

# VALIDATION INTERNE DE LA METHODE DE DENOMBREMENT DES *ESCHERICHIA COLI* PRESUMES PAR IMPEDANCEMETRIE



Promotion 2001-2002

Rapport de stage rédigé  
par Géraldine KARSENTY

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	3
PREAMBULE	4
INTRODUCTION	5
<u>I) Présentation de l'Ifremer</u>	7
1° Historique	7
2° Présentation de la station Ifremer de la Tremblade et du laboratoire DEL	8
3° Les partenaires principaux	9
4° Assurance qualité	10
<u>II) Préparation des milieux de culture</u>	12
<u>III) Préparation des coquillages et de la solution mère</u>	16
1° Choix de l'espèce de coquillage	16
2° La contamination des coquillages	16
3° Transport et réception des échantillons	17
4° Nettoyage des échantillons	18
5° Préparation de la solution mère	18

---

<b><u>IV) Les techniques d'analyse</u></b>	20
<b>1° La technique indirecte par impédancemétrie directe</b>	20
<i>a/ Principe</i>	20
<i>b/ L'analyseur microbiologique Malthus</i>	22
<i>c/ Ensemencement</i>	23
<i>d/ Lecture des résultats</i>	25
<b>2° La technique du nombre le plus probable</b>	26
<i>a/ Principe</i>	26
<i>b/ Ensemencement</i>	26
<i>c/ lecture et repiquage</i>	27
<b>3° Les avantages et les inconvénients des deux techniques</b>	29
<b><u>V) Résultats et interprétations</u></b>	30
<b>1° Bilan des résultats pour les deux techniques</b>	30
<b>2° Etude statistique</b>	30
CONCLUSION	32
LEXIQUE	33
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	35
TABLE DES ANNEXES	36
RECHERCHE DE GERMES DANS LES EAUX DE BALLASTS	63

# REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Roger Kantin chef de laboratoire de la Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral (DEL) de la Tremblade pour m'avoir ouvert les portes de son établissement et d'avoir pris en considération ma candidature.

Je remercie également Monsieur Christian Auger, responsable assurance qualité et maître de stage pour avoir supervisé et dirigé mon séjour dans l'entreprise, ainsi que pour son aide à la rédaction du rapport.

Je remercie Monsieur Olivier Courtois responsable technique de l'unité microbiologique, Messieurs Jean Côme Piquet, Didier Roësberg, et Mlle Elodie Muraro techniciens microbiologistes pour leurs conseils lors des manipulations et leur aide et disponibilité tout au long de ce stage.

Que Monsieur Daniel Masson responsable statistique, soit aussi remercié pour son aide lors de l'interprétation des résultats.

Je garderai longtemps un agréable souvenir de l'ensemble de l'équipe du laboratoire pour son accueil et sa bonne humeur.

# PREAMBULE

Le laboratoire Ifremer DEL (Direction de l'environnement et de l'aménagement du littoral) de la Tremblade accrédité COFRAC\* a mis en place la technique de dénombrement des *Escherichia coli* présumés par impédancemétrie dans les coquillages marins, technique utilisée en routine.

Cette technique doit permettre d'obtenir des résultats équivalents par rapport à ceux obtenus à partir de la méthode de référence : la méthode NPP\* (nombre le plus probable). Des analyses ont été menées les deux années précédentes par d'autres stagiaires de l'IUT génie biologique afin de vérifier la corrélation entre les deux méthodes.

La norme NFV 08-106 concernant la technique indirecte par impédancemétrie directe a été éditée en janvier 2002 :

Elle prévoit que le contrôle de l'étalonnage nécessite le dénombrement d'*Escherichia coli* dans vingt échantillons de coquillages naturellement contaminés. Ce contrôle, décrit dans la norme doit être conduit en parallèle avec la technique NPP (Norme NF V 08-600 parue en octobre 2000).

(Voir la description de l'étalonnage en **annexe 1**)

Il est à noter qu'actuellement, au laboratoire de la Tremblade, la méthode de dénombrement des *Escherichia coli* présumés\* par la technique indirecte par impédancemétrie directe est étalonnée par la méthode NPP décrite dans la circulaire DGAL/SDHA/N98-8137 du 19 Avril 1998 (Méthode qui demandait d'employer le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) comme milieu sélectif).

La révision de cette circulaire a donné lieu à l'élaboration d'une nouvelle norme concernant le dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages marins vivants par le méthode NPP (Norme NFV 08-600).

Cette norme datée d'Octobre 2000 est donc le document de référence pour ce type de dénombrement.

Le travail à conduire pendant mon stage consistera à vérifier si l'équivalence entre l'étalonnage de l'analyseur microbiologique Malthus et la nouvelle norme de référence NF V 08-600 est maintenue.

*Les mots suivis du signe \* sont expliqués dans le lexique en fin de rapport*

# INTRODUCTION

La région de Marennes Oléron est réputée aussi bien pour ses plages que pour sa production de coquillages et en particulier d'huîtres.

Depuis longtemps, il est connu que les coquillages comestibles peuvent être vecteurs de maladies pour l'homme. Ce phénomène est en relation avec la capacité de survie de microorganismes entériques\* dans l'environnement marin littoral et à leur concentration dans les coquillages filtreurs.

→ En effet, les coquillages de part leurs pouvoirs de filtration, d'absorption et d'accumulation des microorganismes sont traditionnellement considérés comme des témoins de la qualité des eaux de production.

Actuellement, la protection de la santé publique repose sur la surveillance de la qualité bactériologique des eaux marines côtières à l'aide de coquillages, qui sont donc de véritables indicateurs de pollution.

Aujourd'hui encore, il est matériellement impossible de rechercher et de dénombrer en routine tous les microorganismes pathogènes d'origines entériques qui pourraient contaminer le milieu marin en raison de la durée, des coûts, et de la disponibilité des techniques analytiques.

Pour ces raisons, la surveillance bactériologique est essentiellement basée sur le dénombrement de groupes indicateurs\*. Dans cette étude nous utiliserons les coliformes\* thermotolérants, germes tests de la qualité sanitaire de la denrée, qui permettent d'évaluer le risque de présence de germes pathogènes\*.

La bactérie *Escherichia coli* a été retenue comme germe indicateur de contamination fécale dans les réglementations officielles nationales ou communautaires relatives au classement des zones conchylicoles et à la qualité microbiologique des denrées alimentaires.

Les *Escherichia coli* sont défini comme des « coliformes thermotolérants\* qui produisent de l'indole à 44°C en 24 heures ». Dans la mesure où l'identification des coliformes thermotolérants par la méthode NPP est basée sur la détection de l'indole\*, et que *Escherichia coli* est quasiment le seul à pouvoir produire de l'indole à partir du tryptophane, les coliformes thermotolérants détectés sont nommés : « ***Escherichia coli* présumés** ».

L'Ifremer, pour ses analyses de routine utilisait la technique manuelle du nombre le plus probable (NPP), mais cette technique présentait de nombreux inconvénients.

Depuis une quinzaine d'années environ des essais de développement de techniques instrumentales sont déployés pour y remédier.

Parmi ces techniques, la technique de dénombrement des *Escherichia coli*, utilisant l'impédancemétrie est aujourd'hui pratiquée en routine par le laboratoire microbiologique de la Tremblade pour la surveillance du littoral.

Dans une première partie je présenterai l'historique de l'Ifremer, puis la partie technique comprenant : la préparation des milieux de culture, la préparation des échantillons et celle de la solution mère. Par la suite j'étudierai les techniques d'analyses et enfin l'interprétation des résultats.

## I) Présentation de l'Ifremer

### 1° 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'ISTPM (Institut scientifique et technique des pêches maritimes). Il est placé sous la tutelle de ministères chargés de la recherche, des pêches et cultures marines, de l'équipement, du logement, des transports. L'Ifremer est constitué de 78 laboratoires ou services de recherche répartis dans 24 stations ou centres sur le littoral métropolitain et dans les DOM-TOM.

L'institut scientifique et technique des pêches maritimes a été pendant 71 ans à la Tremblade au service du bassin de Marennes Oléron. Un historique sommaire peut être dressé :

1913 : Création de l'AEIO (Association d'Encouragement des industries Ostréicoles et conchylicoles française) à la Tremblade.

1918 : Création de l'OSTPM (Office Scientifique 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 Tremblade.

1984 : Création de l'Ifremer.

Les Ifremer sont organisés 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 Navales (DMON).

## 2° Présentation de la station Ifremer de la Tremblade et du laboratoire DEL

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 :

◆ Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral (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.

◆ 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.

◆ 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 les bassins. Elle contrôle aussi les agents pathogènes.



Le laboratoire de 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. Il 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.

Parmi les réseaux opérés par le laboratoire, 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 tendances des polluants, 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 le niveau de contamination des coquillages ( huîtres, moules, coques, ...).

Les concentrations en *Escherichia coli* présumés trouvées dans la Chair et le Liquide Intervalaire (CLI) des coquillages constituent des indicateurs de pollutions fécales dans les eaux côtières. Les contaminations importantes peuvent indiquer une présence d'autres bactéries pathogènes pour l'homme et des virus quand à eux, sont difficilement détectables à l'heure actuelle.

### 3° 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.

➤ L'Administration des Affaires Maritimes

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

➤ 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.

➤ 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.

- 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 de l'application 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.

- 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 sont chargés 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.

## 4° Assurance qualité

Afin de garantir des résultats d'analyse fiables, la direction de 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 (manuel qualité, plan qualité, procédures, enregistrements,...) et organisationnels permettant de prouver que les analyses ont été réalisées suivant toutes les conditions imposées par les différents protocoles et documents de prescription, du prélèvement jusqu'à la diffusion des résultats.

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

Dans le but de répondre à un objectif d'accréditation par le COFRAC des analyses microbiologiques liées au réseau REMI, 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 culture ensemencés, ni retours en arrière. Chaque étape de manipulation se déroule donc dans une salle qui lui est spécialement attribuée.

Le laboratoire est ainsi composé d'une salle de préparation des milieux, d'une salle d'ensemencement, d'une salle de repiquage,... et la disposition des salles les unes par rapport aux autres est telle que l'échantillon « se déplace » au fur et à mesure de son analyse sans jamais interférer avec un autre échantillon qui ne serait pas au même stade d'analyse (et ce afin d'éviter toute contamination).

Ce laboratoire fonctionne grâce à trois analystes ainsi qu'une employée en CDD, qui, pour répondre aux exigences de la norme, doivent suivre un plan de formation continue.

Cette démarche a abouti, il y a peu de temps à l'accréditation par le COFRAC du laboratoire DEL de la Tremblade, pour ses activités d'analyses microbiologiques (sur les coquillages).

Mais pour que le laboratoire ait été accrédité COFRAC, il a fallu auparavant soumettre toute l'équipe de la DEL à un audit\*, qui s'est déroulé en juin 2002. A la suite de cet audit et de la délibération de la commission du COFRAC, (pour décider l'accréditation ou non du laboratoire), le laboratoire a été accrédité le 18 septembre 2002.

Mais l'accréditation n'est pas attribuée une fois pour toutes. Tous les 13 mois, le laboratoire doit se soumettre à un nouvel audit s'il veut reconduire l'accréditation.

J'ai assistée à un audit à blanc destiné à la préparation de l'audit COFRAC de confirmation de septembre 2002.

Le premier jour, l'audit démarra par une réunion d'ouverture, où assistaient toutes les personnes concernées par l'assurance qualité dans le laboratoire de microbiologie.

Lors de cette réunion d'ouverture, l'auditeur examina les plans qualités ainsi que le manuel qualité. Puis il visita le laboratoire et il vérifia un grand nombre de points techniques comme la température des étuves, les paramètres et documents concernant l'analyseur microbiologique Malthus.

