compétence s'étend de la rive gauche de la Charente à la rive droite de la Gironde. La station est composée de 3 laboratoires :

- Le laboratoire côtier DEL, dont les missions principales consistent à mettre en œuvre des réseaux de surveillance garantissant aux conchyliculteurs et aux consommateurs une qualité des eaux et des coquillages ;
- La Direction des Ressources Vivantes/Laboratoire Conchylicole de Poitou-Charentes (DRV/LCPC) qui étudie, entre autres, la croissance des coquillages afin d'améliorer les productions du bassin de Marennes Oléron ;
- La Direction des Ressources Vivantes/Génétique Aquaculture Pathologie (DRV/GAP) qui travaille notamment sur les caractères génétiques des huîtres creuses et plates dans le but d'améliorer les populations présentes dans le bassin. Elle contrôle aussi les agents pathogènes.

## II- Présentation de la Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral (DEL)

La DEL contribue à la connaissance des écosystèmes côtiers, au développement d'outils, de méthodes et de concepts utilisables par les acteurs de l'environnement. Elle est aussi le principal réseau d'observation et de surveillance de la qualité du littoral métropolitain, en mettant en œuvre les réseaux de surveillance garantissant aux conchyliculteurs et aux consommateurs des informations fiables concernant la qualité des eaux et des coquillages. On distingue :

- le RNO (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin) qui a pour objectifs d'évaluer, d'une part, les niveaux et les tendances des polluants et des paramètres généraux de la qualité du milieu et, d'autre part, l'état de santé de la faune et de la flore ;
- le REPHY (Réseau de surveillance du Phytoplancton et des Phycotoxines) qui surveille le phytoplancton toxique. Les résultats du REPHY sont communiqués à l'administration des Affaires Maritimes qui peut alors décider d'interrompre la mise en marché des coquillages ;
- le REMI (Réseau de surveillance microbiologique) qui évalue les niveaux de contamination microbiologique du milieu, en particulier dans les bassins conchylicoles. Les coquillages (huîtres, moules, coques, ...) servent



directement d'indicateurs de pollution. Les concentrations en *E coli* présumés trouvées dans la Chair et le Liquide Intervalvaire (C.L.I.) des coquillages indique ou non la présence de rejets fécaux dans les eaux côtières. De plus, les contaminations en coliformes fécaux importantes peuvent indiquer un risque de présence d'autres bactéries pathogènes pour l'homme et de virus qui, eux, sont encore à l'heure actuelle difficilement détectables.

Par ailleurs, afin de garantir des résultats d'analyses fiables, la DEL a mis en place une cellule qualité et lancé un programme de mise sous assurance qualité de ses laboratoires côtiers. La mise sous assurance qualité d'un laboratoire ou d'une partie de ses activités consiste, dans le principe, à mettre en œuvre les moyens matériels, documentaires (procédures normalisées ou validées, enregistrements, ...) et organisationnels permettant de prouver que les analyses ont été réalisées suivant toutes les conditions imposées par les normes et les procédures en découlant, du prélèvement jusqu'à la diffusion des résultats.

Etre sous assurance qualité impose de pouvoir retrouver, même des années après, toutes les preuves tangibles du déroulement d'une analyse d'un échantillon donné (provenance des produits utilisés, conditions de fabrication des milieux de culture, enregistrements des conditions analytiques, ...).

Cette démarche devrait prochainement aboutir à l'accréditation, par le COFRAC, du laboratoire DEL de la Tremblade, du moins pour ses activités d'analyses microbiologiques. Dans le but de répondre à cet objectif d'accréditation par le COFRAC, un laboratoire de microbiologie répondant aux normes de qualité a été construit en 1998 par le laboratoire côtier DEL de la Tremblade. Il a été conçu suivant le principe de la marche en avant qui impose qu'il n'y ait ni croisements entre les différents échantillons et milieux de cultureensemencés, ni retours en arrière. Chaque type de manipulation se fait donc dans une salle qui lui est spécialement attribuée. Le laboratoire comprend une salle de préparation des milieux, une salle d'ensemencement, une salle de repiquage. La disposition des salles les unes par rapport aux autres est telle que l'échantillon « tourne » au fur et à mesure de son traitement sans jamais croiser un autre échantillon qui ne serait pas au même stade d'analyse (ceci afin d'éviter toute contamination). Ce laboratoire fonctionne avec trois analystes ainsi qu'une employée à contrat à durée déterminée, qui, pour répondre aux exigences de la norme, doivent suivre un plan de formation continue.

### III- Les principaux partenaires de l'Ifremer

Les principaux partenaires de l'Ifremer sont ceux qui participent à la gestion du domaine public maritime, aux contrôles de la qualité du milieu marin, à la surveillance des rejets de polluants divers, à la protection de la santé publique et à la qualité des produits consommés.



## **1/ L'Administration des Affaires Maritimes.**

Elle gère notamment les problèmes liés à l'exploitation des ressources vivantes, notamment les cultures marines.

## **2/ Les Sections Régionales Conchylicoles (SRC)**

Elles regroupent des membres de syndicats professionnels locaux et régionaux et elles ont diverses missions. Elles doivent formuler des recommandations en vue d'une bonne gestion des intérêts conchylicoles locaux et d'une meilleure adaptation de la production aux besoins du marché.

## **3/ La Direction des Services Vétérinaires (DSV)**

Elle regroupe trois grands départements :

- santé et protection animales,
- hygiène alimentaire,
- installations classées pour la protection de l'environnement.

Au sein du département de l'hygiène alimentaire, une section est uniquement consacrée à l'hygiène des produits de la mer.

## **4/ Les Directions Départementales des Affaires Sanitaires et Sociales (DDASS), service Santé et Environnement.**

Les missions des DDASS comprennent, entre autres, la protection sanitaire de l'environnement et le contrôle des règles d'hygiène. Ce service surveille la qualité bactériologique des eaux de baignade aussi que les gisements naturels de coques faisant l'objet d'une pêche de loisirs.

Elles effectuent également les contrôles sanitaires du fonctionnement des stations d'épuration ainsi qu'une assistance technique : le SATESE (Service d'Assistance Technique aux Exploitants de Station d'Épuration) qui est aujourd'hui limité à la validation de l'autocontrôle qu'effectuent les exploitants de stations d'épuration depuis 1996.

## **5/ Les Directions Départementales de l'Équipement (DDE)**

Les Services Maritimes de Navigation (SMN) des DDE et leurs Cellules de Qualité des Eaux Littorales (CQEL) supervisent les autorisations de rejets à la mer et contrôlent la qualité des eaux jusqu'à la limite d'influence des eaux marines. Ils ont en charge de piloter l'élaboration du Schéma de Mise en Valeur de la Mer : c'est un document constitué de cartes et de textes visant à rassembler des informations utiles et à donner les principes directeurs de l'aménagement du littoral de la zone concernée (aménagement physique, urbain, économique, ...). Contrairement à son prédécesseur, le Schéma d'Aptitude à l'Utilisation de la Mer (SAUM), ce document a une valeur réglementaire : il est donc opposable aux tiers.



# Analyse bibliographique

## I- Les indicateurs de qualité microbiologique recherchés

### 1/ Caractéristiques générales

Les coquillages, de par leur pouvoir de filtration, d'absorption<sup>(\*)</sup> et d'accumulation des microorganismes, sont traditionnellement considérés comme des témoins de la qualité des eaux de production. Cependant, les connaissances sur les cinétiques d'accumulation et d'épuration des microorganismes par les coquillages montrent que ces deux mécanismes sont dépendants de nombreux facteurs: nature et concentration des microorganismes, temps d'exposition aux contaminants, température et salinité de l'eau...

La recherche de ces microorganismes est souvent longue et coûteuse, c'est pourquoi le contrôle microbiologique des coquillages est fondé sur le dénombrement des microorganismes les plus faciles à rechercher, représentatifs de l'aptitude à la consommation, c'est à dire indicateurs de l'hygiène de la production et du risque de présence de germes pathogènes : ces microorganismes sont dénommés indicateurs ou marqueurs.

### 2/ L'indicateur recherché

Il existe trois groupes d'indicateurs, qui ont été particulièrement étudiés : les indicateurs bactériens de contamination fécale , les indicateurs spécifiques des bactéries du milieu marin et les indicateurs de contamination virale.

Nous allons nous intéresser plus particulièrement aux indicateurs de contamination fécale. En effet, c'est dans cette catégorie d'indicateurs que l'on trouve l'espèce *Escherichia coli* dit *E.coli*.(bactérie découverte en 1855 par Thomas ESCHERICH) Cette espèce bactérienne appartient à la flore sous dominante aéro-anaérobie. Les caractéristiques de *E.coli* sont les suivantes : il fermente le glucose, le mannitol et le lactose avec production de gaz, à 45°C ; il reste relativement sensible aux antibiotiques ; il dégrade le tryptophane<sup>(\*)</sup> en indole ; il réduit les nitrates en nitrites.

Nous pouvons cependant remarquer qu'il existe également la flore dominante anaérobie et la flore fluctuante aéro-anaérobie.

Pour des raisons de facilité de recherche et d'identification au laboratoire, c'est essentiellement dans la flore aéro-anaérobie, bien que non dominante, qu'ont été choisis les indicateurs dont le plus représentatif est *E.coli*.

La méthode NPP est basée sur la détection de l'indole et *Escherichia coli* est quasiment le seul coliforme à pouvoir produire l'indole à partir du tryptophane. L'autre bactérie capable de produire de l'indole dans les mêmes conditions de culture que *E.coli* est la *Klebsiella pneumoniae*, par ailleurs rarement rencontrée. Pour cette raison, les coliformes fécaux détectés sont nommés "*Escherichia coli* présumés".

## II- Présentation de la méthode par Impédancemétrie

### 1/ Principe de la méthode

Les techniques reposant sur la mesure de l'impédance sont maintenant reconnues comme des méthodes pratiques pour la mesure de la croissance ou de l'activité microbienne. Les premières expérimentations dédiées à la mesure impédancemétrique en microbiologie ont été rapportées par Stewart en 1899. Il décrit les variations d'impédance durant les fermentations de sang et de sérum, et suggéra que les croissances microbiennes pourraient être quantifiées par des mesures électriques. De manière simplifiée, l'impédance d'un matériau conducteur tels les milieux biologiques peut être définie comme la résistance à un courant alternatif le traversant.

En biologie, les microorganismes produisent généralement des métabolites ionisés durant leur croissance. Ces métabolites modifient la concentration en ions du milieu. La variation de conductance d'un milieu de culture évolue en fonction de la biomasse microbienne. Ce phénomène est lié à la dégradation de macromolécules peu chargées (protéines...) en molécules plus petites et ionisées (peptides, acides aminés). (voir schéma 1)

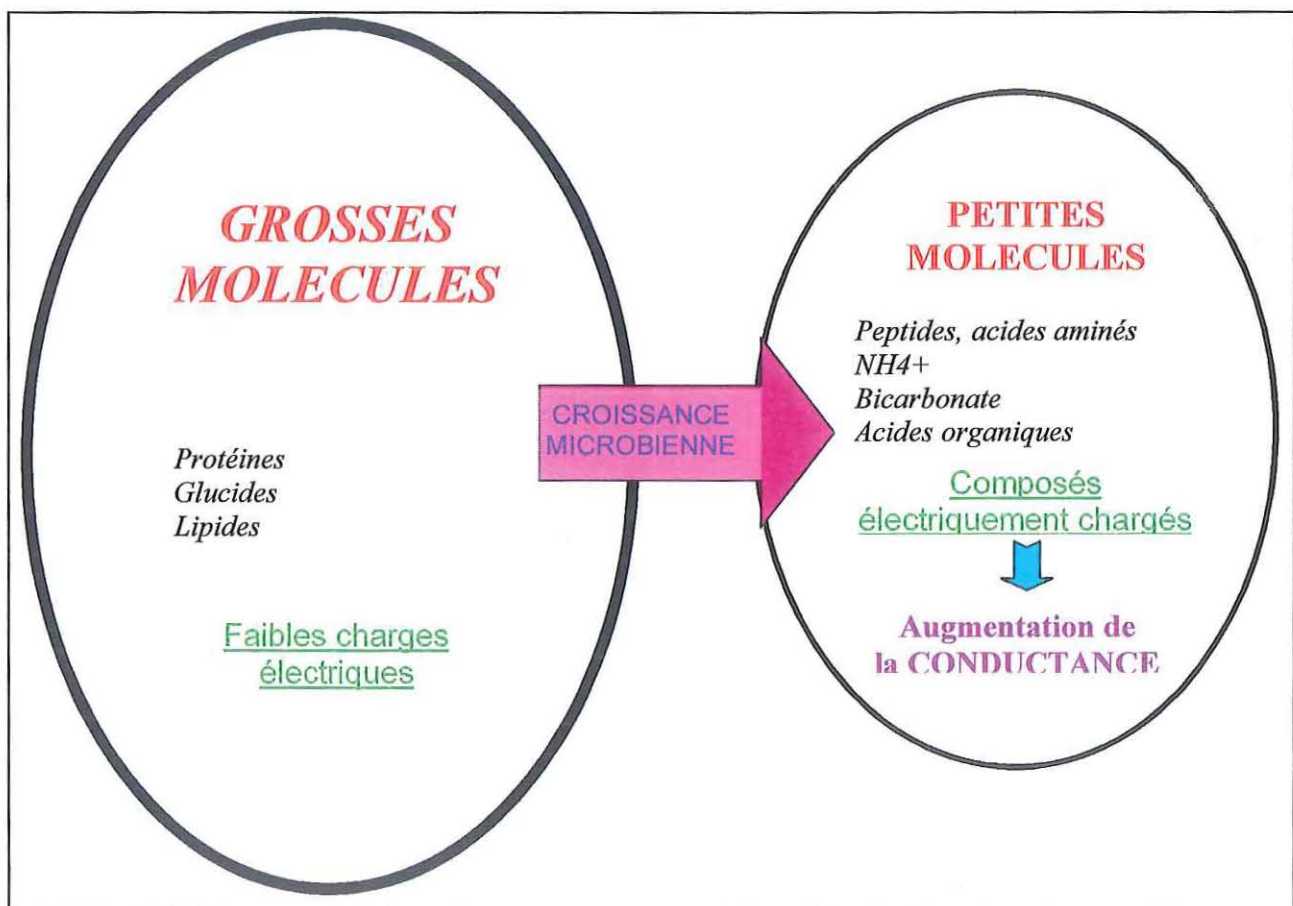


Schéma 1 : effet de la croissance microbienne sur la conductance des milieux de culture