Le deuxième jour, l'auditeur COFRAC, effectua aussi un essai de traçabilité ; c'est à dire qu'à partir de la feuille de suivi d'un échantillon il put retrouver les heures de prélèvement des coquillages, de l'ensemencement des milieux, des lectures... Nous pouvons aussi remonter jusqu'à la fabrication des milieux de culture pour connaître le numéro de lot utilisé, le numéro d'autoclavage, ou bien pour savoir si les milieux étaient aptes à être utilisés grâce aux tests SFI (Stérilité, Fertilité, Inhibition).

A la réunion de clôture, l'auditeur lista des remarques et non conformités observées et transmis quelques solutions pour améliorer le système qualité du laboratoire de microbiologie.

## II) Préparation des milieux de culture

Durant ces analyses, j'ai utilisé différents milieux de culture ou diluants :

- TS
- MCB
- BTLS simple concentration et BTLS double concentration
- EC
- EPI

### TS (Tryptone sel)

C'est le diluant de la solution mère, utilisé lors de la dilution de la suspension mère et des dilutions au 1/10 de celle-ci.

Composition : -Digestat enzymatique de caséine

-Chlorure de sodium

-Eau

Cette préparation se présente sous forme de poudre. On dilue 9.5g dans 1l d'eau distillée.

La solution salée est utilisée comme diluant au lieu d'eau stérile distillée. Le chlorure de sodium permet de garder un état isotonique, c'est à dire d'obtenir la même concentration en sel à l'intérieur des cellules par rapport à l'environnement extérieur. Ceci pour éviter la destruction des cellules.

La tryptone assure la revivification des microorganismes ayant subi des traitements subléthaux.

Le pH est établi à  $7,0 \pm 0,2$  unité pH à 25°C après autoclavage.

On répartit cette solution dans des flacons de 1000ml, 70ml et 9ml.

L'autoclavage est effectuée à 121°C pendant 15 minutes.

### MCB (Malthus Coliform Broth)

C'est le milieu spécifique utilisé pour la technique par impédancemétrie. Il permet la croissance des *Escherichia coli* et permet de bien visualiser les variations de conductance provoquées par la croissance de cette bactérie.

Composition : -Digestat enzymatique de caséine

-Extrait de levure

-Lactose

-Chlorure de sodium

-Laurylsulfate de sodium

On dilue 10,9g dans 1l d'eau distillée.

Le pH, après autoclavage, doit être de  $7,3 \pm 0,2$ .

Le milieu est réparti par volume de 90 ml dans les cellules de mesures adaptées au système d'impédancemétrie (analyseur microbiologique).

Ce milieu renferme notamment une peptone optimisant les variations de conductance dues à l'activité métabolique microbienne, du lactose fermenté par les coliformes, du laurylsulfate de sodium inhibiteur de la flore secondaire\*, et du chlorure de sodium qui améliore la vitesse de multiplication des coliformes pendant la phase de croissance exponentielle.

### **BTLS** (Bouillon à la tryptose et au laurylsulfate)

C'est un milieu d'enrichissement sélectif des coliformes.

Composition : -Digestat enzymatique de caséine  
-Lactose  
-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
-Chlorure de sodium  
-Laurylsulfate

Le pH doit être établi à  $6,8 \pm 0,2$  après autoclavage.

Le volume de milieu introduit dans chaque tube contenant des cloches de Durham est de 10 ml.

Les cloches permettent de vérifier la présence de gaz.

On l'utilise en simple et en double concentration en fonction de la quantité d'innoculum apporté.

Le laurylsulfate de sodium a pour but d'inhiber le développement de la flore secondaire contaminante.

En raison de son excellent pouvoir nutritif, et de la présence de tampons phosphates, le bouillon à la tryptose et au laurylsulfate permet aux coliformes de se développer rapidement et de produire un dégagement gazeux important par fermentation du lactose, même avec de faibles innoculum.

**EC** (milieu sélectif des *Escherichia coli*)

Composition : -Tryptone

-Sels biliaires

-Lactose

-KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

-Chlorure de sodium

Ajustement du pH de sorte qu'après autoclavage il soit de  $6,8 \pm 0,2$ .

On ajoute une cloche de Durham permettant de vérifier la présence de gaz dans chaque tube contenant 10 ml de milieu.

Le bouillon EC est utilisé pour la recherche des coliformes thermotolérants et des *Escherichia coli* présumés. Il doit être utilisé après un bouillon d'enrichissement sélectif (Bouillon à la tryptose et au laurylsulfate).

Ce milieu contient une peptone comme source nutritive et du lactose, comme source de carbone pour les coliformes. Les sels biliaires inhibent la croissance des bactéries à Gram positifs comme les bacilles et les streptocoques fécaux.

**EPI** (eau peptonée exempte d'indole)

Elle est utilisée en parallèle avec les tubes EC.

Composition : -Tryptone

-Chlorure de sodium

La répartition se fait par fraction de 10ml dans des tubes à vis. Le pH de l'EPI, après stérilisation doit être de  $7,2 \pm 0,2$ .

Ce milieu permet la croissance de germes ne présentant pas d'exigences particulières.

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

**REACTIF DE KOVACS**

Il est utilisé pour vérifier la production d'indole à partir de tryptophane dans les tubes d'EPI. La réaction entre le réactif et l'indole produit un anneau rouge dans la partie supérieure du tube.

C'est une préparation commerciale prête à l'emploi.

## REALISATION DES TESTS SFI

Une fois un milieu de culture préparé, il est nécessaire de contrôler son pH, sa stérilité, sa fertilité et son inhibition (performance biochimiques).

Tout d'abord, on contrôle son pH qui doit être conforme aux prescriptions du fabricant. Puis on procède à des tests que l'on nomme : **TESTS SFI** (Stérilité, Fertilité, Inhibition).

Pour le contrôle de la stérilité, le milieu est incubé sans l'ensemencer.

Après incubation à 37°C pendant 24 heures  $\pm$  1h, aucun trouble, opacité ou dépôts ne doivent apparaître dans le milieu, sinon, le milieu est considéré comme contaminé.

On vérifie, par la fertilité, s'il y a bien croissance de la bactérie dans le milieu. Pour réaliser ce test, on introduit *Escherichia coli* dans le milieu de culture. Après incubation à 37°C pendant 24 heures  $\pm$  1h, on constate le développement d'*Escherichia coli* en observant un trouble, un dégagement gazeux ou bien dans le cas du milieu EPI un anneau rouge après addition de Kovaks.

Afin de réaliser le test d'inhibition, on ensemence un inoculum de bactéries *Enterococcus faecalis* dans les milieux et on vérifie après incubation son absence en constatant un milieu limpide (effet inhibant du milieu). Dans le cas du milieu EPI aucun anneau rouge ne doit apparaître en haut du tube.

Pour les milieux qui n'aurait pas un pH satisfaisant après autoclavage ou bien un des tests SFI non valide, ceux-ci sont considérés comme non conforme aux exigences du laboratoire. L'ensemble du lot est jeté et une autre fabrication de milieu est effectuée. Une fiche d'anomalie (constatation d'un écart) est établie.

## III) Préparation des coquillages et de la solution mère

### **1° Choix de l'espèce de coquillage**

Au début du stage, la matrice huître a été utilisée pour les premières analyses.

Après différents essais de contamination, les moules ont été préférées aux huîtres, celles-ci, concentrant plus rapidement les microorganismes que les huîtres.

Pour un temps d'exposition de trois ou quatre jours, les moules présentaient en effet un niveau de contamination en *Escherichia coli* présumés plus élevé que les huîtres.

### **2° La contamination des coquillages**

Les coquillages sont achetés à un producteur et ils sont mis en attente dans un bassin appartenant à l'Ifremer : le dégorgeoir, dans l'attente d'être déposées dans le chenal où elles se contamineront.

Les coquillages, moules (*Mytilus edulis*) ou les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) sélectionnés sont placés dans des poches et disposés dans un chenal afin d'y être contaminés naturellement.

Le plus souvent, les moules ont été déposées le vendredi soir, et récupérées le lundi matin ou mardi matin.

Le chenal choisi est celui de Cagouillac, chenal ostréicole situé rive nord de la Seudre et soupçonné d'être contaminé par des rejets provenant d'une exploitation agricole et d'un camping rencontrant des problèmes d'assainissement.

La durée du séjour des coquillages a été comprise entre 3 et 7 jours comme l'indique le tableau 1.

Coquillages	lieu	Nombre d'analyses	Date du dépôt	Date du prélèvement et de l'analyse	Durée de la contamination
Huître	Cagouillac	4	10/04/2002	16/04/2002	5 jours
Huître	Cagouillac	4	16/04/2002	22/04/2002	6 jours
Huître	Cagouillac	4	16/04/2002	23/04/2002	7 jours
Huître	Cagouillac	4	07/05/2002	<b>LOT DISPARU</b>	
Moule	Cagouillac	4	17/05/2002	21/05/2002	4 jours
Moule	Cagouillac	8	24/05/2002	27/05/2002	3 jours
Moule	Cagouillac	9	30/05/2002	03/06/02	3 jours

**Tableau 1 : Contamination des lots de coquillages dans le chenal de Cagouillac**

### 3°Transport et réception des échantillons

Les coquillages sont placés dans des sacs fermés et identifiés.

Ils sont ensuite transportés dans des glacières contenant des blocs réfrigérants ; qui doivent être comprises entre +2 et +15 °C afin de stabiliser les quantités de microorganismes piégées par les coquillages.

Dès leurs arrivés, les échantillons sont identifiés grâce à des étiquettes en vue de leur nettoyage et de la préparation de la solution mère.

Chaque échantillon est doté d'un numéro, noté sur les étiquettes avec l'heure de prélèvement.

Conformément au plan d'assurance qualité, les résultats concernant chaque échantillon sont notés sur une fiche d'analyse « Résultats d'analyse microbiologique » fonction du type d'analyse pratiquée.

Cette fiche permet de tracer toutes les données relatives à l'échantillon.

(cf. **annexe 2**)

Ainsi toutes les informations liées au prélèvement, à l'analyse effectuée, à la lecture des résultats et aux milieux utilisés y sont recensés.

#### 4° Nettoyage des échantillons

Dans une salle du laboratoire réservée à cet effet, les coquillages sont nettoyés sous un filet d'eau courante afin d'éliminer la vase et autres souillures externes.

Le nettoyage se fait particulièrement au niveau de la charnière pour éviter l'introduction de vase et de contaminants dans la solution mère lors de l'ouverture des coquillages.

Dans le cas des moules, le byssus\* est coupé au moyen d'une paire de ciseaux stérilisée par flambage à l'alcool.

#### 5° Préparation de la solution mère

Dans une salle du laboratoire, consacrée à ce travail, les coquillages sont ouverts stérilement, c'est à dire dans la zone de stérilité du bec Bunsen.

Puis la chaire et le liquide intervalvaire (CLI) sont récupérées dans un bol broyeur stérile.

La quantité de CLI prélevée doit être comprise entre 75 et 100g afin d'obtenir une quantité suffisante de solution mère pour la réalisation de l'analyse.

Une dilution au tiers est ensuite effectuée à l'aide d'un système automatisé : le DILUMAT.

Celui-ci délivre la solution de diluant (le Tryptone sel) en fonction de la masse de CLI prélevée.

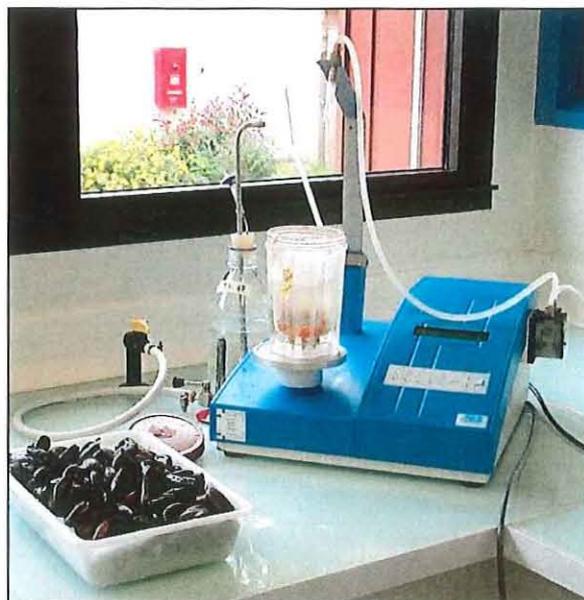
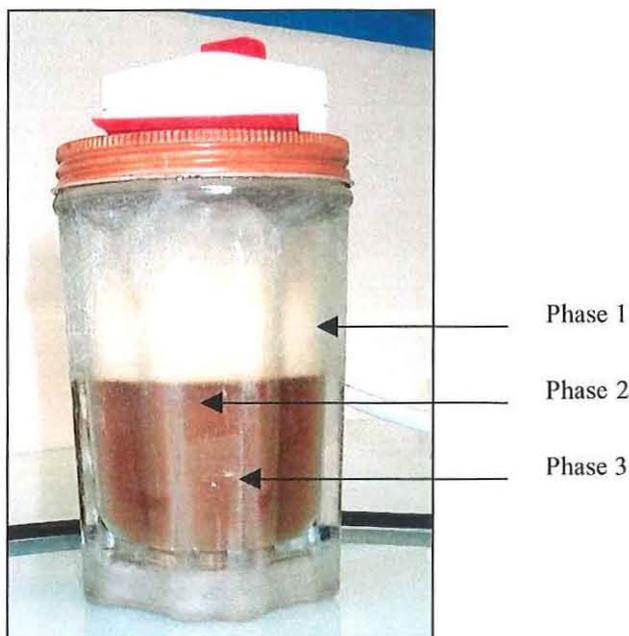


Photo 1 : Préparation de la solution mère

Puis le contenu du bol est broyé pendant 55 secondes et mis à décanter 20 minutes.

Ceci permet aux grosses particules (fragments de chaire de coquillage) de tomber dans le fond du bol et de laisser apparaître la phase liquide du broyat. De même, ce temps de décantation permet une revivification des bactéries stressées par le broyage.

Après décantation on obtient 3 phases :



**Photo 2 : Bol broyeur et solution mère**

Phase 1 : mousse obtenue par le broyage.

Phase 2 : C'est la phase la plus liquide contenant la plus grande partie des microorganismes représentatifs de la flore de l'huître.

Phase 3 : Phase épaisse contenant des grosses particules non broyées (fragment de chaire de coquillages). Cette phase n'est visible qu'après les 20 minutes de décantation.

Pour ensemercer les milieux de culture on prélèvera donc dans la phase la plus riche en microorganismes : phase numéro 2 ou phase liquide.

## IV) Les techniques d'analyse

Il est à noter que toutes les enceintes thermostatées, étuve et bains-marie sont surveillées à l'aide de sondes, par un système de surveillance de température automatisé.

### 1° la technique indirecte par impédancemétrie directe

C'est la nouvelle technique utilisée en routine, car permettant d'obtenir des résultats d'analyses en moins de 12 heures.

#### a/ Principe

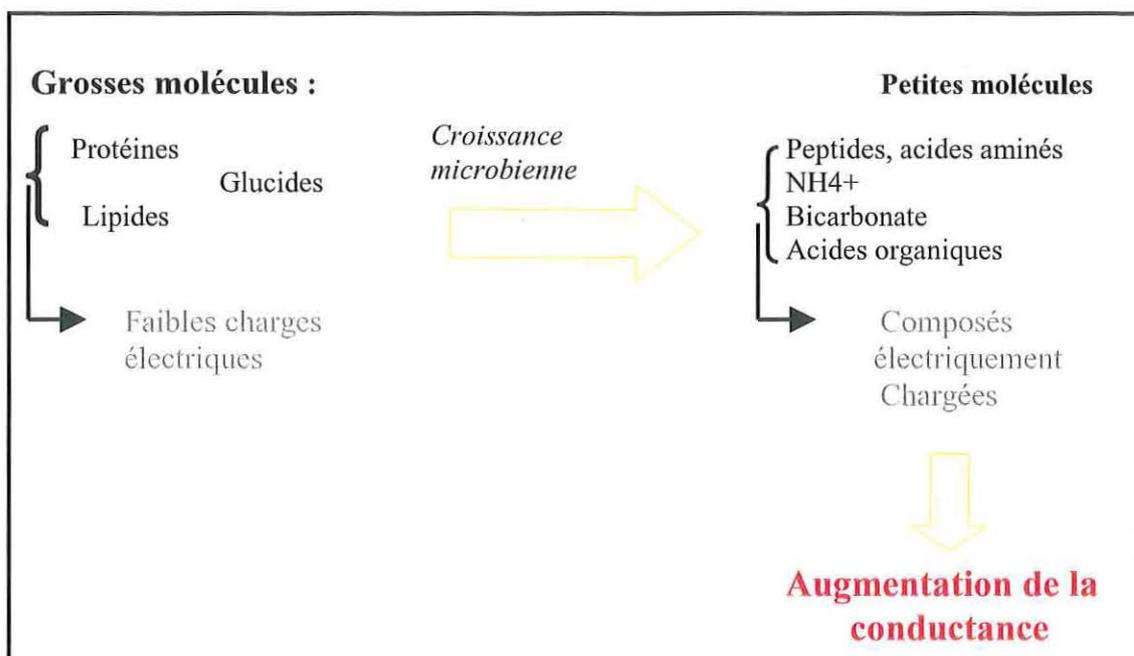
Le principe de cette technique repose sur la variation de conductance de cultures bactériennes ; dans ce cas *Escherichia coli*.

- ↳ Les bactéries sont mises en croissance dans un milieu qui se modifie.
- ↳ Les substances nutritives de ce milieu étant transformées en produits terminaux du métabolisme.

Ainsi, le catabolisme bactérien convertit les molécules électriquement **non chargées** comme les glucides et les lipides en plus petites molécules **chargées** tel que l'acide lactique, l'acide acétique ou le bicarbonate.

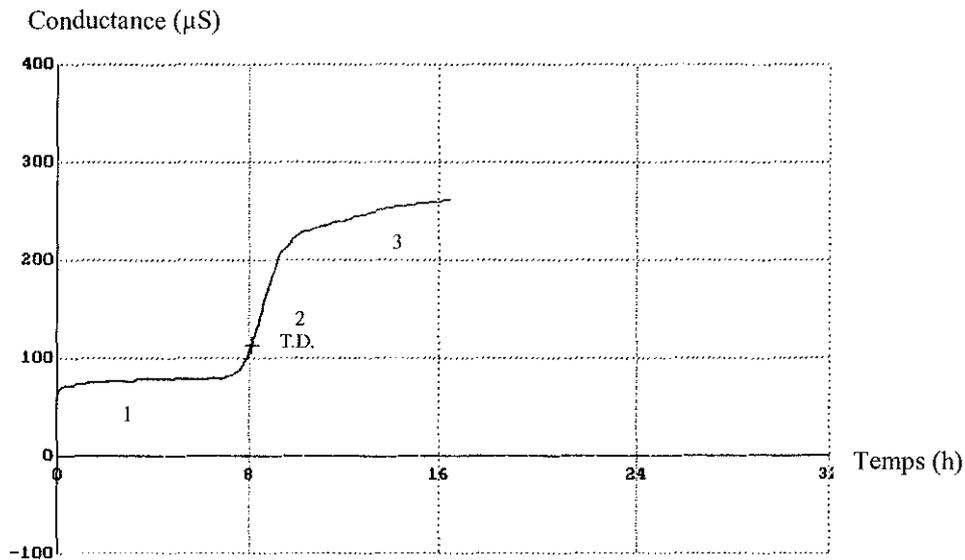
Par conséquent les molécules chargées, telles que les polypeptides et les protéines sont transformés en acides aminés puis en ions ammonium et en ions hydrogénocarbonate par les bactéries.

Plus il y'a de croissance bactérienne, plus le nombre d'ions par transformation de molécules neutres augmentent  **La conductance croît**



La variation de la conductance en fonction du temps est similaire à une courbe de croissance bactérienne classique.

On dira donc que la conductivité traduit ainsi une croissance bactérienne.



**Fig 1 : Variation de la conductance d'une culture d'*Escherichia coli* en fonction du temps**

Nous pouvons observer 3 phases

**1 Phase de latence** : C'est la phase d'adaptation enzymatique, les bactéries s'adaptent au milieu et elles commencent à se développer.

**2 Phase exponentielle** : C'est la phase où la croissance bactérienne est la plus forte.

**3 Phase stationnaire** : Il y a autant de bactéries qui se développent et qui meurent. Les ressources nutritives manquent et les déchets produits par les bactéries acidifient le milieu et le rendent toxique pour elles.

A un certain moment, la concentration en ions (particules électriquement chargées) s'accroît de telle sorte qu'elle entraîne une augmentation mesurable de la conductance.

Ce qui traduit en fait, une augmentation en nombres de bactéries. (croissance bactérienne).

C'est le changement d'orientation de la courbe de croissance ou «point d'inflexion» qui est détecté par le logiciel de l'appareil.

➔ Le logiciel en déduit un temps de détection et le traduit en concentration d'*Escherichia coli* présumés.

Plus le TD est court, plus la charge bactérienne est élevée. A chaque temps de détection correspond un nombre d'*Escherichia coli* présumés dans 100g de CLI.

### *b/ L'analyseur microbiologique Malthus*

Le mode opératoire de cette technique est simple mais il prévoit l'utilisation d'un appareil perfectionné.

#### L'appareil de mesure :

L'appareil permettant la mesure de la conductance est appelé analyseur microbiologique Malthus AT.

Le système comprend :

- + Deux bains maries qui sont réglés à  $44,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (température de croissance des *Escherichia coli*) qui peuvent recevoir chacun 20 cellules de mesure.

- + Une unité d'acquisition de données contrôlant et stockant les mesures de conductance.

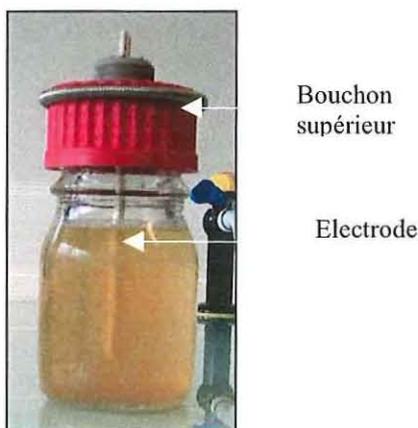
- + Un ensemble informatique (ordinateur, imprimante, logiciel FLEXI) récupérant et traitant les données stockées dans l'unité d'acquisition et éditant les résultats sous forme graphique ou numérique.



**Photo 3 : L'analyseur microbiologique Malthus**

Les cellules adaptées à ce système sont constituées de plusieurs éléments :

- Un joint permettant de rendre hermétique la cellule.
- Un flacon de 100 ml munis d'une électrode en platine sur une plaque de céramique supportée par un bouchon.
- Le bouchon supérieur permettant de fermer le tout.
- Un connecteur permettant de relier l'électrode à l'ordinateur du système de mesure Malthus.



**Photo 4 : Cellule malthus**

### *c/ Ensemencement*

Le mode de préparation de la cellule et les conditions d'ensemencement sont optimisés afin d'obtenir une fiabilité des courbes et du temps de détection.