Cette technique permet :

1. une détection rapide des contaminations microbiennes,
2. une mesure de la concentration microbienne,

La plupart des techniques utilisant l'impédancemétrie visent le premier de ces objectifs, à savoir la détection de contaminant microbien. En pratique, cette détection s'effectue à l'aide du temps de détection (TD) ; ce dernier correspond au temps pour lequel la variation du paramètre considéré dépasse une valeur prédéterminée. Par étalonnage préalable, le temps de détection est corrélé à une concentration microbienne. Plus celle-ci est élevée, plus le temps de détection est court.

Certains microorganismes ne peuvent pas être détectés par ces techniques, soit parce que leur croissance n'induit pas une variation de conductance suffisante, par la formation de produit non ionisé par exemple, soit parce que leur croissance nécessite un milieu de culture spécifique non électriquement adapté à ce genre de mesure. Il est alors possible de détecter ces microorganismes en mesurant le dioxyde de carbone qu'ils produisent.

Quatre appareils commerciaux essentiellement sont disponibles sur le marché pour les mesures impédancémétriques. Le MALTHUS (développé par Malthus Instruments Ltd), le RABIT (Rapid Automated Bacterial Impedance Technique, développé par Don Withley Sc.Ltd), Le BACTOMETER (développé par bioMérieux-Vitek) et le BACTRAC (développé par SyLab).

Remarque : environ 600 appareils sont utilisés de par le monde, dont une soixantaine en France.

Les systèmes de dénombrement des microorganismes par la méthode impédancémétrique sont utilisés pour le contrôle qualité en agro-alimentaire et en industries laitières, par exemple pour déterminer la contamination initiale du lait, ou après pasteurisation. La contamination des eaux de surface ainsi que la qualité des effluents d'installations de traitement d'eau résiduaire peuvent également être mesurées par cette technique.

## 2/ Avantages et inconvénients de cette méthode

Cette méthode présente l'avantage d'une manipulation simple et rapide, car elle n'exige pas de dilutions et demande seulement deux répliquats par échantillon. De plus, le temps de lecture est court, puisqu'il suffit de 4 à 12 heures d'incubation suivant le degré de pollution fécale. En général, les lectures sont effectuées 9 heures après la mise en incubation des cellules ou, pour des raisons de commodité, le lendemain, les résultats ayant été automatiquement enregistrés au niveau du logiciel.

Au niveau de la capacité analytique, la méthode par impédancemétrie permet de réaliser 60 à 65 analyses par semaine (soit trois fois plus qu'avec la méthode classique NPP).

Mais la méthode par impédancemétrie pose un problème de fiabilité. Ce système repose en effet sur de nombreux intermédiaires électroniques et informatiques (électrodes de platine, contacts électriques qui relient les cellules au système électronique équipant chaque bain-marie, câbles qui relient les bains-marie à l'ordinateur, traitement informatique des données, ...) qui peuvent présenter des défaillances lors de l'analyse, notamment pour les composants en permanence dans une atmosphère humide (cas des contacts et de l'électronique contenus dans les bains-marie). La méthode par impédancemétrie présente enfin l'inconvénient majeur de ne pas être reconnue au niveau européen contrairement à la méthode NPP, ce qui pose un problème à l'Ifremer pour l'accréditation du laboratoire. Le laboratoire doit en effet prouver que les résultats obtenus avec cette méthode sont équivalents à ceux obtenus avec la méthode de référence NPP.

### **3/ Calibrage de la méthode par impédancemétrie par rapport à la méthode NPP**

La méthode par impédancemétrie est calibrée sur la méthode NPP. Dans le cas de l'Ifremer, le calibrage de l'appareil Malthus, s'est fait à partir de l'analyse d'un grand nombre d'échantillons (200), réalisée à la fois par NPP et par impédancemétrie. Cette manipulation avait pour but d'établir une relation mathématique entre la grandeur caractéristique des courbes et le nombre de bactéries correspondant en utilisant les méthodes de régression statistiques (les résultats détaillés des régressions linéaires sont consignés dans l'annexe 1). Par la suite, une comparaison des résultats entre les différents laboratoires d'Ifremer a été menée afin de s'assurer que tous les appareils Malthus donnaient bien un résultat équivalent.



# Matériels et méthodes

## I- choix de l'espèce de coquillages

Trois espèces de coquillages ont été utilisées durant ces essais :

- l'huître creuse, *Crassostrea gigas*, coquillage non fouisseur, élevé soit sur le sol ou en poche surélevée,
- la moule, *Mytilus edule*, coquillage non fouisseur.

## II- Contamination des coquillages

Les lots de coquillages sélectionnés sont placés en contamination dans des casiers plastiques, accrochés à la berge par des liens.

La contamination des coquillages destinés aux essais est conduite dans le chenal de Cagouillac, chenal ostréicole de la rive nord de la Seudre pollué par des rejets provenant d'une exploitation agricole.

Les lots sont mis à contaminer pendant une durée indiquée dans le tableau 1.

Numéros d'échantillon	dates de dépôt des coquillages	dates de prélèvement	Durée de contamination	Coquillages utilisés	quantité mise à l'eau	dates d'analyses	Quantité prélevée par analyse
1	06/04/01	12/04/01	6 jours	Moules	4 Kg	12/04/01	4 Kg
2	12/04/01	17/04/01	5 jours	Moules	4 Kg	17/04/01	4 Kg
3	17/04/01	23/04/01	6 jours	Moules	4 Kg	24/04/01	4 Kg
4	23/04/01	30/04/01	7 jours	Moules	4 Kg	30/04/01	4 Kg
5	04/05/01	07/05/01	3 jours	Huîtres	4 Kg	07/05/01	4 Kg
6	11/05/01	14/05/01	3 jours	Huîtres	4 Kg	15/05/01	4 Kg

Tableau 1 : organisation des analyses

## III- Transport des échantillons

Pour leur transport vers le laboratoire, les coquillages sont conditionnés dans des sacs en polyéthylène fermés à usage unique.

Les échantillons sont transportés dans des glacières dont la température doit être comprise entre +2°C et +15°C au laboratoire pour les étapes suivantes.

## IV- Réception et nettoyage des échantillons

Dès leur arrivée au laboratoire, les échantillons sont étiquetés et datés puis placés dans le réfrigérateur double porte en attendant leur préparation avant analyse.

Les coquillages sont nettoyés par brossage sous un filet d'eau courante pour enlever la vase, puis sont placés dans un second réfrigérateur, le réfrigérateur de « mise en attente des échantillons ».

Une attention particulière est portée au nettoyage de la charnière pour les huîtres pour que les souillures externes qui s'y trouvent ne soient pas mélangées à la chair et au liquide intervalvaire (C.L.I.) au moment de l'ouverture. Pour les moules, le byssus est coupé avec une paire de ciseaux stérilisée par flambage à l'alcool.

## V- Ouverture des coquillages et préparation de la solution mère de CLI

Les coquillages nettoyés sont emportés en salle d'ensemencement. Ils sont ouverts stérilement, c'est à dire dans la zone du cône de stérilité du bec Bunsen, et la C.L.I. est récupérée dans un bol Waring. Les analyses sont conduites avec une quantité de C.L.I. comprise entre 70g et 100g par bol.

Chaque bol est disposé pendant l'ouverture des coquillages sur un système automatisé qui permet d'effectuer une dilution au tiers. Cette dilution permet de rendre la solution de C.L.I. pipetable.

Ensuite la totalité du contenu du bol est broyée pendant 55 secondes et mise à décanter durant 20 minutes.

Après décantation, on obtient alors trois phases comme le montre la photo 1. La phase liquide où se trouve la quasi-totalité des microorganismes est la seule phase utilisée. De plus cette phase ne contient pas de grosses particules non broyées risquant de perturber le dénombrement des *E.coli* présumés par le système Malthus. Chacune des phases liquides contenues dans les bols est placée dans un même flacon afin d'obtenir une solution mère homogène de volume suffisant pour réaliser l'ensemble des ensemencements.



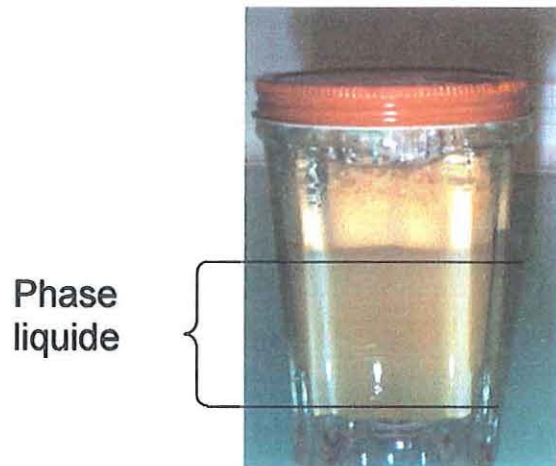


photo 1: solution mère décantée

## VI- Préparation des milieux de culture

Différents milieux de culture ont été utilisés pour le dénombrement des *E. coli* présumés.

### 1/ Méthode par impédancemétrie

Le milieu de culture utilisé est un milieu Malthus, dit milieu MCB, qui est spécifique pour les appareils de la marque Malthus instrument. Ce milieu ne permet que la croissance de la souche *E.coli*. Cette solution est disposée dans des flacons à vis de 100 ml, par fraction de 90 ml.

Le milieu MCB, dont le pH après stérilisation par autoclavage est de  $7,2 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$ , se compose de :

- Malthus peptone
- Mix n°2
- Laurysulfate de Sodium
- Chlorure de Sodium
- Lactose

### 2/ Méthode du nombre le plus probable

#### a) Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB)

A la concentration de 60 g/l il est utilisé pour rechercher et dénombrer les coliformes totaux et il sert au dénombrement des *E.coli* présumés quand il est préparé en simple concentration, c'est à dire à 40 g/l. Pour chaque concentration, le bouillon est réparti, à l'aide d'un répartiteur de milieux, dans des tubes à vis contenant une cloche de Durham, et ceci par fraction de 10 ml, et après vérification du pH de  $7,2 \pm 0,2$  à  $25^{\circ}\text{C}$  après stérilisation par autoclavage.

Le BLBVB utilisé comprend :

- Peptone : 10,0 g/l

- Bile de Bœuf : 20,0 g/l
- Vert Brillant : 0,0133 g/l
- Lactose : 10,0 g/l

La présence simultanée de bile de bœuf et de vert brillant provoque l'inhibition de la presque totalité des microorganismes gram-positifs et des bactéries gram-négatives autres que les coliformes.

La teneur en vert brillant est spécialement déterminée afin de d'empêcher la croissance des anaérobies fermentant le lactose à 44°C, ce qui évite l'obtention de résultats faussement positifs.

#### b) Eau peptonée exempte d'indole

C'est un milieu qui permet la croissance des germes ne présentant pas d'exigences particulières. Elle est surtout utilisée pour la recherche de la production d'indole (dans notre cas elle permet la recherche des *E.coli* présumés). En effet, en anaérobose, *E.coli* dégrade le tryptophane en indole par l'intermédiaire d'une tryptophanase. On utilise l'eau peptonée exempte d'indole en parallèle avec les tubes de BLBVB simple concentration. L'eau peptonée exempte d'indole à 15 g/l est répartie par fraction de 10 ml dans des tubes à essais vissés, à un pH de  $7,2 \pm 0,2$  à 25°C après stérilisation par autoclavage.