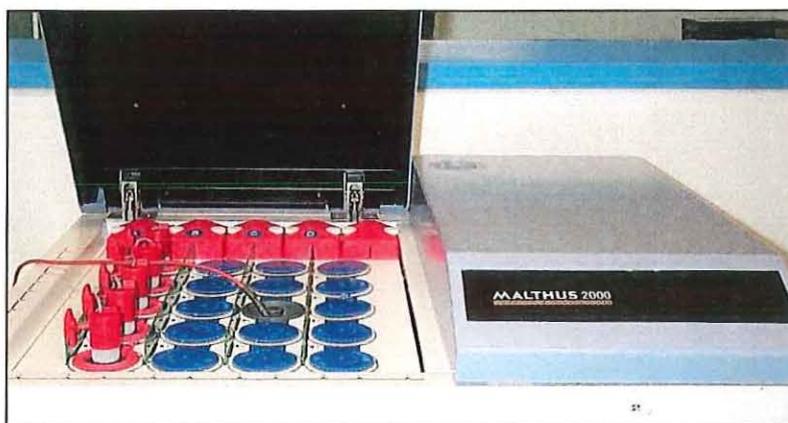
Le protocole suivant a donc été retenu :

Après le broyage de 75 à 100g de Chaire et Liquide Intervalvaire (CLI), la préparation est diluée au tiers avec du Tryptone sel et mise à décanter 20 minutes.

-Les cellules contenant 90 ml de milieu MCB sont ensemencées à température ambiante avec 10 ml de solution mère.

-Le milieu et l'inoculum sont soigneusement homogénéisés.

Pour chaque échantillon, deux cellules sontensemencées, chacune d'elle étant placée dans un incubateur différent réglé à  $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , connectés à l'unité d'acquisition de données.



**Photo 5 : L'analyseur microbiologique Malthus contenant des cellules**

Pour prévoir à un éventuel problème avec une des deux cellules (non acquisition de la cellule par le logiciel Flexi par exemple), un pilulier est rempli avec environ 25 ml de solution mère qui servira à ensemencer une autre cellule.

Les données de l'échantillon sont rentrées dans l'ordinateur (numéro de l'échantillon, emplacement de la cellule dans le bain-marie...).

Cette opération achevée, le suivi du développement d'*Escherichia coli* dans les cellules de mesure peut commencer.

*d/ lecture des résultats*

Le mesurage doit être poursuivi jusqu'à l'obtention d'un temps de détection et/ou au moins jusqu'à 9 heures d'incubation.

Seul les TD inférieurs à 9 heures traduisent la présence d'*Escherichia coli* présumés.

Les TD supérieurs à 9 heures ne sont pas pris en compte et le nombre d'*Escherichia coli* présumés est déclaré inférieur au seuil de détection de la méthode, soit  $< 30$ .

Puis pour chacune des cellules de mesure on examine la courbe d'impédance et on vérifie qu'elle est bien interprétable.

Deux cas peuvent de présenter :

- Si elle n'est pas lisse, on ne tient pas compte de ce résultat : elle n'est pas interprétable. (cf. **annexe 3**)
- Si la courbe obtenue est similaire à une courbe de croissance bactérienne et qu'elle est bien lisse : la droite est interprétable. (cf. **annexe 3**)

Dans ce cas on condamne l'emplacement, on met de côté l'électrode et le connecteur en attendant de les tester. De même l'emplacement est contrôlé à l'aide de résistances de valeurs connues afin de vérifier d'où provient le défaut dans le fonctionnement.

Grâce aux courbes interprétables, on obtient un temps de détection (TD) pour chacune des cellules. La correspondance entre le temps de détection et le nombre d'*Escherichia coli* présumés dans 100g de Chaire et Liquide Intervalvaire est établie à l'aide d'une table de correspondance. (cf. **annexe 4**)

⇒ On obtient donc un nombre d'*Escherichia coli* présumés dans 100g de CLI.

Pour chaque essai, s'il n'a pas eu de problèmes avec une des deux cellules, on obtient deux TD donc deux résultats d'*Escherichia coli* présumés ( $N_1$  et  $N_2$ ) dans 100g de CLI.

On calcule ensuite la moyenne géométrique ( $N$ ) des essais afin d'obtenir un résultat intermédiaire. ( $N = \text{racine carrée de } N_1 \times N_2$ )

## 2° La technique du Nombre le Plus Probable

C'est la technique de référence. A l'heure actuelle elle n'est utilisée qu'occasionnellement ou lorsque l'analyseur microbiologique Malthus présente un défaut de fonctionnement.

### *a/ Principe*

La technique de dénombrement en milieu liquide (méthode NPP) a été retenue car elle permet de **révéler** des quantités de microorganismes plus faibles que la technique sur milieu solide (méthode par comptage des colonies).

Le principe de cette technique est le suivant :

Cette méthode permet d'évaluer le nombre d'*Escherichia coli* présumés dans des coquillages marins vivants.

Les *Escherichia coli* présumés sont des bactéries fermentant le lactose à 44°C avec production de gaz. De plus, elles produisent de l'indole à partir du tryptophane.

Cette technique utilise la méthode de repiquage sur un milieu exempt d'indole pour vérifier la production d'indole par les bactéries. On met en évidence la production d'indole à partir du tryptophane en ajoutant dans les tubes du réactif de Kovaks.

### *b/ Ensemencement*

Après avoir broyé entre 75 et 100g de CLI avec la solution Tryptone sel dans les bols broyeurs et laissé reposer 20 minutes, on fait une dilution au 10<sup>ème</sup> en introduisant 30 ml de la solution mère dans 70 ml de Tryptone sel : solution fille.

La norme prévoit que l'on fasse deux mesures par échantillon donnant des estimations de catégorie 1 ou 2 et ne différant pas de plus d'un facteur 10.

Deux portoirs de tubes seront doncensemencés.

Par portoir :

- ◆ On ensemence 5 tubes de milieu d'enrichissement BTLS double concentration avec 10 ml de la solution fille.
- ◆ Puis 5 tubes de BTLS simple concentration avec 1ml de la solution fille.
- ◆ Une dilution au 10<sup>ème</sup> de la solution fille est effectuée et on ensemence dans les mêmes conditions 5 tubes de BTLS simple concentration.
- ◆ Si la contamination des coquillages est soupçonnée forte connaissant la qualité du chenal et la présence ou non de pluies antérieures : Une autre série de tubes de BTLS simple concentration est ensemencée à partir de la dilution au 10<sup>ème</sup>, en introduisant 1 ml de la dilution précédente dans un nouveau tube de 9 ml de Tryptone sel.

L'incubation des deux portoirs se fait à 37,0°C ± 1°C pendant 48 heures ± 2heures.

### *c/ lecture et repiquage*

La lecture des tubes s'effectue en deux étapes :

Après 48 heures d'incubation pour les coliformes thermotolérants.

Après 24 heures  $\pm$  1 heure pour la lecture des *Escherichia coli* présumés dans les tubes repiqués.

#### 1<sup>ère</sup> lecture à 48 heures.

A partir de chaque tube présentant une opacité, un trouble ou un dégagement gazeux dans les cloches de Durham (tubes positifs), on réalise un repiquage.

A partir de chaque tube positif on ensemence un tube de milieu EPI et un tube de milieu EC à l'aide d'une oëse de 10 $\mu$ l en matière plastique stérile.

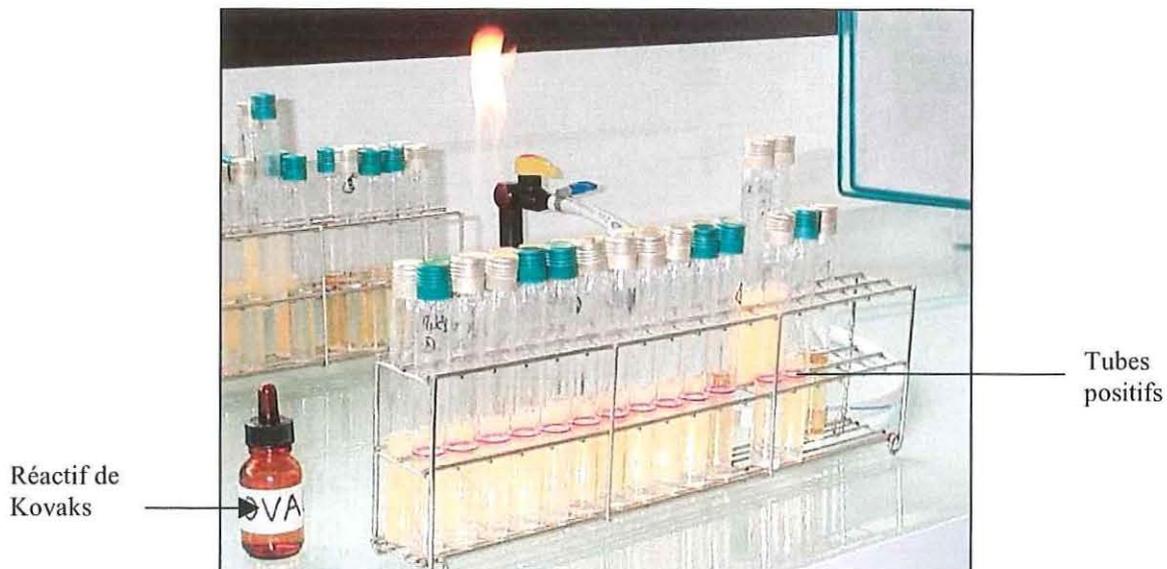
L'incubation se fait à 44,0°C  $\pm$  1°C dans un bain-marie pendant 24h  $\pm$  1 heure.

#### 2<sup>ème</sup> lecture à 24 heures.

Au terme de 24h, pour chaque tube d'EC positif, (c'est à dire présentant un dégagement gazeux dans la cloche de Durham) on ajoute trois gouttes de réactif de Kovaks dans le tube d'EPI correspondant pour la recherche d'indole.

Si l'on observe un anneau "rouge cerise" dans la partie supérieure du tube, il y a présence d'indole, et le tube est considéré comme positif.

⇒ Présence d'*Escherichia coli* présumés.



**Photo 6 : Représentation des tube positifs lors de la deuxième lecture après addition de Kovaks**

La détermination du nombre le plus probable d'*Escherichia coli* présumés dans 100g de CLI est obtenu au moyen de la table NPP, à partir de chaque tube positif.

(cf. **Annexe 5**)

Le nombre d'*Escherichia coli* dans 100g est obtenu en multipliant le coefficient NPP par 100 (Les résultats dans la table sont établis pour 1g de CLI).

Suivant le coefficient NPP nous avons différentes catégories de résultats plus ou moins acceptables.

Dans notre cas, le nombre d'échantillons est de 1, ce qui donne une catégorie de résultats variables.

1 et 2 : Résultats probables.

0 et 3 : Résultats moins probables.

(cf. **Annexe 6**)

D'un point de vue normatif, nous utiliseront uniquement les résultats des catégories 1 et 2.

### 3° Avantages et inconvénients des deux techniques.

	Avantages	Inconvénients
<b>Technique NPP</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pas de système informatique donc pas de risque de panne.</li> <li>- En théorie, le principe est plus simple à comprendre que la méthode par mesurage de l'impédance.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Manipulations longues et laborieuses, coût important en milieu de cultures.</li> <li>- Long délai de réponse ( quatre jours ) s'opposant aux actions rapides qu'il faudrait entreprendre en cas de risque pour la santé publique.</li> </ul>
<b>Technique Impédancemétrique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilité de faire trois fois plus d'analyse qu'avec NPP (s'il y a assez de cellules) dans le même délai de temps.</li> <li>- Délai d'analyse de 9 heures suivant la contamination. Plus la contamination est forte et plus la réponse rapide et le temps de détection court.</li> <li>- La répétabilité de la méthode est supérieure à celle de NPP.</li> <li>- la technique de nécessite qu'un seul milieu.</li> <li>- Il n'y a besoin que de deux répliquas par échantillon.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Système qui n'est pas toujours très fiable à cause des différents problèmes qui peuvent survenir ( bains maries en panne, cellule défailante du à un mauvais fonctionnement du connecteur ou de l'électrode)</li> <li>- Il y a beaucoup d'intermédiaires entre le début et la fin de la mesure donc apparition de risques pour que l'information finale soit modifiée durant l'analyse.</li> </ul>

## V) Résultats et interprétations

### 1° Bilan des résultats pour les deux techniques

Les résultats des deux méthodes sont reportés en **annexe 7**.