Le milieu est composé de :

- Tryptone : 10 g/l
- Chlorure de Sodium : 5 g/l

#### c) Tryptone sel en volume de 45 ml

Cette solution de tryptone sel est utilisée pour les dilutions de chaque série de portoirs. Celle-ci est répartie dans des flacons de 100 ml vissés.

La composition de cette solution à 9.5 g/l (pH de  $7,0 \pm 0,2$  à 25°C après stérilisation par autoclavage) est la suivante :

- Tryptone : 1 g/l
- Chlorure de Sodium : 8,5 g/l

La présence de chlorure de sodium permet d'obtenir une solution isotonique. La tryptone assure, quant à elle, la revivification des microorganismes ayant subi des traitements subléthaux.

#### d) Réactif de Kovacs

Le réactif utilisé est une solution commerciale prête à emploi. Celle-ci est composée de :

- N-Butanol
- Acide chlorhydrique
- diméthylamino-4-benzaldéhyde



Le mode d'action de cette solution est le suivant : de nombreux microorganismes peuvent décomposer en acide pyruvique, ammoniacque et indole, le tryptophane abondamment présent dans les peptones tryptiques<sup>(\*)</sup>. 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.

**Remarque :-**La stérilisation des milieux de culture et des diluants s'effectue dans l'autoclave de stérilisation pendant 15 minutes à  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

-Les milieux de culture et le diluant sont conservés dans un réfrigérateur à  $4,5^{\circ}\text{C}$  et sont replacés à température ambiante environ 1 heure avant le début des manipulations pour éviter un choc thermique avec les microorganismes.

### 3/ Diluant pour broyat

La quantité de C.L.I. contenue dans chaque bol Waring est diluée avec une solution de Tryptone Sel. Cette solution est de même nature que la solution de Tryptone Sel utilisée pour les dilutions de la solution de C.L.I. dans les tubes de BLBVB double concentration. Le diluant est préparé dans des flacons de 500ml ou 1000ml.

## VII- Ensemencement

### 1/ Méthode par impédancemétrie

#### a) Matériel nécessaire pour l'ensemencement

On utilise des cellules de mesures Malthus contenant du milieu Malthus, avec leurs électrodes de platine imprimées sur une plaque de céramique supportée par le bouchon, Un orifice pouvant être hermétiquement fermé permet d'introduire l'inoculum dans la cellule.

De plus, un pilulier à usage unique, rempli de solution mère, est systématiquement conservé au réfrigérateur pour un nouvel ensemencement au cas où le logiciel Malthus indique une défaillance au niveau d'une cellule.

#### b) Technique d'ensemencement

Une quantité de 10 ml de la suspension décantée est prélevée exclusivement dans la phase liquide. L'inoculum est transféré dans une cellule de mesure Malthus contenant du milieu de culture MCB. On homogénéise l'ensemble manuellement. Cette opération est répétée pour l'ensemble des cellules de mesure à ensemenecer.

## 2/ Méthode du nombre le plus probable

### a) Matériel nécessaire pour l'ensemencement

On utilise des portoirs rectangulaires de 36 emplacements, contenant les tubes de BLBVB double concentration de chaque dilution. Le nombre utile de portoirs varie selon les expériences réalisées.

### b) Technique d'ensemencement

Pour un même portoir, on prélève des fractions de 5 ml de la phase liquide de la solution mère, pour chaque tube de dilution  $10^0$  (soit 5 tubes). 5 ml de la phase sont également dilués au  $1/10^{\text{ème}}$  dans un flacon de 45 ml de Tryptone Sel.

Ainsi, 5 ml de cette nouvelle solution diluée sont prélevés et placés dans les 5 tubes suivants, correspondant à la dilution  $10^{-1}$ .

Le même protocole est appliqué pour les dilutions suivantes, et ceci pour chaque portoir à ensemercer.

**Remarque :** cette étape correspond à la culture présomptive.

Les portoirs sont incubés pendant  $48\text{h} \pm 2\text{h}$  à  $37,0^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  dans une étuve.

## 3/ Quantité de solution mère nécessaire

Selon les séries d'analyses, la quantité de solution mère n'a pas été la même :

- La première série d'analyses a consisté à réaliser une comparaison entre les deux bains-marie Malthus. Il a donc fallu un volume de 240 ml pour ensemercer 12 cellules Malthus par incubateur.

- La seconde série d'analyses avait pour but de comparer les deux bains-marie entre eux (soit 38 cellules), et également avec la méthode NPP (10 portoirs de 15 tubes). Nous avons donc besoin de 680 ml de phase liquide de solution mère.

- Les mêmes comparaisons devaient être menées pour la troisième série, mais avec 13 portoirs de tubes, d'où un volume de 770 ml à prélever.

- Une forte contamination ayant été décelée dans l'analyse précédente, on a donc décidé d'augmenter le nombre de dilutions pour la méthode NPP (solution mère; dilution  $10^{-1}$ ; dilution  $10^{-2}$ ; dilution  $10^{-3}$ ; dilution  $10^{-4}$ ), ceci pour 8 portoirs, et pour la méthode par impédancemétrie, l'ensemencement de 36 cellules était prévu (un manque de connecteurs ne nous a pas permis de remplir les bains-marie). Au total il fallait donc 600 ml de solution.

- Les deux dernières séries d'analyses ont été effectuées à partir des quatre premières dilutions pour 10 portoirs, celle à  $10^{-4}$  n'étant pas nécessaire et 38 cellules Malthus ont été ensemençées, d'où un volume nécessaire de 680 ml.



## VIII- Mise en incubation des milieux ensemencés

### 1/ Méthode par impédancemétrie (système Malthus)

#### a) Matériel

Au laboratoire DEL de la Tremblade, le matériel utilisé pour le dénombrement des *E coli* présumés par la méthode par impédancemétrie comprend divers éléments :

- Deux incubateurs (bains-marie) de chez Malthus Instrument, Crawley, England, réglables de 4°C à 47°C pouvant recevoir chacun 19 cellules de mesure de 100 ml,
- Une unité d'acquisition de données contrôlant et stockant les mesures de conductance,
- Un ensemble informatique (ordinateur équipé du logiciel FLEXI, imprimante), récupérant et traitant les données stockées dans l'unité d'acquisition et éditant les résultats sous forme graphique ou numérique.

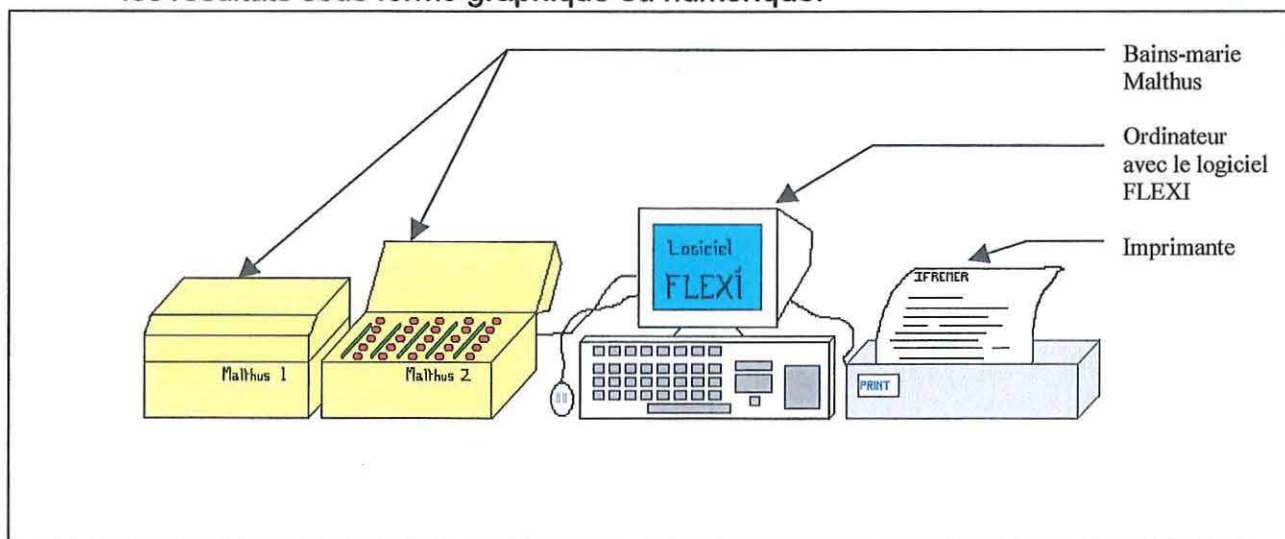


Schéma 2 : Analyseur microbiologique Malthus



Photo 2 : le système d'analyse par impédancemétrie Malthus

## b) Connexion des cellules

Immédiatement après l'ensemencement, on introduit les cellules de mesures Malthus dans les bains-marie à leur place préalablement enregistrée et on les connecte sur la carte mère au moyen des connecteurs comme le montre la photo 3.

Les cellules sont ainsi incubées dans les deux bains-marie à  $44,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  pendant un minimum de 9h.



photo 3 : incubation des cellules Malthus

## 2/ Méthode du nombre le plus probable (NPP)

### a) Matériel utile à la première incubation

Lors des premières manipulations, nous avons incubé les tubes dans une étuve d'une capacité utile de 420 l, mais celle-ci n'étant pas cartographiée, nous avons donc utilisé, pour les manipulations suivantes, deux étuves de 115 l, cartographiées à  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

### b) Matériel utile à la seconde incubation

Le matériel nécessaire pour cette étape comprend des œses stériles, à usage unique, de capacité 10  $\mu\text{l}$ , des portoirs longs à 2\*18 emplacements, contenant les tubes de BLBVB simple concentration et des tubes d'eau peptonée exempte d'indole.

L'incubation se fait dans des bains-marie à homogénéisation par hélice, cartographiés à  $44,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , d'une contenance de 22 l.

## IX- Lecture

### 1/ Méthode par impédancemétrie

Après les 9h d'incubation des cellules de mesure Malthus, on examine les courbes de conductance afin de vérifier si les courbes correspondent à une



croissance bactérienne et non pas à un défaut du système Malthus (mauvaise connexion des cellules, défauts des électrodes...).

Le système informatique de la méthode par impédancemétrie détermine un temps de détection correspondant à une quantité de bactéries. La correspondance entre le temps de détection et le nombre de *E.coli* présumés est vérifiée au moyen de la table de correspondance entre le temps de détection  $T_D$  et nombre de *Escherichia coli*. présumés dans 100g de chair et de liquide intervalvaire de coquillages. La correspondance étant établie, on obtient donc un nombre de *E.coli* présumés pour 100g de chair et liquide intervalvaire de coquillages.

## 2/ Méthode du nombre le plus probable (NPP)

### a) Première lecture

Après 48h d'incubation, on réalise la lecture de la culture présomptive. Pour cela, on compte par portoir et par dilution, le nombre de tubes positifs. Un tube est dit positif quand il y a présence d'un dégagement gazeux dans au moins  $1/10^{\text{ème}}$  de la cloche.

### b) Repiquage

Les tubes négatifs sont mis en décontamination. Seuls les tubes positifs sont repiqués (photo 4). A partir de chaque tube positif, on ensemence avec une oese de  $10 \mu\text{l}$  un tube d'eau peptonée exempte d'indole et un tube de bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) simple concentration. Cette étape est nommée culture confirmative.



Photo 4 : repiquage des tubes positifs dans la méthode NPP

Remarque : Les tubes positifs sont repiqués en milieu BLBVB moins concentré du fait du volume peu important ( $10 \mu\text{l}$ ) d'inoculum. En effet, on considère qu'une concentration en sucre trop élevée dans le milieu ralentit la croissance des microorganismes.

Les tubes sont ensuite incubés à  $44,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  pendant 24h, au bain-marie.

### c) Seconde lecture

Après 24h d'incubation, pour chaque tube lactose positif, c'est à dire présentant un dégagement gazeux d'au moins  $1/10^{\text{ème}}$  du volume total de la cloche de Durham, on ajoute dans les tubes d'eau peptonée correspondants 3 gouttes environ de réactif de Kovacs pour la recherche de l'indole.

La formation d'un anneau « rouge-cerise » à la partie supérieure du tube d'eau peptonée indique la présence d'indole (photo 5).



photo 5 : lecture de la culture confirmative des tubes positifs

On admet qu'il y a présence d'*Escherichia coli* présumés lorsqu'il y a simultanément production de gaz et présence d'indole après incubation à  $44,0^{\circ}\text{C} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures.

L'interprétation des lectures se fait avec la « table NPP ». Elle est exprimée en nombre de tubes positifs par dilution et fournit l'estimation du nombre le plus probable (NPP) de *E.coli* présumés dans 100g de chair et de liquide intervalvaire pour l'échantillon analysé.

## **X- Nettoyage des matériels**

Les bols Waring utilisés sont mis en décontamination dans un bain d'eau de javel pendant 30 minutes.

Les cellules Malthus sont immergées dans pendant 30 minutes dans un bain d'eau de javel et les électrodes de platine sont placées dans un même bain durant 8 heures.

Le matériel ayant servi à la méthode NPP (tubes, portoirs, flacons de dilution) et les pipettes, sont décontaminés pendant 30 minutes à  $121^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  à l'autoclave de décontamination.



Après leur décontamination, les tubes, les bols les flacons et les cellules Malthus (y compris les bouchons) sont lavés en machine.

## XI- Description des tests statistiques

(Référence du livre : Scherrer B., 1984. Biostatistique. Gaëtan Morin Editeur)

Afin de comparer les échantillons et déterminer si les méthodes donnent des résultats identiques, nous nous basons sur des tests statistiques.

Le choix d'un test se base sur :

- les effectifs des échantillons,
- le paramètre de comparaison (moyenne, proportions...),
- le nombre d'échantillons à comparer,
- le type de données (quantitatives/qualitatives),
- la distribution des données au sein de l'échantillon (distribution normale/non normale au sein de chaque échantillon, variances homogènes/non homogènes d'un échantillon à l'autre).

Le résultat d'un test statistique est donné avec un degré d'incertitude déterminé :  $\alpha$ .

Au préalable à la réalisation du test il faut :

- énoncer les hypothèses de comparaison des échantillons
- vérifier si les conditions d'application sont remplies par les échantillons ; sinon, il faut changer de test.

Les échantillons à comparer ont de faibles effectifs (inférieurs à 20). Ce critère suffit à choisir un test qui soit non-paramétrique, il ne semble pas nécessaire de connaître la distribution des données (homogénéité des variances et normalité) pour les appliquer car ces test s'avèrent être les tests d'hypothèse par excellence des petits échantillons aux distributions douteuses.

Les tests sont effectués automatiquement par le logiciel XLSTAT (extension de EXCEL), néanmoins, les éléments principaux du calcul sont présentés ci-dessous :

### 1/ test de Kruskal-Wallis

C'est un test non paramétrique utilisé pour comparer au moins 3 échantillons . Ces échantillons doivent être indépendants.

Notations :

k = nombre d'échantillons comparés

j = indice de l'échantillon j=1:k

$n_j$  = effectif de l'échantillon j

N = effectif total

$$N = \sum_{j=1}^k n_j$$

### Hypothèses :

$H_0$  : les k échantillons sont équivalents

$H_a$  : les k échantillons ne sont pas équivalents

Ce test permet de déterminer si les k sommes des rangs se révèlent trop disparates pour que l'hypothèse nulle d'unicité de la population d'origine soit retenue.

### Conditions :

Ce test s'applique dans le cas où le nombre d'échantillons (k) à comparer est supérieur à 2.

Populations non normales.

Inégalité des variances.

Petits échantillons :  $n < 20$

### Procédure :

1. Les données de chaque échantillon sont ordonnées par ordre croissant.
2. Pour chaque échantillon, les rangs sont ajoutés,  $R_j$  étant égal à la somme des rangs du  $j^{\text{ème}}$  échantillon

$$H_{\text{calc}} = \frac{12}{n(n+1)} \sum_{j=1}^k \frac{R_j^2}{n_j} - 3(n+1)$$

3. La valeur H calculée est donnée par la formule :

Etant donné qu'il y a des valeurs identiques au sein de l'échantillon,  $H_{\text{calc}}$  doit être corrigé par la formule suivante :

$$H_{\text{cor}} = \frac{H_{\text{calc}}}{C} \quad \text{avec} \quad C = 1 - \frac{\sum_{l=1}^g (e_l^3 - e_l)}{n^3 - n}$$

$e_l$  : nombre de données *ex aequo* pour une valeur l donnée

g : nombre de valeurs présentant des *ex aequo*

Le critère de comparaison pour tester les hypothèses est la valeur critique de H pour un degré de liberté ( $\nu$ ) déterminé par le nombre d'échantillons :  $\nu = k-1$   
H obéit à une loi du  $\chi^2$ .

$H_{\text{crit}} = \chi^2_{\alpha, \nu}$  : valeur donnée par la table statistique de distribution du  $\chi^2$

Si  $H_{\text{calc}} > H_{\text{crit}}$ , l'hypothèse  $H_0$  est rejetée et les résultats donnés par les méthodes ne sont pas identiques.



## 2/ Test de Kolmogorov-Smirnov

C'est un test de comparaison non paramétrique de conformité qui peut être utilisé pour comparer deux échantillons indépendants. Il s'applique aux données quantitatives et présente l'avantage d'être puissant.

La première étape du test est d'ordonner les données des échantillons confondus, puis de déterminer la fréquence de chaque donnée ( $x_i$ ) dans les deux échantillons. Puis les différences existantes entre les distributions de fréquences relatives cumulées de deux échantillons sont évaluées.

Le test consiste à vérifier si la plus grande des différences peut être le fruit de fluctuations fortuites d'échantillonnage.

### Hypothèses :

$H_0$  : absence de différence entre les échantillons.

$H_a$  : les échantillons sont différents pour au moins une valeur  $x_i$ .

### Étapes :

1. Ordonner les valeurs de  $x_i$
2. Déterminer les fréquences relatives cumulées relatives pour chaque  $x_i$  de chaque échantillon.
3. Calculer pour chaque  $x_i$ , la différence entre les fréquences cumulées relatives de chaque échantillon.
4.  $D_{cal}$  est égal à la plus grande différence observée.

A cette valeur  $D_{cal}$ , est associée la valeur  $p$ , qui correspond à l'incertitude de vérification de l'hypothèse nulle. Si  $p < \alpha$  (risque choisi du test), alors  $H_0$  est acceptée.

# Résultats et Discussion

Le laboratoire DEL de la Tremblade veut réaliser une validation interne, dans l'optique de la demande d'accréditation de la méthode par impédancemétrie qu'il utilise en routine. Cette validation consiste d'une part, à prouver qu'il y a bien corrélation entre la méthode par impédancemétrie et la méthode du nombre le plus probable, employée ici en tant que méthode de référence, et d'autre part de déterminer si les deux bains-marie du système par impédancemétrie donnent des résultats « équivalents » statistiquement.

Ainsi, après avoir réalisé plusieurs séries d'analyses, il est nécessaire de procéder à une étude statistique des données.

## I- Comparaison des résultats obtenus pour les analyses effectuées du 07/04/2001 au 16/05/2001

### 1/ Comparaison pour la vérification de la corrélation entre les deux méthodes

Le but recherché ici est de savoir si l'un des trois échantillons différents (représentés par les résultats du bain-marie 1, les résultats du bain-marie 2 et les résultats de la méthode NPP) proviennent d'une même population ou si, au moins, un échantillon provient d'une population différente des autres. Il apparaît donc judicieux de réaliser un test de Kruskal-Wallis. Ce test est effectué de façon unilatérale.

Cette comparaison est faite avec les résultats de quatre des six séries d'analyses (la série 1 ne comprenant pas de manipulations avec la méthode NPP et la 3<sup>ème</sup> série présentant des résultats inexploitablement statistiquement du point de vue de la méthode NPP, les valeurs de résultats étant sous la forme « >9657 »).(tableau 2)

n° analyse	$\alpha$	H critique	H calculé	résultat	pollution
2	0,05	5,938	2,089	$H_{\text{calc}} < H_{\text{crit}}$ : différence non significative	(+)
4	0,05	5,938	7,010	$H_{\text{calc}} > H_{\text{crit}}$ : différence significative	(++) ou (+++)
5	0,05	5,938	10,387	$H_{\text{calc}} > H_{\text{crit}}$ : différence significative	(++)
6	0,05	5,938	1,302	$H_{\text{calc}} < H_{\text{crit}}$ : différence non significative	(++)

Tableau 2 : résultats statistiques de la comparaison entre les deux méthodes pour les analyses de 2001



(+++): pollution > 10000 *E.coli* pour 100g de C.L.I.

(++): 1000 *E.coli* pour 100g de C.L.I. < pollution < 10000 *E.coli* pour 100g de C.L.I.

(+): pollution < 1000 *E.coli* pour 100g de C.L.I.

L'analyse statistique révèle ainsi que parmi les quatre séries d'analyses, deux seulement d'entre elles n'admettent pas de différence significative, au seuil de signification alpha de 0,05, entre les échantillons. Ces écarts ne sont pas liés à un degré de contamination. En effet, pour un même intervalle de contamination, on observe pour la série 5, une différence significative, alors que la 6<sup>ème</sup> série n'admet pas de différence significative.

Etant donné la trop faible proportion de résultats statistiques ne donnant pas de différence significative (50% des résultats) il apparaît donc que la corrélation entre les deux méthodes n'est pas établie.

## 2/ Comparaison des résultats obtenus dans les deux bains-marie du système par impédancemétrie

Il s'agit ici de comparer deux échantillons indépendants afin de déterminer si les échantillons proviennent de la même population ou de deux populations distinctes.

Cette comparaison repose sur le test non paramétrique et bilatéral nommé Kolmogorov-Smirnov.

Le test est effectué sur les données des six séries d'analyses, comme le montre le tableau 3.

n° analyse	$\alpha$	P-value (p)	résultat	pollution
1	0,05	0,16	P-value > $\alpha$ : différence non significative	(++)
2	0,05	0,999	P-value > $\alpha$ : différence non significative	(+)
3	0,05	0,962	P-value > $\alpha$ : différence non significative	(+++)
4	0,05	0,266	P-value > $\alpha$ : différence non significative	(++) ou (+++)
5	0,05	1	P-value > $\alpha$ : différence non significative	(++)
6	0,05	0,944	P-value > $\alpha$ : différence non significative	(++)

Tableau 3 : résultats statistiques de la comparaison entre les deux le deux bains-marie du système Malthus pour les analyses de 2001

Au vu des résultats statistiques, on constate que pour les six séries, il n'y a pas de différence significative entre les échantillons, au seuil de signification alpha de 0.05. Les deux échantillons sont donc réunis dans la même population, et ceci pour l'ensemble des séries comparées. Ceci permet de montrer que les deux baignades du système Malthus donnent des résultats statistiquement semblables, c'est à dire qu'ils dénombrent une quantité de *Escherichia coli* présumés dans 100g de CLI du même ordre de grandeur.

## II- Comparaison des résultats obtenus pour les analyses effectuées du 25/04/2000 au 16/06/2000

Les tests statistiques utilisés pour les résultats d'analyses du 07/04/2001 au 16/05/2001 étant différents du test employé l'année précédente, il semblait nécessaire de reprendre ces résultats pour pouvoir mener une analyse complète.

Les changements des tests statistiques entre les deux années viennent du fait qu'un nouvel apport concernant les connaissances sur les méthodes statistiques à inciter le laboratoire à travailler à partir d'échantillons non appariés (l'année précédente, le test de Wilcoxon qui est un test pour analyses non appariées, a été utilisé avec les moyennes géométriques ce qui revient à faire des paires).

Le test de Wilcoxon aurait donc pu être réutilisé mais les nouveaux tests employés sont tout aussi puissants et plus facile à réaliser.

### 1/ Comparaison pour la vérification de la corrélation entre les deux méthodes

Le test de Kruskal-Wallis est donc utilisé pour les cinq séries d'analyses effectuées l'an dernier. Il s'agit ici aussi d'un test unilatéral avec un seuil de signification de 5%. L'ensemble des résultats de cette comparaison est donné dans le tableau 4 ci-dessous.

n° analyse	$\alpha$	H critique	H calculé	résultat	pollution
1	0,05	5,938	10,208	$H_{\text{calc}} > H_{\text{crit}}$ : différence significative	(++)
2	0,05	5,938	7,317	$H_{\text{calc}} > H_{\text{crit}}$ : différence significative	(++)
3	0,05	5,938	12,883	$H_{\text{calc}} > H_{\text{crit}}$ : différence significative	(+)
4	0,05	5,938	7,421	$H_{\text{calc}} > H_{\text{crit}}$ : différence significative	(+)
5	0,05	5,938	1,591	$H_{\text{calc}} < H_{\text{crit}}$ : différence non significative	(+)

Tableau 4 : résultats statistiques de la comparaison entre les deux méthodes pour les analyses de 2000



On constate que sur les cinq comparaisons effectuées, seule une d'entre elles n'admet pas de différence significative. En effet, pour cette série les échantillons proviennent d'une même population. Mais, étant donné que 80% des résultats admettent une différence, on peut dire que la corrélation entre les deux méthodes n'est pas établie, contrairement à la conclusion qui avait été faite l'année dernière à partir des résultats statistiques.