On remarque grâce au tableau une gamme de contamination très large : d'une contamination faible (nombre d'*Escherichia coli* < 30 pour 100g de CLI) à une très forte (le maximum atteignant 92000 bactéries).

De plus, on note une homogénéité des catégories de résultats, la plupart étant de catégorie 1 ; le seul résultat de catégorie 3 ne sera pas pris en compte pour cette étude.

On constate, aussi, une disparité entre les concentrations en *Escherichia coli* présumés déterminées par la méthode par impédancemétrie et par la technique NPP.

Je peux également observer que les résultats obtenus avec la méthode impédancemétrique sont inférieurs à ceux trouvés avec la méthode NPP.

Il semblerait donc que l'analyseur microbiologique Malthus dans l'état actuel de ses réglages sous-estimerait le nombre d'*Escherichia coli* présumés par rapport à la méthode de référence (méthode NPP).

Néanmoins, seule une étude statistique appropriée permettrait de vérifier la relation entre les concentrations en *Escherichia coli* obtenues à l'aide de ces deux méthodes à partir de mêmes solutions mères. Cette étude statistique est décrite dans la norme NF V 08-106.

### 2° Etude statistique

Afin d'établir s'il y a ou non corrélation entre les deux techniques, la norme NF V 08-106 (technique indirecte par impédancemétrie directe) prévoit d'effectuer une analyse statistique. (cf. **Annexe 1**)

La relation entre les concentrations d' *Escherichia coli* présumés déterminées par la technique NPP et par la technique impédancemétrique (N) est évaluée au moyen du model linéaire :

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

La corrélation entre les deux techniques se vérifie en utilisant une régression linéaire.

Ainsi, nous devons vérifier que la régression est acceptable, c'est à dire que le test de signification de la régression doit être significatif ( $p < 0,05$ ).

A partir des logarithmes décimaux des résultats de dénombrements des *Escherichia coli* présumés par les deux méthodes (cf. **Annexe 8**) et grâce au logiciel S<sup>+</sup> (logiciel de statistique), la régression linéaire a été représentée graphiquement. (cf. **Annexe 9**)

D'après l'étude statistique du logiciel S<sup>+</sup> (cf. **annexe 10**), la valeur de  $p$  est de :  $1.754 * 10^{-11}$

(Le nombre :  $1.754 * 10^{-11}$  signifie qu'il y a une chance sur un milliard d'avoir indépendance des deux méthodes).

Or d'après l'annexe B de la norme NF V 08-106, la régression est acceptable uniquement si le test de signification de la régression est significatif :  $p < 0,05$ .

Dans le cas présent l'hypothèse est vérifiée, c'est à dire que le  $p$  calculé à l'aide de la régression linéaire est inférieur au  $p$  « théorique ».

Le test de signification de la régression est donc significatif.

Nous obtenons bien une corrélation entre les concentrations d' *Escherichia coli* présumés déterminées par la technique NPP et la technique par impédancemétrie.

Cette relation indique clairement que les méthodes sont corrélées et qu'il n'existe pas de différences significative entre les résultats obtenus par l'une ou l'autre méthode à partir de mêmes solutions mères.

---

# CONCLUSION

Le but de ce stage était d'établir s'il y avait ou non relation entre les concentrations d'*Escherichia coli* présumés déterminés par la technique NPP et par la technique par impédancemétrie.

Il a été démontré durant cette étude et grâce aux tests statistiques décrits dans la norme NF V 08 -106 , une corrélation entre les deux méthodes ; cela, bien que l'étalonnage actuel de l'analyseur Malthus soit réalisé par rapport à l'ancienne méthode NPP.

Il a été démontré que l'étalonnage est également valable par rapport à la nouvelle méthode NPP.

L'Ifremer peut donc, d'après les résultats, utiliser indifféremment la méthode indirecte par impédancemétrie directe et la méthode NPP avec le milieu BTLS.

Néanmoins, la droite d'étalonnage actuelle sera prochainement réactualisée avec de nouvelles données afin de répondre aux exigences de la norme NF V 08-106.

Ces travaux d'étalonnage sont impératifs pour assurer la qualité des analyses, et devraient permettre le renouvellement de l'accréditation du laboratoire.

Ce stage m'a aussi apporté une expérience professionnelle dans le milieu du laboratoire. De plus, travailler dans un laboratoire sous assurance qualité m'a permis de découvrir des méthodes de travail pour lesquelles rigueur et enregistrement de toutes les conditions de manipulation constituent la caractéristique essentielle reconnue par un label, celui du COFRAC.

# LEXIQUE

Ce lexique répertorie tous les mots du rapport ayant une \*

- ❑ Audit :  
Révision et contrôle des techniques d'analyse, du respect des normes et de l'assurance qualité...
- ❑ Byssus :  
Faisceau de filaments soyeux, sécrétés par une glande, permettant aux moules et autres lamellibranches de se fixer.
- ❑ COFRAC :  
Comité Français d'accréditation.
- ❑ Coliformes :  
Le terme de « coliformes » (ou coliformes totaux) regroupent toutes les entérobactéries ayant des caractères communs : bacilles à Gram négatifs, oxydase -, non sporulés, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de se multiplier en présence de sels biliaires ou d'agents de surface ayant les mêmes propriétés, capables en 48 heures de culture à une température de 30 et 37°C de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz.  
Parmi ces coliformes on retrouve les coliformes thermotolérants et les *Escherichia coli* présumés.
- ❑ Coliformes thermotolérants :  
Anciennement appelés coliformes fécaux, ce sont des coliformes ayant les mêmes propriétés mais à une température de culture de 44-45°C.
- ❑ Escherichia coli présumés :  
Ce sont des coliformes thermotolérants qui produisent, en plus, de l'indole à partir du tryptophane.
- ❑ Etat isotonique :  
Etat stable, où la concentration ionique des cellules est la même que dans le milieu.
- ❑ Flore secondaire :  
Dans le cas présent tout les microorganismes autres qu'*Escherichia coli*.
- ❑ Germes pathogènes :  
Germes qui peuvent causer des maladies à l'homme, aux animaux, ou aux végétaux.
- ❑ Groupes indicateurs :  
Groupes de bactéries caractéristiques d'un milieu (dans ce cas de contamination), qui indique la présence d'une pollution si ces germes sont retrouvés. Dans cas, nous sommes en présence de germes indicateurs de contamination fécale.

- Indole :  
Composé de formule  $C_8H_7N$  faiblement basique. Cet élément est présent dans les matières intestinales.
  
- Microorganismes entériques :  
Microorganismes provenant de l'intestin.
  
- NPP :  
Nombre le plus probable

# REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rapport de stage : Corinne Ménard de 1997-1998
    - : Aline Chérencé de 2000
    - : Vincent Billot de 2001
  - Manuel qualité
  - Plan qualité surveillance microbiologique
  - Plan qualité métrologie
  - Procédures techniques microbiologiques
  - Internet Ifremer
  - Ouvrages : Dénombrement des *Escherichia coli* dans les coquillages par conductancemétrie. J.Dupont- D.Ménard- F.Chevalier- B.Beliaf- B.Minier
    - : Microbiologie, milieux de cultures par Biokar Diagnostics
    - : Manuel de bactériologie alimentaire de Laurent Sutra, Michel Federighi et Jean-Louis Jouve.
  - Dossier microbiologique sur les méthodes d'analyses microbiologiques : NPP et impédancemétrie.
  - Dossier microbiologique des coliformes, des entérocoques et des bactéries marins.
  - Norme 06-600 :Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants par la technique du nombre le plus probable.
- Norme 08-106 : Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants par la technique indirecte par impédancemétrie directe

# TABLE DES ANNEXES

<b><u>Annexe 1</u></b> : Contrôle de l'étalonnage de la méthode par impédancemétrie de la norme NF V 08-106	37
<b><u>Annexe 2</u></b> : Feuilles de résultats d'analyse microbiologique <ul style="list-style-type: none"><li>• Par la méthode par impédancemétrie</li><li>• Par la méthode NPP</li></ul>	40
<b><u>Annexe 3</u></b> : Courbes de variation de l'impédance en fonction du temps <ul style="list-style-type: none"><li>• Courbes non interprétables</li><li>• Courbes interprétables</li></ul>	45
<b><u>Annexe 4</u></b> : Tableau de correspondance entre temps de détection et nombre d' <i>Escherichia coli</i> présumés dans 100g de CLI	48
<b><u>Annexe 5</u></b> : Table de correspondance NPP	50
<b><u>Annexe 6</u></b> : Tableau des catégories de résultats NPP	53
<b><u>Annexe 7</u></b> : Tableau récapitulatif des résultats obtenus à l'aide des deux techniques	55
<b><u>Annexe 8</u></b> : Tableau bilan des Moyennes des résultats des analyses exprimés en logarithmes décimaux	57
<b><u>Annexe 9</u></b> : Régression linéaire : $\log \text{NPP} = f(\log \text{N})$	59
<b><u>Annexe 10</u></b> : Etude statistique réalisée à l'aide du logiciel S <sup>+</sup>	61

# Annexe 1 :

Contrôle de l'étalonnage de la méthode par  
impédancemétrie de la norme NF V 08-106

## Annexe B (normative) Contrôle de l'étalonnage

Le contrôle de l'étalonnage a pour but de confirmer son applicabilité dans les conditions d'utilisation de la méthode impédancemétrique propres à chaque utilisateur et de s'assurer de l'absence de dérive dans le temps. Ce contrôle doit être effectué avant la première utilisation de l'étalonnage, puis annuellement.

### B.1 Protocole

Le contrôle de l'étalonnage nécessite le dénombrement en parallèle d'*Escherichia coli* présumés dans 20 échantillons de coquillages naturellement contaminés, par la technique impédancemétrique décrite dans la présente norme et par la technique *NPP* (deux mesures par échantillon donnant des estimations *NPP* de catégorie 1 ou 2 et ne différant pas de plus d'un facteur 10).

On veillera à travailler sur une gamme de concentration bactérienne équilibrée et d'étendue comparable à la gamme choisie pour effectuer l'étalonnage (voir A.1.3), en utilisant des coquillages de différentes origines.

Si l'on ne peut obtenir un nombre suffisant d'échantillons naturellement contaminés pour couvrir la totalité de la gamme de concentration requise, des échantillons peuvent être contaminés artificiellement (voir A.1.3).

### B.2 Analyse statistique

L'analyse statistique s'appuie sur une analyse de régression linéaire entre le nombre le plus probable (*NPP*) d'*Escherichia coli* présumés donné par la technique *NPP* (moyenne géométrique des deux estimations  $NPP_1$  et  $NPP_2$ ) et le nombre d'*Escherichia coli* présumés ( $N$ ) donné par la technique impédancemétrique, transformés en valeurs logarithmiques.

Pour chaque échantillon analysé, on obtient un couple de données ( $\log_{10}N$ ,  $\log_{10}NPP$ ).

Utiliser un programme de régression linéaire, et prendre  $\log_{10}NPP$  comme variable indépendante et  $\log_{10}N$  comme variable dépendante.

Examiner visuellement le graphe afin de détecter d'éventuels résultats anormaux et un défaut d'ajustement. En cas de résultats anormaux, répéter les calculs après avoir écarté ces résultats s'ils peuvent être expliqués, sinon analyser de nouveaux échantillons de mêmes origine et niveau de contamination que les échantillons douteux, puis effectuer une nouvelle analyse de régression.

Vérifier que la régression est acceptable (test de signification de la régression significatif :  $p < 0,05$ ) et contrôler le défaut d'ajustement.

### B.3 Interprétation des résultats

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

$$\log_{10}N = a + b \cdot \log_{10}NPP$$

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

— si l'intersection n'est pas significativement différente de 0, ce qui est équivalent à dire que la valeur 0 est à l'intérieur de l'intervalle de confiance de la valeur estimée (*a*) de l'ordonnée à l'origine,

$$0 \in [a - 1,96s_{(a)}, a + 1,96s_{(a)}] \text{ avec } s_{(a)} \text{ écart-type de } a;$$

— si la pente n'est pas significativement différente de 1, ce qui est équivalent à dire que la valeur 1 est à l'intérieur de l'intervalle de confiance de la valeur estimée (*b*) de la pente,

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

# Annexe 2 :

## Feuilles de résultats d'analyse microbiologique

- Par la méthode par impédancemétrie
- Par la méthode NPP

**Ifremer**

Date de création : 01 mars 1999

Date de la révision : 7 juin 2002

Révision 4

Laboratoire DEL de la Tremblade

réf. : **2-FOT/TD/03**

FICHE N°1

RESULTATS D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

« Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages marins vivants »**Technique indirecte par impédancemétrie directe**

Echantillon N° :

Programme :

YREMI C    YCMIC    YPoints noirs (PN)    YAutres : .....

Prélèvement :

POINT : ..... N° QUADRIGE : .....

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

Taxon : YHuîtres YMoules YPalourdes YCoques YAutres : .....

Suspension – mère :

Dilumat n°28

Visa opérateur :

Balance n°: .....

Broyeur – Mixeur n° : Y16 Y27

étiquette dilumat

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

Révisé par :

Vérifié par:

Approuvé par :

date :

date :

date :

**Ifremer**

Date de création : 01 mars 1999

Date de la révision : 7 juin 2002

Révision 4

Laboratoire DEL de la Tremblade

réf. : 2-FOT/TD/03

FICHE N°1

RESULTATS D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

**Technique indirecte par impédancemétrie directe****Résultats :**

	Nombre de <i>E.coli</i> présumés détectés dans la cellule du bain-marie n°1	Nombre de <i>E.coli</i> présumés détectés dans la cellule du bain-marie n°2	Moyenne géométrique : Nombre de <i>E.coli</i> présumés dans 100 g de CLI.
<i>Escherichia coli</i> présumés			

Lecture des résultats : Date : ..... / ..... / .....

Heure : ..... h .....mn

visa :

**Milieux de culture utilisés :**

Milieux utilisés	N° d'autoclavage
Tryptone Sel	
MCB (milieu Malthus)	

**Ifremer**

Date de création : 11 janvier 2001

Date de la révision : 6 juin 2002

**Révision 4**

Laboratoire DEL de la Tremblade

**réf. : 2-FOT/TD/06**

FICHE N°1  
 RESULTATS D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE  
 « Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les  
 coquillages marins vivants »

**Technique du Nombre le Plus Probable (NPP)**

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 :

Révisé par :	Vérifié par:	Approuvé par :
date :	date :	date :

**Ifremer**

Date de création : 11 janvier 2001

Date de la révision : 6 juin 2002

**Révision 4**

Laboratoire DEL de la Tremblade

**réf. : 2-FOT/TD/06**

FICHE N°1

## RESULTATS D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

Coliformes thermotolérants 48 h +/- 2 heures à 37°C	Incubation	Date	Heure	Visa	Enceintes thermostatées utilisées n° .... n° .... n° ....
	Lecture	Date	Heure	Visa	
<i>Escherichia coli</i> présumés 24 h +/- 1 heure à 44°C	Repiquage	Date	Heure	Visa	Enceintes thermostatées utilisées n° ..... n° .... n° ....
	Incubation	Date	Heure	Visa	
	Lecture	Date	Heure	Visa	

Résultats NPP	Nb tubes positifs	NPP pour 100 g de CLI
Coliformes thermotolérants		
<i>Escherichia coli</i> présumés		

Milieux de culture utilisés :

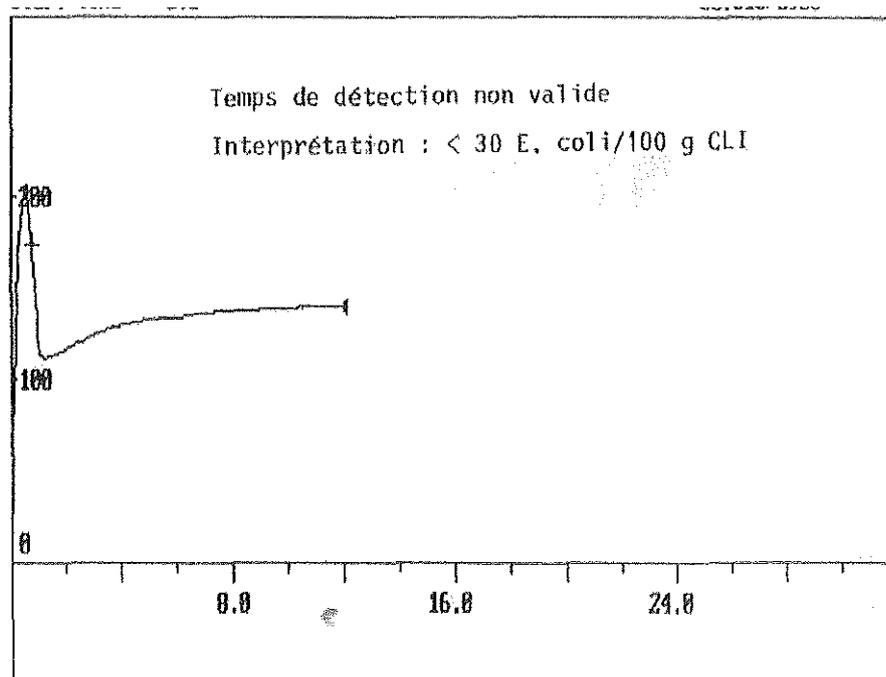
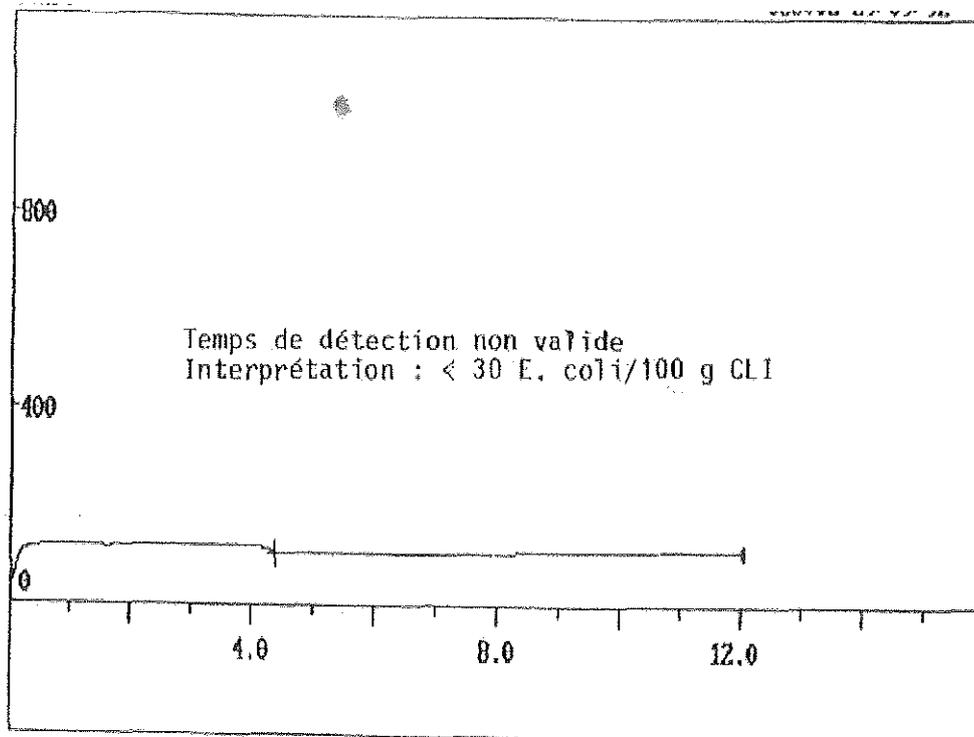
Milieux utilisés	N° d'autoclavage
BLBVB concentré	
BLBVB simple concentration	
Tryptone Sel	
Tryptone Sel 45 ml	
Tryptone Sel 70 ml	
Tryptone Sel 9 ml	
Eau peptonée exempt d'indole	
BTLS simple concentration	
BTLS double concentration	
Bouillon EC	

## Annexe 3 :

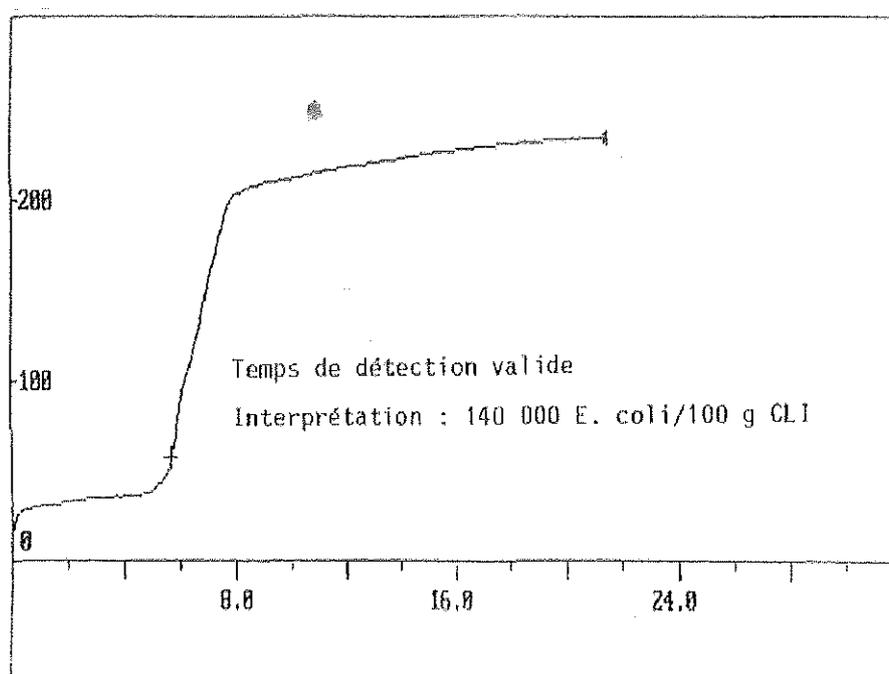
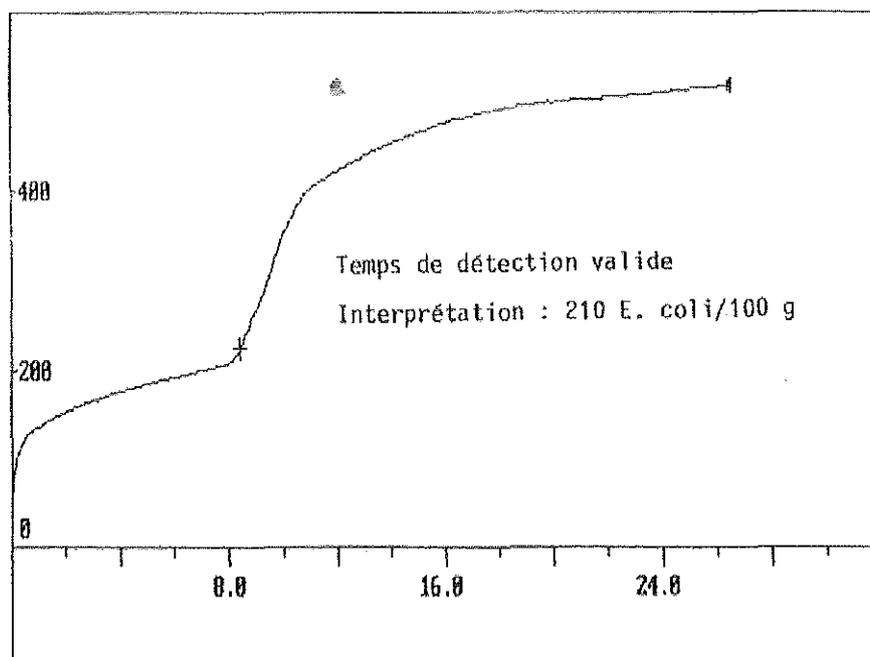
Courbes de variation de l'impédance  
en fonction du temps