## 2/ Comparaison des résultats obtenus dans les deux bains-marie du système par impédancemétrie

On emploie le test statistique de Kolmogorov-Smirnov pour déterminer si les deux bains-marie, considérés comme deux échantillons, appartiennent ou non à la même population. Cette comparaison est réalisée pour les cinq lots de coquillages analysés, comme le montre le tableau 5.

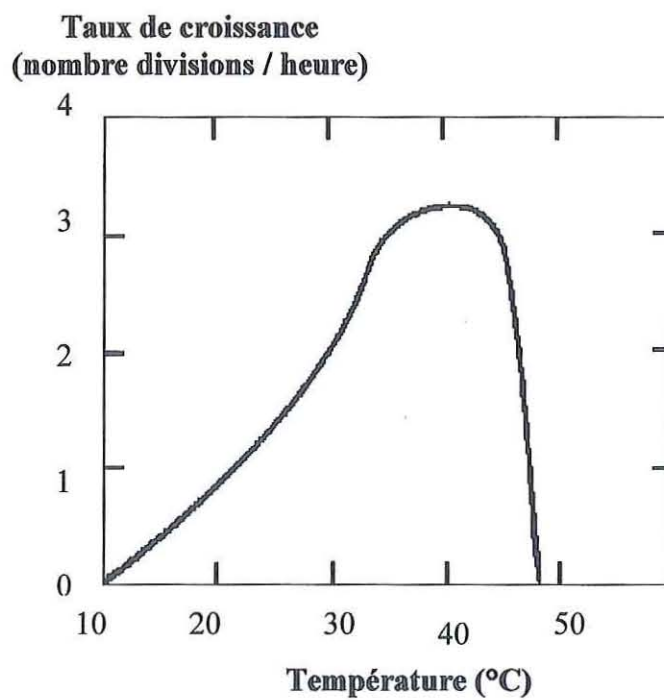
n° analyse	$\alpha$	P-value	résultat	pollution
1	0,05	0,0005	P-value < $\alpha$ : différence significative	(++)
2	0,05	0,005	P-value < $\alpha$ : différence significative	(++)
3	0,05	0,002	P-value < $\alpha$ : différence significative	(+)
4	0,05	0,018	P-value < $\alpha$ : différence significative	(+)
5	0,05	0,928	P-value > $\alpha$ : différence non significative	(+)

Tableau 5 : résultats statistiques de la comparaison entre les deux bains-marie du système Malthus pour les analyses de 2000

L'analyse statistique des dénombrements effectués avec les deux bains-marie montre que les résultats obtenus par le bain-marie 1 et ceux obtenus avec le bain-marie 2 sont statistiquement différents. En effet, seule une série sur les cinq testées ne traduit pas une différence significative entre les échantillons.

A la suite de la lecture de ces résultats statistiques, l'hypothèse suivante avait été formulée : la différence de température de 0,3°C entre les bains-marie pourrait être la cause de cette différence.

En effet, la courbe de croissance de *E.coli* en fonction de la température d'incubation (graphe 1) permet de voir l'importance du réglage de la température, l'optimum de la croissance de l'espèce se situant à 44°C.



Graph 1 : Influence de la température sur le taux de croissance d'*E. coli*.



# Conclusion

Cette étude avait pour but de réaliser un essai de validation interne de la méthode de dénombrement de *Escherichia coli* présumés par impédancemétrie. Pour cela, des comparaisons statistiques ont été menées entre les résultats d'analyses obtenus avec la méthode du nombre le plus probable (NPP), employée en tant que méthode de référence, et la méthode par impédancemétrie, utilisée en routine.

Il en ressort que la corrélation entre les deux méthodes est infirmée, la méthode par impédancemétrie ne donnant pas des résultats statistiquement semblables à ceux obtenus par la méthode de référence.

Le nouveau test statistique, plus approprié au contexte de comparaison des méthodes utilisées au laboratoire, a été appliqué aux résultats obtenus l'année précédente. L'exploitation des résultats d'analyses conduit à un résultat opposé aux conclusions de l'année précédente, à savoir que la corrélation entre les deux méthodes n'est pas vérifiée dans les conditions d'application du test.

En ce qui concerne la comparaison entre les bains-marie du système Malthus, on remarque que les résultats obtenus cette année sont identiques statistiquement. Le réglage de température qui a été effectué permet donc d'obtenir des dénombrements de *Escherichia coli* présumés statistiquement identiques pour les deux bains-marie.

L'étude a permis de montrer que l'absence de validation du système d'analyses par impédancemétrie n'est pas liée à l'homogénéité des résultats obtenus dans le système Malthus mais bien à un décalage dans les réponses entre les deux méthodes.

Cette validation ne pourra être obtenue que si d'autres réglages sont apportés au système Malthus dans le cadre du dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans la chair et le liquide intervalvaire des coquillages marins vivants.

# Bibliographie

Contrôle microbiologique des coquillages vivants : le choix des microorganismes indicateurs d'hygiène et de salubrité de Anne-Marie Vanelle

Dénombrement des escherichia coli dans les coquillages par conductancemétrie de J.Dupont – D.Menard – C.Hervé – F.Chevalier – B.Beliaeff – B.Minier

Scherrer B., 1984. Biostatistique. Gaëtan Morin Editeur

Procédures du laboratoire de microbiologie de l'Ifremer DEL de la Tremblade.

<http://www.chez.com/guatemalt/ESCHE.html>

[http://www.utc.fr/~pauss/publi/cochet\\_1997.html](http://www.utc.fr/~pauss/publi/cochet_1997.html)



# Glossaire

**Absorption** : action de laisser pénétrer et retenir un liquide, un gaz...

**Accréditation** : action donnant l'autorité nécessaire pour agir.

**COFRAC** : Comité Français d'Accréditation, maillon de la chaîne européenne des organismes d'accréditation des laboratoires d'analyses et d'essais.

**Coliformes totaux** : Bacilles Gram négatif, non sporulés, oxydase négative, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface ayant des propriétés équivalentes et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz.

**Coliformes thermotolérants** : appelés également « coliformes fécaux » ; ce sont les bactéries présentant les propriétés des coliformes à la température d'incubation de 44°C.

**DEL** : Direction de l'Environnement et de l'aménagement Littoral.

***Escherichia coli* présumés** : ce sont les coliformes thermotolérants producteurs d'indole à 44°C à partir du tryptophane.

**Liquide intervalvaire** : liquide contenu entre les deux valves d'un coquillage.

**Tryptophane** : un des acides aminés indispensables à l'organisme, et dont dérivent plusieurs composés biologiques importants (sérotonine, certains nucléotides...).

# Table des annexes

Annexe 1 : Détails sur le calibrage de la méthode par impédancemétrie par rapport à la méthode NPP

Annexe 2 : Exemples de courbes de conductance

Annexe 3 : Correspondance entre temps de détection (TD) et nombre d'*Escherichia coli* présumés dans 100 g de chair et de liquide intervalvaire

Annexe 4 : Table de référence NPP

Annexe 5 : Résultats détaillés des différentes analyses microbiologiques effectuées

Annexe 6 : Résultats détaillés des différentes comparaisons statistiques effectuées

Annexe 7 : Résultats détaillés des différentes comparaisons statistiques effectuées l'année précédente

Annexe 8 : Exemples de fiches de suivi d'analyses



# *Annexe 1*

## Détails sur le calibrage de la méthode par impédancemétrie par rapport à la méthode NPP

I – Résultats des régressions linéaires entre le logarithme décimal des concentrations bactériennes ( $\log_{10}$  (NPP/100g de C.L.I.) et les temps de détection ( $t_D$ ) des signaux conductimétriques.

	Huîtres	Moules	Coques + Palourdes	TOTAL
n	132	115	84	331
a(S <sub>a</sub> )	-1,08 (0,03)	-1,01 (0,02)	-1,02 (0,03)	-1,04 (0,01)
b(S <sub>b</sub> )	11,33 (0,17)	10,85 (0,16)	10,85 (0,22)	11,05 (0,10)
S <sub>□</sub>	0,5	0,44	0,44	0,47
r	0,965	0,973	0,964	0,968
r <sup>2</sup>	93,10%	94,70%	92,90%	93,70%
Test des séquences	NS	NS	S	NS

n : Nombre de couples de données.

a(S<sub>a</sub>) : Pente (écart-type).

b(S<sub>b</sub>) : Ordonnée à l'origine (écart-type)

S<sub>□</sub> : Ecart-type de prédiction

r : Coefficient de corrélation

r<sup>2</sup> : Pourcentage de variance expliquée par le modèle

S : Significatif

NS : Non significatif

L'équation des droites de régression s'écrit :  $\log(\widehat{EC}) = a \cdot t_D + b$

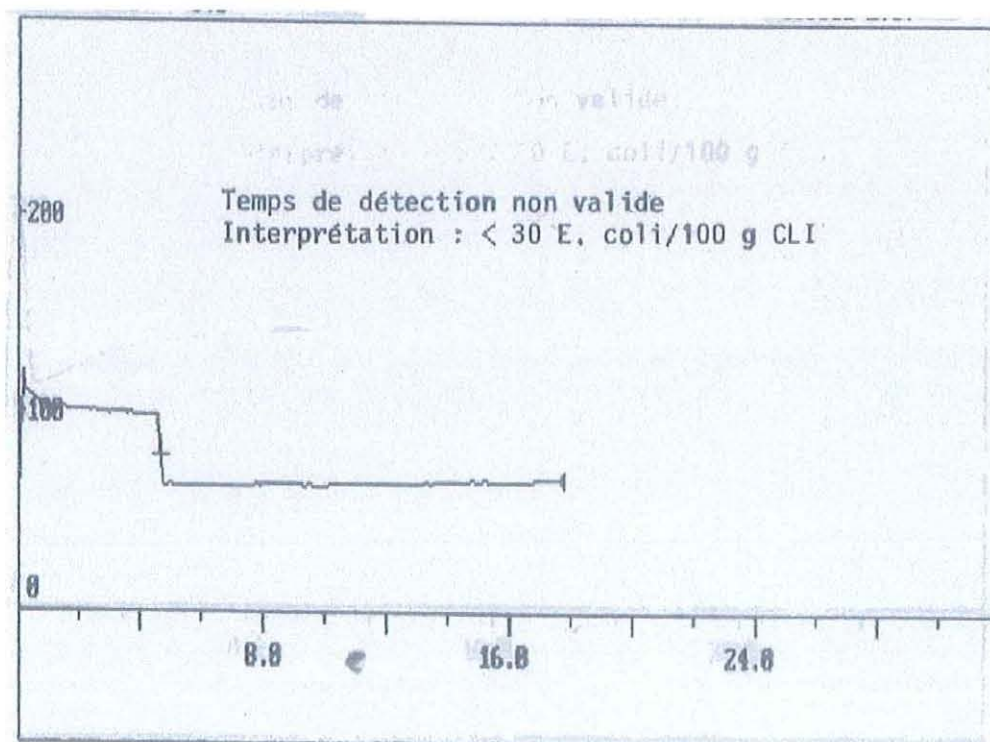
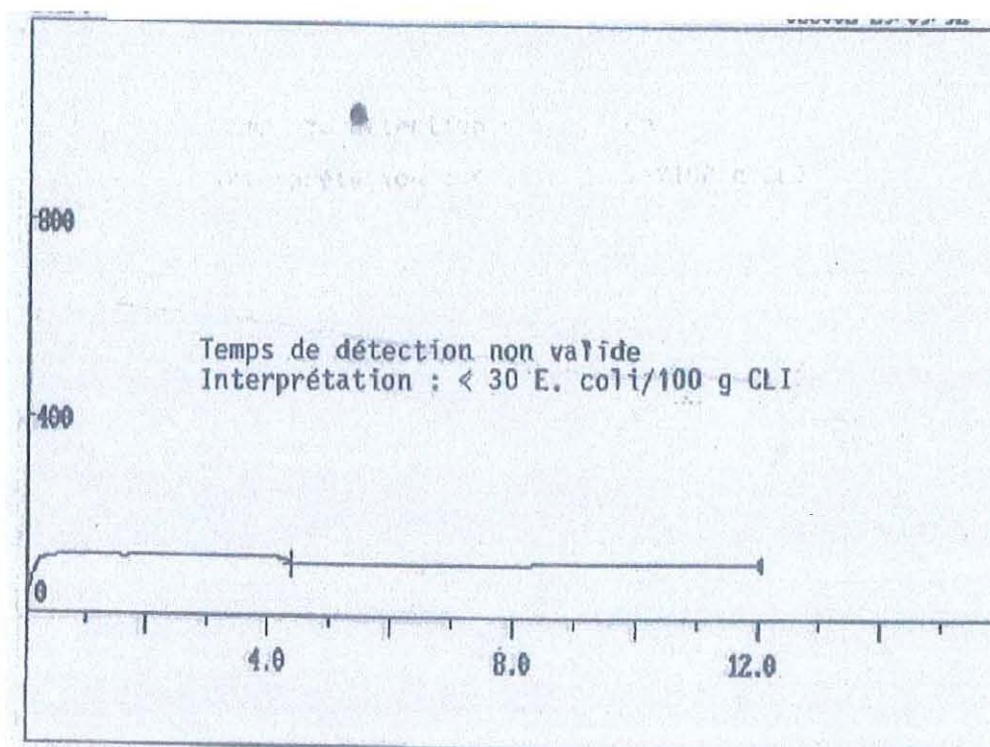
Où (EC) est la concentration en *E.coli* (nombre de bactéries/100g de C.L.I.) et a et b sont les valeurs des coefficients lues dans le tableau ci dessus.



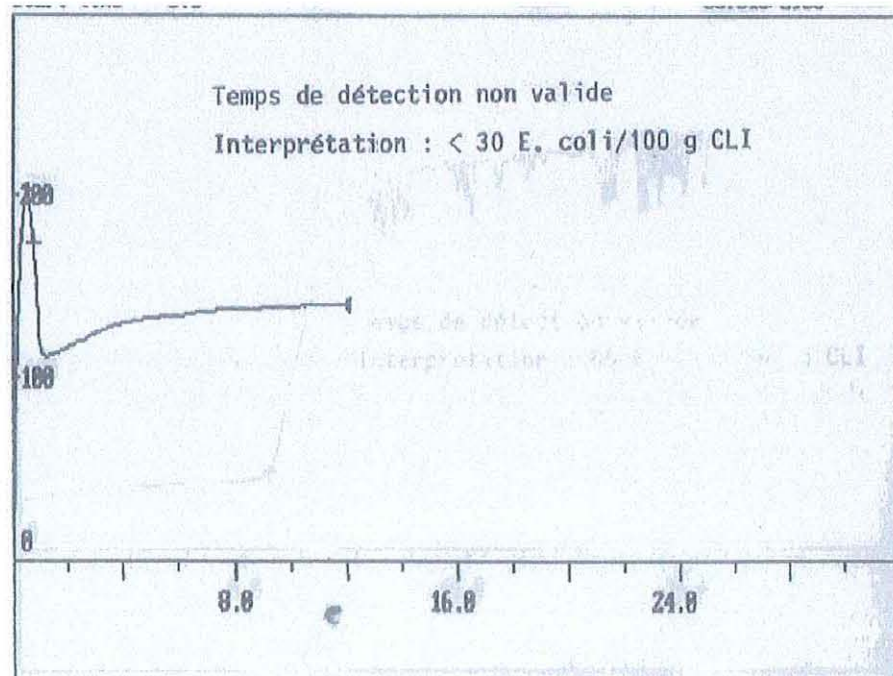
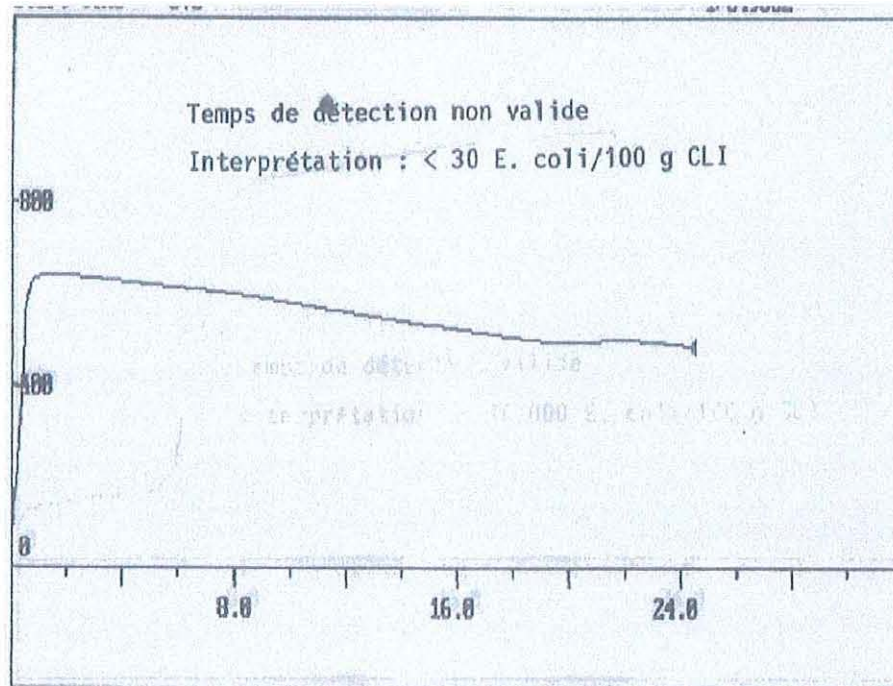
# *Annexe 2*

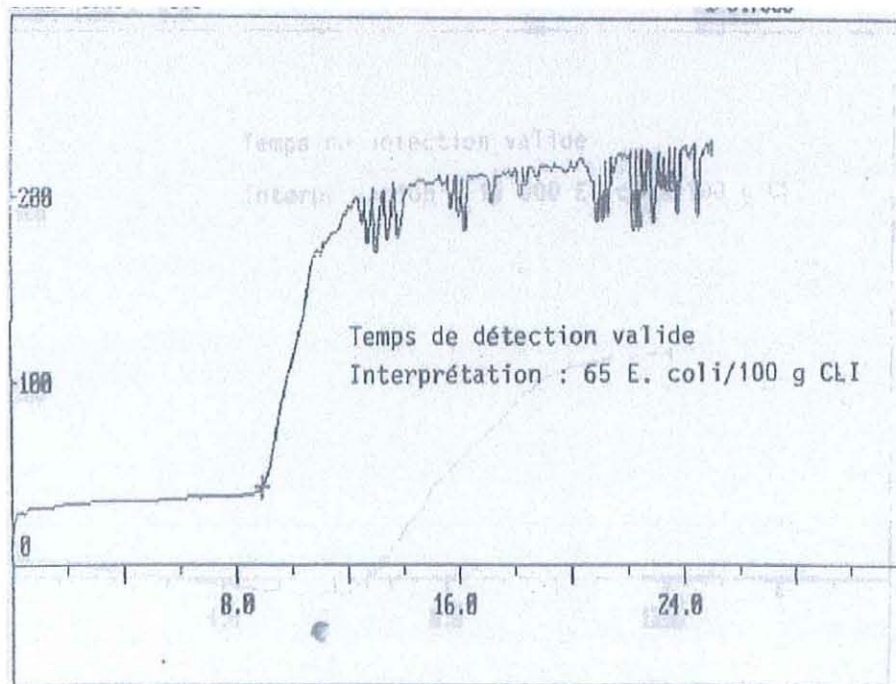
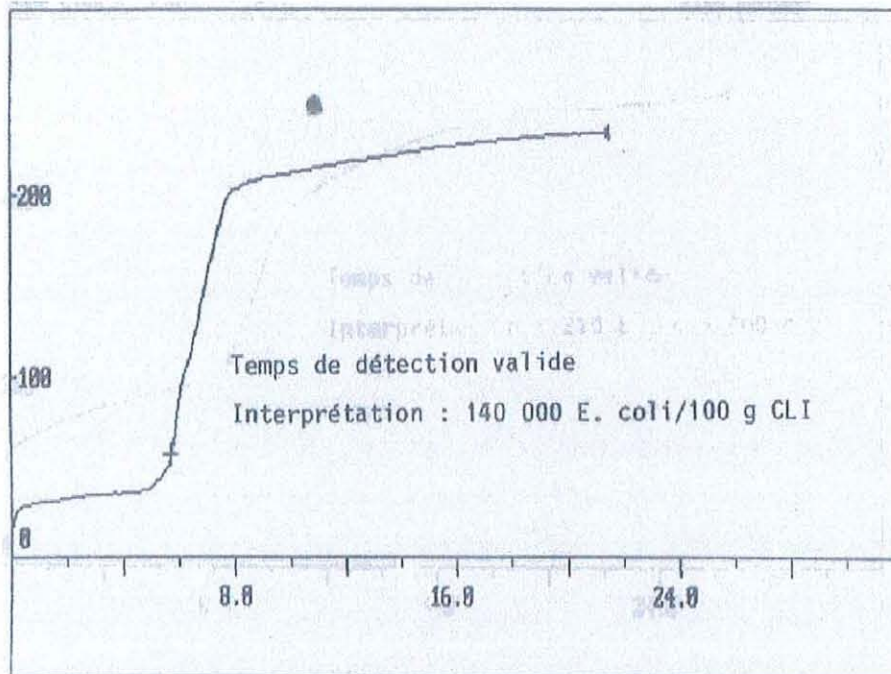
## Exemples de courbes de conductance

## Exemples de courbes de conductance traduisant des temps de détection Valides ou Non Valides

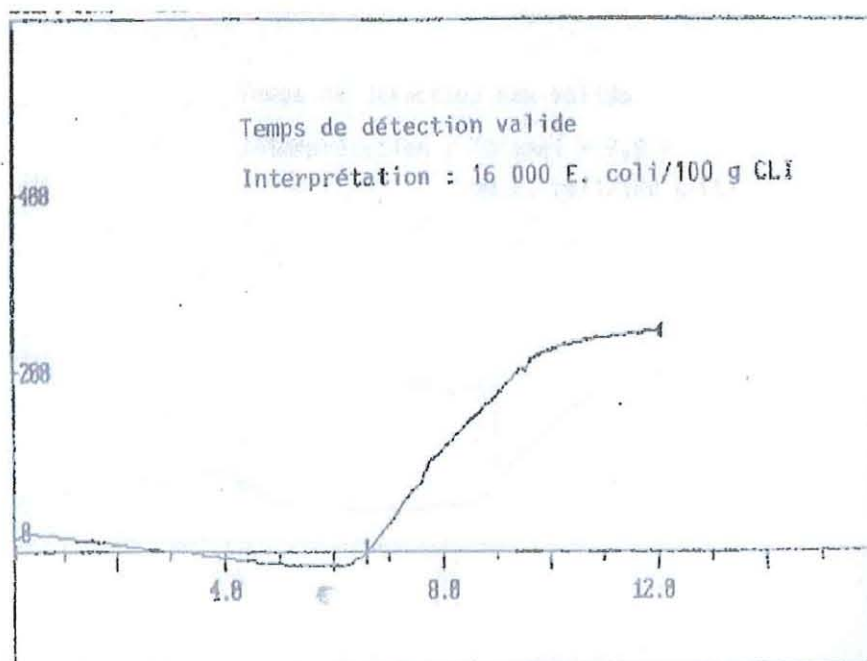
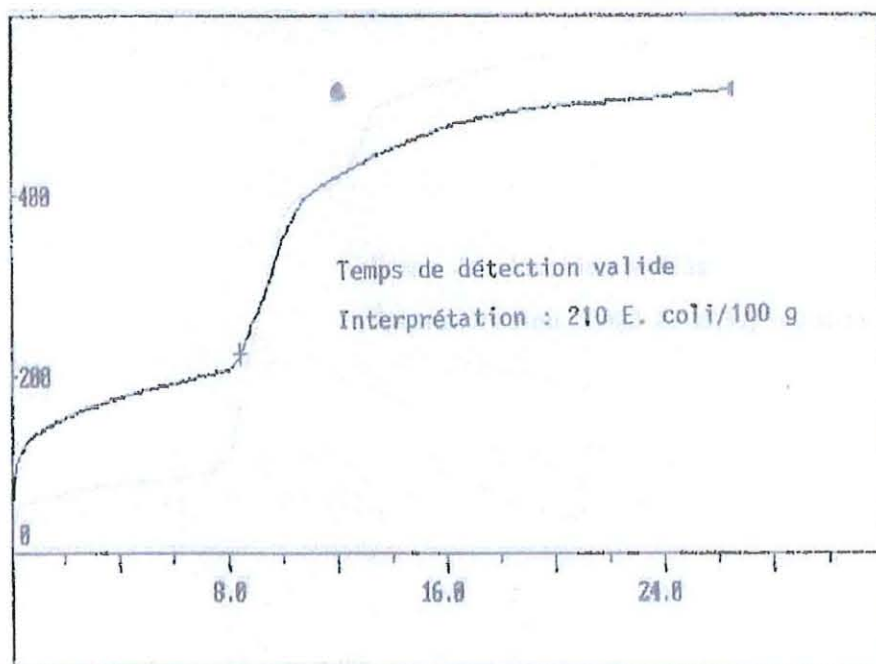