- Courbe non interprétable
- Courbe interprétable

## Courbes non interprétables :



## Courbes interprétables :



## Annexe 4 :

Tableau de correspondance entre temps de  
détection et nombre d'*Escherichia coli* présumés  
dans 100g de CLI

**– 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	9,3.10 <sup>8</sup>	4,5	2,4.10 <sup>6</sup>	7,0	6,0.10 <sup>3</sup>
2,1	7,4.10 <sup>8</sup>	4,6	1,9.10 <sup>6</sup>	7,1	4,8.10 <sup>3</sup>
2,2	5,8.10 <sup>8</sup>	4,7	1,5.10 <sup>6</sup>	7,2	3,7.10 <sup>3</sup>
2,3	4,6.10 <sup>8</sup>	4,8	1,2.10 <sup>6</sup>	7,3	3,0.10 <sup>3</sup>
2,4	3,6.10 <sup>8</sup>	4,9	9,1.10 <sup>5</sup>	7,4	2,3.10 <sup>3</sup>
2,5	2,8.10 <sup>8</sup>	5,0	7,2.10 <sup>5</sup>	7,5	1,8.10 <sup>3</sup>
2,6	2,2.10 <sup>8</sup>	5,1	5,7.10 <sup>5</sup>	7,6	1,4.10 <sup>3</sup>
2,7	1,7.10 <sup>8</sup>	5,2	4,5.10 <sup>5</sup>	7,7	1,1.10 <sup>3</sup>
2,8	1,4.10 <sup>8</sup>	5,3	3,5.10 <sup>5</sup>	7,8	8,9.10 <sup>2</sup>
2,9	1,1.10 <sup>8</sup>	5,4	2,8.10 <sup>5</sup>	7,9	7,1.10 <sup>2</sup>
3,0	8,5.10 <sup>7</sup>	5,5	2,2.10 <sup>5</sup>	8,0	5,5.10 <sup>2</sup>
3,1	6,7.10 <sup>7</sup>	5,6	1,7.10 <sup>5</sup>	8,1	4,4.10 <sup>2</sup>
3,2	5,3.10 <sup>7</sup>	5,7	1,4.10 <sup>5</sup>	8,2	3,5.10 <sup>2</sup>
3,3	4,2.10 <sup>7</sup>	5,8	1,1.10 <sup>5</sup>	8,3	2,7.10 <sup>2</sup>
3,4	3,3.10 <sup>7</sup>	5,9	8,4.10 <sup>4</sup>	8,4	2,1.10 <sup>2</sup>
3,5	2,6.10 <sup>7</sup>	6,0	6,6.10 <sup>4</sup>	8,5	1,7.10 <sup>2</sup>
3,6	2,0.10 <sup>7</sup>	6,1	5,2.10 <sup>4</sup>	8,6	1,3.10 <sup>2</sup>
3,7	1,6.10 <sup>7</sup>	6,2	4,1.10 <sup>4</sup>	8,7	1,0.10 <sup>2</sup>
3,8	1,3.10 <sup>7</sup>	6,3	3,2.10 <sup>4</sup>	8,8	8,1.10 <sup>1</sup>
3,9	1,0.10 <sup>7</sup>	6,4	2,5.10 <sup>4</sup>	8,9	6,5.10 <sup>1</sup>
4,0	7,8.10 <sup>6</sup>	6,5	2,0.10 <sup>4</sup>	9,0	5,0.10 <sup>1</sup>
4,1	6,2.10 <sup>6</sup>	6,6	1,6.10 <sup>4</sup>	9,1	4,0.10 <sup>1</sup>
4,2	4,9.10 <sup>6</sup>	6,7	1,2.10 <sup>4</sup>	9,2	3,2.10 <sup>1</sup>
4,3	3,8.10 <sup>6</sup>	6,8	9,8.10 <sup>3</sup>	> 9,2	< 3,0.10 <sup>1</sup>
4,4	3,0.10 <sup>6</sup>	6,9	7,6.10 <sup>3</sup>		

# Annexe 5 :

## Table de correspondance NPP

**Annexe A**  
(normative)  
**Table NPP <sup>2)</sup>**

Tableau A.1 — Table NPP pour 5 × 1 g, 5 × 0,1 g et 5 × 0,01 g

Nombre de tubes positifs			Coefficient NPP	Catégorie <sup>a)</sup> lorsque le nombre d'échantillons testés (par lot) est de					Limites de confiance			
				1	2	3	5	10	≥ 95 %	≥ 95 %	≥ 99 %	≥ 99 %
0	0	0	< 0,18						0,00	0,65	0,00	0,93
0	0	1	0,18	2	2	2	1	1	0,00	0,65	0,00	0,93
0	1	0	0,18	2	2	2	1	1	0,01	0,65	0,00	0,93
0	1	1	0,36	3	3	3	2	2	0,07	0,99	0,02	1,40
0	2	0	0,37	3	2	2	2	1	0,07	0,99	0,02	1,40
0	2	1	0,55	0	0	0	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
0	3	0	0,56	0	3	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1	0	0	0,20	1	1	1	1	1	0,02	0,99	0,01	1,40
1	0	1	0,40	2	1	1	1	1	0,07	1,00	0,02	1,40
1	0	2	0,60	0	0	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1	1	0	0,40	1	1	1	1	1	0,07	1,10	0,03	1,40
1	1	1	0,61	3	2	2	2	1	0,17	1,40	0,09	2,10
1	1	2	0,81	0	0	0	0	3	0,33	2,20	0,20	2,80
1	2	0	0,61	2	1	1	1	1	0,18	1,40	0,09	2,10
1	2	1	0,82	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1	3	0	0,83	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1	3	1	1,0	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
1	4	0	1,1	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
2	0	0	0,45	1	1	1	1	1	0,08	1,4	0,04	2,10
2	0	1	0,68	2	1	1	1	1	0,18	1,50	0,09	2,10
2	0	2	0,91	0	3	3	3	3	0,33	2,20	0,20	2,80
2	1	0	0,68	1	1	1	1	1	0,19	1,70	0,10	2,30
2	1	1	0,92	2	2	1	1	1	0,33	2,20	0,20	2,80
2	1	2	1,2	0	0	3	3	3	0,4	2,5	0,2	3,4
2	2	0	0,93	1	1	1	1	1	0,34	2,20	0,20	2,80
2	2	1	1,2	3	3	2	2	2	0,4	2,5	0,2	3,4
2	2	2	1,4	0	0	0	0	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2	3	0	1,2	3	2	2	2	1	0,4	2,5	0,2	3,4
2	3	1	1,4	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2	4	0	1,5	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
3	0	0	0,78	1	1	1	1	1	0,21	2,20	0,12	2,80
3	0	1	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,2	0,2	2,9
3	0	2	1,3	3	3	3	2	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3	1	0	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,5	0,2	3,4
3	1	1	1,4	2	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3	1	2	1,7	3	3	3	3	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3	2	0	1,4	1	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3	2	1	1,7	2	2	2	1	1	0,7	3,9	0,5	5,1
3	2	2	2,0	0	3	3	3	3	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	0	1,7	2	2	1	1	1	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	1	2,1	3	3	3	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
3	3	2	2,4	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4

(à suivre)

<sup>2)</sup> Voir de Man, J.C. MPN tables, corrected. Eur. J. Appl. Biotechnol., 17, 1983, pp. 301-305.

Tableau A.1 — Table NPP pour 5 × 1 g, 5 × 0,1 g et 5 × 0,01 g (fin)

Nombre de tubes positifs			Coefficient NPP	Catégorie <sup>a)</sup> lorsque le nombre d'échantillons testés (par lot) est de					Limites de confiance			
				1	2	3	5	10	≥ 95 %	≥ 95 %	≥ 99 %	≥ 99 %
3	4	0	2,1	3	3	2	2	2	0,7	4,0	0,5	5,2
3	4	1	2,4	0	3	3	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3	5	0	2,5	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	0	0	1,3	1	1	1	1	1	0,4	3,4	0,3	4,4
4	0	1	1,7	1	1	1	1	1	0,5	3,4	0,4	4,4
4	0	2	2,1	3	2	2	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
4	0	3	2,5	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	1	0	1,7	1	1	1	1	1	0,6	3,9	0,4	5,1
4	1	1	2,1	1	1	1	1	1	0,7	4,1	0,5	5,3
4	1	2	2,6	3	3	2	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4	1	3	3,1	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	0	2,2	1	1	1	1	1	0,7	4,8	0,5	6,1
4	2	1	2,6	2	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	2	3,2	3	3	3	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4	2	3	3,8	0	0	0	0	3	1,3	10,0	0,9	14,7
4	3	0	2,7	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	3	1	3,3	2	2	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4	3	2	3,9	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	0	3,4	2	2	1	1	1	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	1	4,0	3	3	2	2	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	4	2	4,7	0	0	0	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
4	5	0	4,1	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4	5	1	4,8	0	0	3	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
5	0	0	2,3	1	1	1	1	1	0,7	6,6	0,5	9,4
5	0	1	3,1	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
5	0	2	4,3	3	2	2	2	1	0,3	10,0	0,9	14,7
5	0	3	5,8	0	0	0	3	3	2,1	14,9	1,4	20,0
5	1	0	3,3	1	1	1	1	1	1,0	10,0	0,7	14,7
5	1	1	4,6	1	1	1	1	1	1,4	11,3	0,9	14,7
5	1	2	6,3	2	2	1	1	1	2,1	14,9	1,4	20,0
5	1	3	8,4	3	3	3	3	2	3,4	11,0	2,1	27,0
5	2	0	4,9	1	1	1	1	1	1,5	14,9	0,9	20,0
5	2	1	7,0	1	1	1	1	1	2,2	16,8	1,4	23,0
5	2	2	9,4	2	2	1	1	1	3,4	22,0	2,1	28,0
5	2	3	12	3	3	2	2	2	3	24	2	32
5	2	4	15	0	0	0	0	3	6	35	4	45
5	3	0	7,9	1	1	1	1	1	2,3	22,0	1,5	27,0
5	3	1	11	1	1	1	1	1	3	24	2	32
5	3	2	14	1	1	1	1	1	5	35	3	45
5	3	3	17	3	2	2	2	1	7	39	4	51
5	3	4	21	3	3	3	3	2	7	39	4	51
5	4	0	13	1	1	1	1	1	3	35	3	45
5	4	1	17	1	1	1	1	1	6	39	4	51
5	4	2	22	1	1	1	1	1	7	44	4	57
5	4	3	28	2	1	1	1	1	10	70	6	92
5	4	4	35	2	2	2	1	1	10	70	6	92
5	4	5	43	0	0	3	3	3	15	106	9	150
5	5	0	24	1	1	1	1	1	7	70	4	92
5	5	1	35	1	1	1	1	1	10	106	6	150
5	5	2	54	1	1	1	1	1	15	166	10	223
5	5	3	92	1	1	1	1	1	23	253	15	338
5	5	4	160	1	1	1	1	1	40	460	20	620
5	5	5	> 160									

a) Pour les explications des catégories, voir tableau A.2.