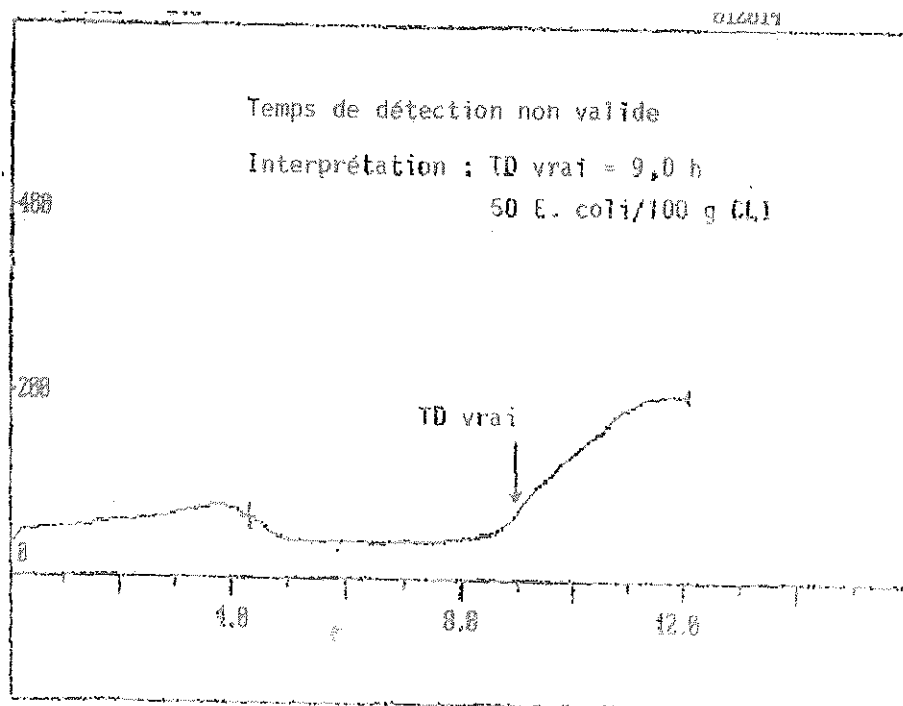
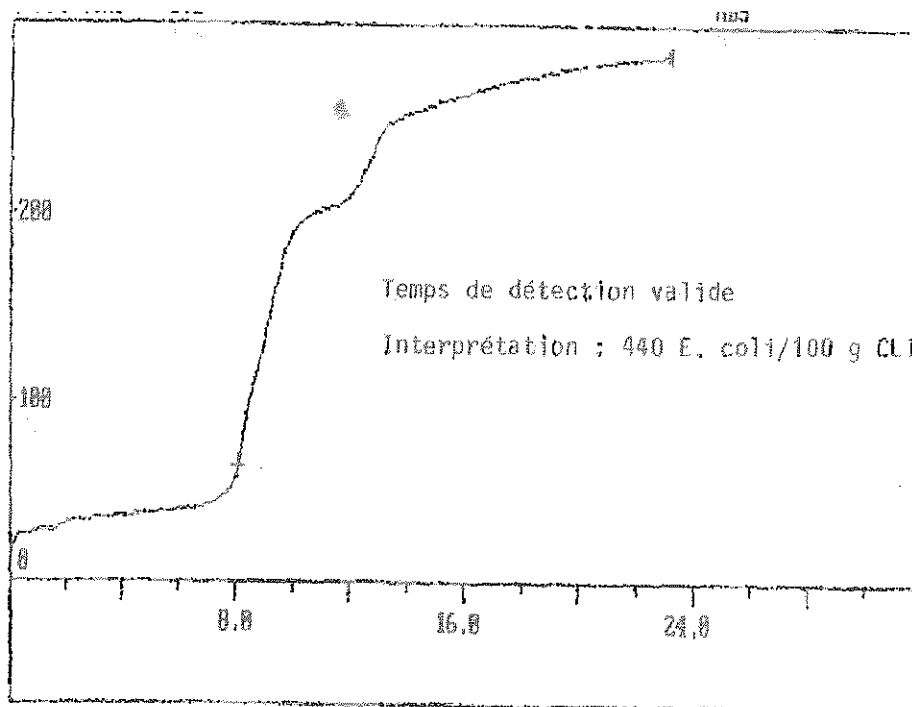














# *Annexe 3*

Correspondance entre temps de  
détection (TD) et nombre  
d'*Escherichia coli* présumés dans  
100 g de chair et de liquide  
intervalvaire

Td (heures)	Nombre de EC dans 100g de CLI	Td (heures)	Nombre de EC dans 100g de CLI	Td (heures)	Nombre de EC dans 100g de CLI
2,0	$9,3 \cdot 10^8$	4,5	$2,4 \cdot 10^6$	7,0	$6,0 \cdot 10^3$
2,1	$7,4 \cdot 10^8$	4,6	$1,9 \cdot 10^6$	7,1	$4,8 \cdot 10^3$
2,2	$5,8 \cdot 10^8$	4,7	$1,5 \cdot 10^6$	7,2	$3,7 \cdot 10^3$
2,3	$4,6 \cdot 10^8$	4,8	$1,2 \cdot 10^6$	7,3	$3,0 \cdot 10^3$
2,4	$3,6 \cdot 10^8$	4,9	$9,1 \cdot 10^5$	7,4	$2,3 \cdot 10^3$
2,5	$2,8 \cdot 10^8$	5,0	$7,2 \cdot 10^5$	7,5	$1,8 \cdot 10^3$
2,6	$2,2 \cdot 10^8$	5,1	$5,7 \cdot 10^5$	7,6	$1,4 \cdot 10^3$
2,7	$1,7 \cdot 10^8$	5,2	$4,5 \cdot 10^5$	7,7	$1,1 \cdot 10^3$
2,8	$1,4 \cdot 10^8$	5,3	$3,5 \cdot 10^5$	7,8	$8,9 \cdot 10^2$
2,9	$1,1 \cdot 10^8$	5,4	$2,8 \cdot 10^5$	7,9	$7,1 \cdot 10^2$
3,0	$8,5 \cdot 10^7$	5,5	$2,2 \cdot 10^5$	8,0	$5,5 \cdot 10^2$
3,1	$6,7 \cdot 10^7$	5,6	$1,7 \cdot 10^5$	8,1	$4,4 \cdot 10^2$
3,2	$5,3 \cdot 10^7$	5,7	$1,4 \cdot 10^5$	8,2	$3,5 \cdot 10^2$
3,3	$4,2 \cdot 10^7$	5,8	$1,1 \cdot 10^5$	8,3	$2,7 \cdot 10^2$
3,4	$3,3 \cdot 10^7$	5,9	$8,4 \cdot 10^4$	8,4	$2,1 \cdot 10^2$
3,5	$2,6 \cdot 10^7$	6,0	$6,6 \cdot 10^4$	8,5	$1,7 \cdot 10^2$
3,6	$2,0 \cdot 10^7$	6,1	$5,2 \cdot 10^4$	8,6	$1,3 \cdot 10^2$
3,7	$1,6 \cdot 10^7$	6,2	$4,1 \cdot 10^4$	8,7	$1,0 \cdot 10^2$
3,8	$1,3 \cdot 10^7$	6,3	$3,2 \cdot 10^4$	8,8	$8,1 \cdot 10^1$
3,9	$1,0 \cdot 10^7$	6,4	$2,5 \cdot 10^4$	8,9	$6,5 \cdot 10^1$
4,0	$7,8 \cdot 10^6$	6,5	$2,0 \cdot 10^4$	9,0	$5,0 \cdot 10^1$
4,1	$6,2 \cdot 10^6$	6,6	$1,6 \cdot 10^4$	9,1	$4,0 \cdot 10^1$
4,2	$4,9 \cdot 10^6$	6,7	$1,2 \cdot 10^4$	9,2	$3,2 \cdot 10^1$
4,3	$3,8 \cdot 10^6$	6,8	$9,8 \cdot 10^3$	> 9,2	$< 3,0 \cdot 10^1$
4,4	$3,0 \cdot 10^6$	6,9	$7,6 \cdot 10^3$		



# *Annexe 4*

## Table de référence NPP

"Table NPP"

B. BELIAEFF - Nantes

Table produite à l'aide du programme FORTRAN NPP.F sur station SUN  
3 x 5 tubes (5 ml, 0.5 ml, 0.05 ml) pour une dilution au 1/3.

Résultats (nb de tubes/dilution)			NPP	Probabilité	Intervalle de confiance (95 %)	
0	0	1	11	0.003317	3	60
0	0	2	22	0.000018	7	78
0	1	0	11	0.033444	3	61
0	1	1	22	0.000448	7	79
0	1	2	33	0.000004	12	96
0	2	0	22	0.001823	7	80
0	2	1	33	0.000042	12	97
0	3	0	33	0.000085	12	97
0	3	1	45	0.000003	18	114
0	4	0	45	0.000003	18	115
1	0	0	12	0.364834	3	67
1	0	1	24	0.005352	7	88
1	0	2	36	0.000053	13	107
1	1	0	24	0.054502	7	88
1	1	1	36	0.001369	13	108
1	1	2	49	0.000019	20	127
1	2	0	37	0.005629	13	109
1	2	1	49	0.000202	20	128
1	2	2	62	0.000004	27	146
1	3	0	50	0.000419	20	129
1	3	1	62	0.000020	27	148
1	4	0	63	0.000021	28	149
1	4	1	76	0.000001	36	168
2	0	0	27	0.265794	8	100
2	0	1	41	0.007429	15	123
2	0	2	55	0.000118	22	145
2	0	3	69	0.000001	30	167
2	1	0	41	0.076618	15	124
2	1	1	55	0.003074	22	147
2	1	2	70	0.000064	31	169
2	2	0	56	0.012823	23	148
2	2	1	71	0.000677	31	171
2	2	2	86	0.000018	40	193
2	3	0	71	0.001430	31	173
2	3	1	87	0.000095	40	196
2	3	2	102	0.000003	50	219
2	4	0	88	0.000101	41	198
2	4	1	103	0.000008	51	222
2	5	0	105	0.000004	51	225
3	0	0	47	0.217378	17	146
3	0	1	63	0.009966	26	174
3	0	2	81	0.000240	35	203
3	0	3	99	0.000004	46	232
3	1	0	64	0.104593	26	177
3	1	1	82	0.006387	36	206
3	1	2	100	0.000195	47	236
3	1	3	119	0.000004	58	266
3	2	0	83	0.027199	36	210
3	2	1	102	0.002106	47	240
3	2	2	121	0.000079	59	271
3	2	3	142	0.000002	71	302
3	3	0	103	0.004554	48	244
3	3	1	123	0.000433	60	276
3	3	2	144	0.000019	73	308
3	4	0	125	0.000476	61	281
3	4	1	146	0.000054	74	314
3	4	2	168	0.000003	88	347



Résultats (nb de tubes/dilution)			NPP	Probabilité	Intervalle de confiance (95 %)	
3	5	0	149	0.000024	75	320
3	5	1	171	0.000003	89	354
4	0	0	77	0.186809	31	228
4	0	1	99	0.013736	43	272
4	0	2	124	0.000515	57	319
4	0	3	152	0.000012	73	368
4	1	0	101	0.148273	44	279
4	1	1	127	0.014185	58	328
4	1	2	155	0.000672	74	379
4	1	3	186	0.000019	92	431
4	2	0	130	0.062588	59	338
4	2	1	159	0.007585	76	391
4	2	2	190	0.000447	94	445
4	2	3	225	0.000016	114	502
4	3	0	163	0.017161	77	403
4	3	1	196	0.002592	96	461
4	3	2	232	0.000187	117	520
4	3	3	271	0.000008	139	580
4	4	0	201	0.003021	99	477
4	4	1	239	0.000563	120	539
4	4	2	280	0.000050	144	602
4	4	3	323	0.000003	169	666
4	5	0	247	0.000272	123	560
4	5	1	290	0.000062	148	627
4	5	2	336	0.000007	175	695
5	0	0	139	0.166427	60	521
5	0	1	188	0.022731	84	667
5	0	2	256	0.001694	115	826
5	0	3	347	0.000086	155	993
5	0	4	455	0.000003	203	1164
5	1	0	197	0.263795	88	730
5	1	1	274	0.052064	122	914
5	1	2	379	0.005750	166	1108
5	1	3	503	0.000436	221	1308
5	1	4	637	0.000022	289	1510
5	2	0	296	0.260160	130	1030
5	2	1	420	0.078924	180	1263
5	2	2	566	0.013433	244	1505
5	2	3	723	0.001518	324	1754
5	2	4	887	0.000109	416	2012
5	2	5	1060	0.000004	519	2278
5	3	0	475	0.225641	198	1488
5	3	1	652	0.110376	276	1802
5	3	2	843	0.029163	373	2135
5	3	3	1050	0.004966	488	2490
5	3	4	1273	0.000529	618	2866
5	3	5	1516	0.000028	763	3268
5	4	0	780	0.199227	324	2337
5	4	1	1034	0.161477	452	2872
5	4	2	1327	0.069817	608	3479
5	4	3	1669	0.019685	794	4168
5	4	4	2073	0.003581	1013	4947
5	4	5	2554	0.000335	1274	5828
5	5	0	1439	0.187215	625	5622
5	5	1	2086	0.312381	929	8063
5	5	2	3254	0.336837	1403	11697
5	5	3	5507	0.345420	2232	17702
5	5	4	9657	0.409600	3961	31738

# *Annexe 5*

## Résultats détaillés des différentes analyses microbiologiques effectuées



méthode par impédancemétrie	
Malthus 1	Malthus 2
2300	1400
1400	1400
1800	1100
2300	1100
1800	1400
2300	890
1100	1100
2300	/
/	1800
3700	30
3000	3000
/	2300

SERIE D'ANALYSES 1

méthode par impédancemétrie		méthode NPP	
Malthus 1	Malthus 2	Coliformes totaux	<i>E.coli</i> présumés
50	30	9657	83
30	65	2086	197
30	30	103	12
170	210	1034	139
30	/	63	12
30	/	9657	101
210	30	1034	197
30	30	1327	77
30	30	475	197
170	30	296	197
30	30		
30	/		
350	130		
30	30		
30	270		
100	30		
32	30		
30	30		

SERIE D'ANALYSES 2

méthode par impédancemétrie		méthode NPP	
Malthus 1	Malthus 2	Coliformes totaux	<i>E.coli</i> présumés
110 000	84 000	>9657	>9657
84 000	84 000	>9657	>9657
66 000	84 000	>9657	>9657
84 000	140 000	>9657	>9657
140 000	140 000	>9657	>9657
110 000	110 000	>9657	171
110 000	84 000	>9657	>9657
140 000	140 000	>9657	2 554
170 000	140 000	>9657	>9657
170 000	220 000	>9657	>9657
170 000	170 000	>9657	>9657
220 000	/	>9657	336
170 000	220 000	>9657	323
170 000	220 000		
170 000	170 000		
220 000	350 000		
450 000	/		
350 000	350 000		
570 000	/		

SERIE D'ANALYSES 3

méthode par impédancemétrie		méthode NPP	
Malthus 1	Malthus 2	Coliformes totaux	<i>E.coli</i> présumés
4 800	30	9657	5507
4 800	4 800	20860	>9657
/	4 800	>9657	9657
4 800	7 600	5507	5507
/	7 600	5660	3790
7 600	6 000	6520	1327
7 600	6 000	65200	18800
12 000	/	6520	4200
20 000	9 800		
16 000	9 800		
/	12 000		
16 000	7 600		
52 000	41 000		
41 000	41 000		
32 000	41 000		
41 000	/		
66 000	52 000		
52 000	/		

SERIE D'ANALYSES 4



méthode par impédancemétrie		méthode NPP	
Malthus 1	Malthus 2	Coliformes totaux	<i>E.coli</i> présumés
3 700	4 800	>9657	3 254
4 800	4 800	5030	1 880
6 000	3 700	6520	4 200
4 800	3 700	5507	2 086
3 700	7 600	5507	2 086
6 000	3 700	32540	6 520
3 700	3 700	5507	1 439
6 000	6 000	4200	4 200
3 700	6 000	2086	247
6 000	6 000	8430	4 200
4 800	4 800		
6 000	3 700		
6 000	6 000		
6 000	6 000		
7 600	7 600		
7 600	6 000		
6 000	7 600		
7 600	7 600		
7 600	9 800		

SERIE D'ANALYSES 5

méthode par impédancemétrie		méthode NPP	
Malthus 1	Malthus 2	Coliformes totaux	<i>E.coli</i> présumés
3 000	3 700	9657	3 254
3 000	2 300	9657	9 657
3 000	3 700	4200	1 327
1 800	3 000	6520	336
6 000	4 800	5507	5 507
3 000	3 700	5507	3 254
3 000	3 700	7230	3 790
3 700	4 800	6520	6 520
7 600	7 600	5507	5 507
7 600	7 600	9657	9 657
9 800	7 600		
6 000	3 700		
7 600	7 600		
9 800	12 000		
7 600	16 000		
3 700	6 000		
7 600	9 800		
7 600	9 800		
9 800	7 600		

SERIE D'ANALYSES 6

# *Annexe 6*

## Résultats détaillés des différentes comparaisons statistiques effectuées



maltus1	malthus2
2300	1400
1400	1400
1800	1100
2300	1100
1800	1400
2300	890
1100	1100
2300	1800
3700	30
3000	3000
	2300

**Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral**

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,478

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Conclusion :

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle  
d'absence de différence entre échantillons

Autrement dit, la différence entre échantillons n'est pas significative

maltus1	malthus2	npp
50	30	83
30	65	197
30	30	12
170	210	139
30	30	12
30	30	101
210	30	197
30	30	77
30	30	197
170	130	197
30	30	
30	270	
350	30	
30	30	
30	30	
100		
32		
30		

**Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral :**

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,126

P-value associée : 0,999

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

**Conclusion :**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons

Autrement dit, la différence entre échantillons n'est pas significative

**Xlstat - Test de Kruskal-Wallis**

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 2,089

P-value associée : 0,352

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

**Conclusion :**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes

Autrement dit, la différence entre les groupes n'est pas significative



maltus1	malthus2
110000	84000
84000	84000
66000	84000
84000	140000
140000	140000
110000	110000
110000	84000
140000	140000
170000	140000
170000	220000
170000	170000
220000	220000
170000	220000
170000	170000
170000	350000
220000	350000
450000	
350000	
570000	

Xlstat - Comparaison de 2 échantillons indépendants

**Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral :**

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov :  
0,167

P-value associée : 0,962

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

**Conclusion :**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons

Autrement dit, la différence entre échantillons **n'est pas significative**

maltus1	malthus2	npp
4800	30	5507
4800	4800	9657
4800	4800	5507
7600	7600	3790
7600	7600	1327
12000	6000	18800
20000	6000	4200
16000	9800	
16000	9800	
52000	12000	
41000	7600	
32000	41000	
41000	41000	
66000	41000	
52000	52000	

Xlstat - Comparaison de 2 échantillons indépendants  
Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral :

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,357  
P-value associée : 0,266

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Conclusion

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons

Autrement dit, la différence entre échantillons n'est pas significative

Xlstat - Test de Kruskal-Wallis

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) :  
7,010

P-value associée : 0,030

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

Conclusion

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes

Autrement dit, la différence entre les groupes est significative

maltus1	malthus2	npp
3700	4800	3254
4800	4800	1880
6000	3700	4200
4800	3700	2086
3700	7600	2086
6000	3700	6520
3700	3700	1439
6000	6000	4200
3700	6000	247
6000	6000	4200
4800	4800	
6000	3700	
6000	6000	
6000	6000	
7600	7600	
7600	6000	
6000	7600	
7600	7600	
7600	9800	

**Xlstat - Comparaison de 2 échantillons indépendants  
Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral**

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,111  
P-value associée : 1,000

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

**Conclusion**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons  
Autrement dit, la différence entre échantillons n'est pas significative

**Xlstat - Test de Kruskal-Wallis**

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 10,387  
P-value associée : 0,006

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

**Conclusion**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes  
Autrement dit, la différence entre les groupes est significative



maltus1	malthus2	npp
3000	3700	3254
3000	2300	9657
3000	3700	1327
1800	3000	336
6000	4800	5507
3000	3700	3254
3000	3700	3790
3700	4800	6520
7600	7600	5507
7600	7600	9657
9800	7600	
6000	3700	
7600	7600	
9800	12000	
7600	16000	
3700	6000	
7600	9800	
7600	9800	
9800	7600	

Xlstat - Comparaison de 2 échantillons indépendants

**Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral**

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,167  
P-value associée : 0,944

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

**Conclusion**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons

Autrement dit, la différence entre échantillons n'est pas significative

Xlstat - Test de Kruskal-Wallis

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 1,302  
P-value associée : 0,522

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

**Conclusion**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes

Autrement dit, la différence entre les groupes n'est pas significative

# *Annexe 7*

## Résultats détaillés des différentes comparaisons statistiques effectuées l'année précédente

maltus1	malthus2	npp
4800	9800	3254
1400	7600	9657
3700	6000	9657
550	6000	3254
3700	7600	5507
1800	6000	780
3700	9800	9657
	9800	9657
	6000	9657

Xlstat - Comparaison de 2 échantillons indépendants

**Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral**

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 1,000  
P-value associée : 5,00E-04

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

**Conclusion**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons

Autrement dit, la différence entre échantillons est **significative**

**Xlstat - Test de Kruskal-Wallis**

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 10,208  
P-value associée : 0,006

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

**Conclusion**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes

Autrement dit, la différence entre les groupes est **significative**



maltus1	malthus2	npp
3700	4800	1630
4800	7600	2900
6000	7600	10340
3700	6000	4750
3000	6000	4200
3700	7600	7800
3700	6000	1960
3700	4800	1960
2300	6000	6250
3000		7800

### Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,778  
P-value associée : 0,005

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

#### Conclusion

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons  
Autrement dit, la différence entre échantillons est **significative**

### Xlstat - Test de Kruskal-Wallis

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 7,317  
P-value associée : 0,026

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

#### Conclusion

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes  
Autrement dit, la différence entre les groupes est **significative**

maltus1	malthus2	npp
210	550	640
210	550	640
170	440	820
270	440	470
270	550	1010
170	890	270
440	890	410
	440	990
	550	500
	710	410

Xlstat - Comparaison de 2 échantillons indépendants

**Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral**

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,889

P-value associée : 0,002

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

**Conclusion**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons

Autrement dit, la différence entre échantillons est **significative**

**Xlstat - Test de Kruskal-Wallis**

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 12,883

P-value associée : 0,002

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

**Conclusion**

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes

Autrement dit, la différence entre les groupes est **significative**

maltus1	malthus2	npp
710	1400	144
210	550	296
440	710	197
550	710	101
350	890	780
550	550	475
270	1400	190
270	550	475
2270	550	652
270	1100	1439

Xlstat - Comparaison de 2 échantillons indépendants

#### Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,667  
P-value associée : 0,018

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

#### Conclusion

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons  
Autrement dit, la différence entre échantillons est **significative**

#### Xlstat - Test de Kruskal-Wallis

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 7,421  
P-value associée : 0,024

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

#### Conclusion

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on peut rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes  
Autrement dit, la différence entre les groupes est **significative**



maltus1	malthus2	npp	
30	81	27	
30	30	130	
30	100	77	
30	30	77	
30	30	47	
30	100	47	
100	81	24	
30	30	27	
30	30	47	
		27	

Xlstat - Comparaison de 2 échantillons indépendants

#### Test de Kolmogorov-Smirnov / test bilatéral

Valeur observée du D de Kolmogorov-Smirnov : 0,250

P-value associée : 0,928

Seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

#### Conclusion

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre échantillons

Autrement dit, la différence entre échantillons n'est pas significative

Xlstat - Test de Kruskal-Wallis

Remarque : le H de Kruskal-Wallis a été calculé en tenant compte des ex æquo

Valeur observée du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 1,591

P-value associée : 0,451

Le test étant unilatéral, la p-value est comparée au seuil de signification :  $\alpha = 0,050$

Valeur critique du H de Kruskal-Wallis, distribué comme un  $\chi^2$  (ddl = 2) : 5,938

#### Conclusion

Au seuil de signification  $\alpha = 0,050$  on ne peut pas rejeter l'hypothèse nulle d'absence de différence entre les 3 groupes

Autrement dit, la différence entre les groupes n'est pas significative

# *Annexe 8*

## Exemples de fiches de suivi d'analyses

**Ifremer**

Date de création : 11 janvier 2001

Date de la révision : 24 avril 2001

Révision 1

Laboratoire DEL de la Tremblade

réf. : 2-FOT/TD/06

FICHE N°1  
RESULTATS D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

Feuille d'analyse des COQUILLAGES  
par la méthode NPP 3 x 5 tubes

Echantillon N° :

Programme :

REMI C    CMIC    Points noirs (PN)    Autres : .....

Prélèvement :

POINT : ..... N° QUADRIGE : .....

Date : ..... / ..... / ..... Heure : ..... h .....mn

Taxon : Huîtres Moules Palourdes Coques Autres : .....

Suspension – mère :

Dilumat n°28

Visa opérateur :

Balance n°: .....

Broyeur – Mixeur n° : 16 27

étiquette dilumat

Ensemencement :

Visa opérateur :



FICHE N°1  
RESULTATS D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

Annexe 2 du chapitre 6 : Plan qualité Surveillance microbiologique

Feuille d'analyse des coquillages  
Méthode par impédancemétrie

Echantillon N° :

Programme :

REMI C     CMIC     Points noirs (PN)     Autres : .....

Prélèvement :  
POINT : .....    N° QUADRIGE : .....  
Date : ..... / ..... / .....    Heure : ..... h ..... mn  
Taxon :  Huîtres     Moules     Palourdes     Coques     Autres : .....  
!

Suspension – mère :  
Dilumat n°28    Visa opérateur :  
Balance n°: .....    Broyeur – Mixeur n° :  16     27  
  
étiquette dilumat

Heure de mise en incubation des cellules : ..... h ..... mn    visa :