NOTE Les limites de confiance données dans le tableau A.1 ne sont destinées qu'à fournir quelques notions de l'influence des variations statistiques sur les résultats. Il existera toujours d'autres sources de variations qui pourront, quelquefois, être plus importantes.

# Annexe 6 :

## Tableau des catégories de résultats NPP

Tableau A.2 — Explication des catégories pour les résultats

Catégorie	Définition
1	Lorsque le nombre de microorganismes dans le produit est égal au NPP trouvé, le résultat est un de ceux qui ont le plus de chance d'être obtenus. Il existe tout au plus 5 % de chance d'obtenir un résultat qui est moins probable que le moins probable dans cette catégorie.
2	Lorsque le nombre de microorganismes dans le produit est égal au NPP trouvé, le résultat est un de ceux qui ont moins de chance d'être obtenus que même le moins probable dans la catégorie 1, mais il existe tout au plus 1 % de chance d'obtenir un résultat qui est moins probable que le moins probable dans cette catégorie.
3	Lorsque le nombre de microorganismes dans le produit est égal au NPP trouvé, le résultat est un de ceux qui ont moins de chance d'être obtenus que même le moins probable dans la catégorie 2, mais il existe tout au plus 0,1 % de chance d'obtenir un résultat qui est moins probable que le moins probable dans cette catégorie.
0	Lorsque le nombre de microorganismes dans le produit est égal au NPP trouvé, le résultat est un de ceux qui ont moins de chance d'être obtenus que même le moins probable dans la catégorie 3. Il n'existe que 0,1 % de chance d'obtenir un résultat dans cette catégorie sans que rien ne soit faux.

Avant de commencer les essais, il faut décider quelle catégorie sera acceptable, c'est-à-dire seulement la 1, 1 et 2, ou même 1, 2 et 3 (voir tableau A.1). Si la décision prise sur la base des résultats est très importante, il convient de n'accepter que les résultats de la catégorie 1 ou, tout au plus, ceux des catégories 1 et 2. Les résultats de la catégorie 0 devront être considérés avec la plus grande prudence.

# Annexe 7 :

Tableau récapitulatif des résultats obtenus à l'aide des deux techniques

n° échantillon	espèce	méthode Malthus			méthode NPP				
		TD 1	TD 2	N *	Nombre d'Escherichia coli par 100g de CL				NPP **
					A**	catégorie *	B**	catégorie *	
180	huître	7.8	8.3	490	1700	1	1100	1	1367
181	huître	7.8	8	699					
182	huître	7.5	8	700	400	3	490	1	440
183	huître	7.8	7.6	701	1700	1	330	2	749
192	huître	0	0	<30	45	1	<18	1	29
193	huître	10.6	0	<30	<18	2	130	1	130
194	huître	10.3	0	<30	<18	2	<18	2	18
195	huître	10.4	8.9	32	<18	2	45	1	29
209	huître	0	0	<30	20	1	20	1	20
210	huître	10.5	10.2	<30	45	1	45	1	45
211	huître	9.2	9.6	<30	110	1	78	1	93
212	huître	9.4	10.6	31	45	1	78	1	59
234	Moule	7.1	7.1	4800	9200	1	3500	1	5680
235	Moule	7.7	7.4	1590	1300	1	790	1	1010
236	Moule	7.5	7.4	2030	1300	1	9200	1	3460
237	Moule	7.5	7.3	2320	1700	1	1700	1	1700
250	Moule	6.9	7.1	6040	24000	1	54000	1	36000
251	Moule	6.8	7	7670	17000	1	54000	1	30300
252	Moule	6.7	6.8	10840	24000	1	35000	1	29000
253	Moule	6.8	6.6	12520	35000	1	54000	1	43500
254	Moule	7	7.1	5370	54000	1	13000	1	26500
255	Moule	7	7	6000	35000	1	35000	1	35000
256	Moule	7.1	7	5370	92000	1	92000	1	92000
257	Moule	7	7.3	4240	24000	1	17000	1	20200
262	Moule	0	9.2	31	<18	1	45	1	30
263	Moule	0	0	<30	130	1	93	1	110
264	Moule	8.4	8.4	210	230	1	110	1	159
265	Moule	0	8.6	62	20	1	45	1	30
266	Moule	0	0	<30	20	1	45	1	30
267	Moule	0	0	<30	20	1	20	1	20
268	Moule	0	0	<30	45	1	<18	1	29
269	Moule	0	0	<30	<18	1	<18	1	18
270	Moule	0	0	<30	20	1	<18	1	20

N\*: moyenne géométrique des deux essais

NPP \*\*: moyenne géométrique des deux essais NPP

# Annexe 8 :

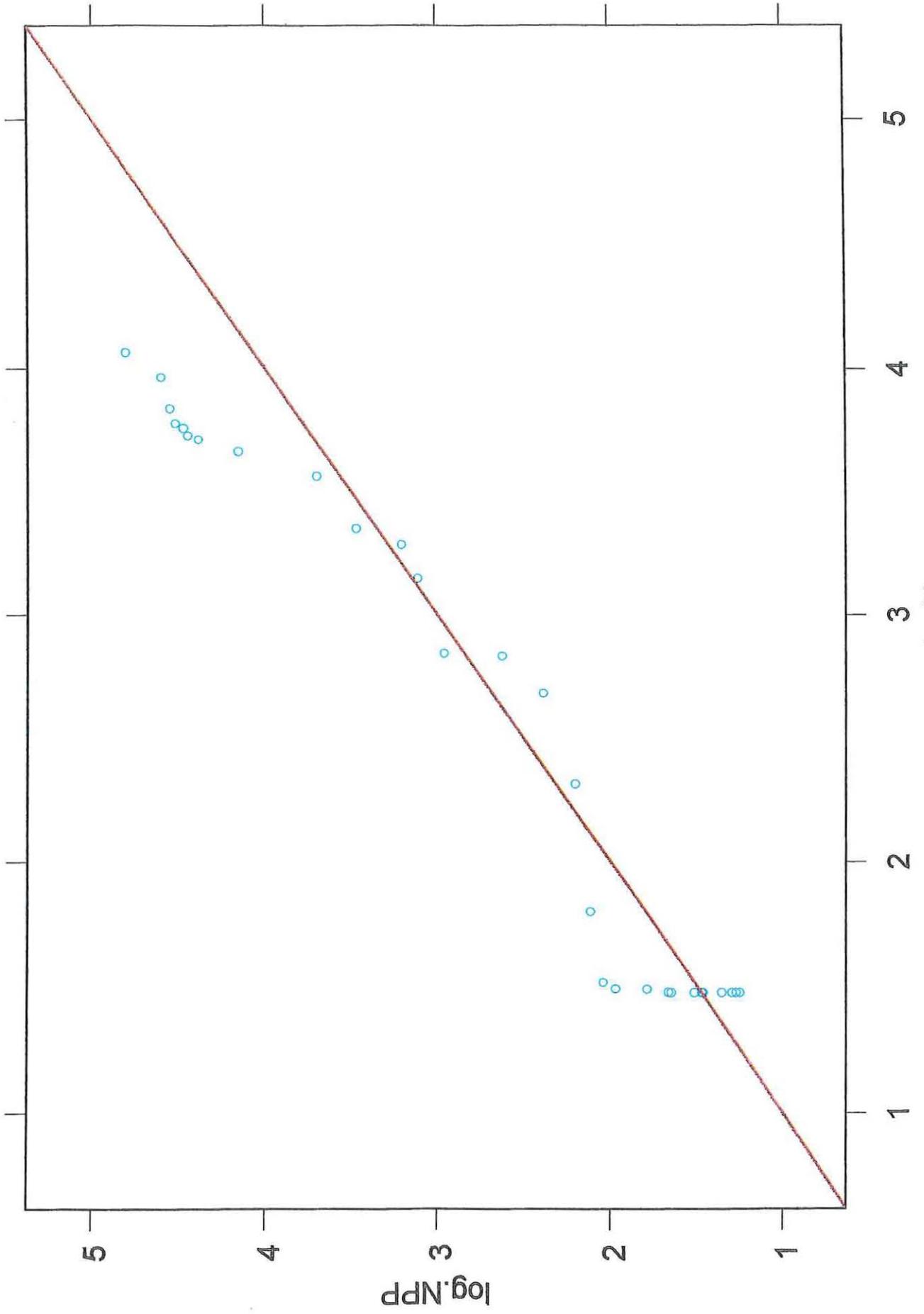
Tableau bilan des Moyennes des résultats des analyses exprimés en logarithmes décimaux

échantillon	N *	log N
180	490	2.7
181	699	2.8
182	700	2.8
183	701	2.8
192	30	1.5
193	30	1.5
194	30	1.5
195	32	1.5
209	30	1.5
210	30	1.5
211	30	1.5
212	31	1.5
234	4800	3.7
235	1590	3.2
236	2030	3.3
237	2320	3.4
250	6040	3.8
251	7670	3.9
252	10840	4.0
253	12520	4.1
254	5370	3.7
255	6000	3.8
256	5370	3.7
257	4240	3.6
262	31	1.5
263	30	1.5
264	210	2.3
265	62	1.8
266	30	1.5
267	30	1.5
268	30	1.5
269	30	1.5
270	30	1.5

NPP	log NPP
1367	3
440	2.6
249	2.4
45	1.7
130	2.1
18	1.3
45	1.7
20	1.3
45	1.7
93	2.0
59	1.8
5680	3.8
1010	3.0
3460	3.5
1700	3.2
36000	4.6
30300	4.5
29000	4.5
43500	4.6
26500	4.4
35000	4.5
92000	5.0
20200	4.3
30	1.5
110	2.0
159	2.2
30	1.5
30	1.5
20	1.3
29	1.5
18	1.3
20	1.3

# Annexe 9:

Régression linéaire :  $\log \text{NPP} = f(\log N)$



# Annexe 10 :

Etude statistique réalisée à l'aide du logiciel S+

\*\*\* Linear Model \*\*\*

Call: lm(formula = logN ~ log.NPP, data = Classeur3, na.action = na.omit)

Residuals:

Min	1Q	Median	3Q	Max
-0.6824	-0.2554	-0.1066	0.1922	2.103

Coefficients:

	Value	Std. Error	t value	Pr(> t )
(Intercept)	0.7419	0.1905	3.8946	0.0005
log.NPP	0.6707	0.0654	10.2541	0.0000

Residual standard error: 0.5011 on 31 degrees of freedom

Multiple R-Squared: 0.7723

F-statistic: 105.1 on 1 and 31 degrees of freedom, the p-value is **1.754e-011**

# RECHERCHE DE GERMES DANS LES EAUX DES BALLASTS

Lors de ce stage, j'ai eu l'occasion de participer quelque peu à un sujet de recherche développé par l'Ifremer de la Tremblade.

Ce sujet étant de rechercher les germes potentiellement présents à l'intérieur des ballasts\*.

Le principe est simple : imaginons des bateaux remplissant leurs ballasts d'eau dans un pays étranger, comme par exemple un pays tropical. Ils viendraient par la suite s'amarrer dans un port Français et relargueraient l'eau des ballasts.

L'eau de mer d'un pays équatorial ne contient pas les mêmes germes qu'un pays occidental, et peut être des germes qui serait dangereux pour notre écosystème. Donc la question est : Ces germes peuvent-ils survivre dans les ballasts pendant plusieurs mois ? et peuvent-ils se développer dans nos eaux ?

Le sujet de recherche a été lancé par Monsieur Daniel MASSON, seul chercheur à étudier ce problème en France.

L'étude a démarré par une analyse des eaux dans les ports où des bateaux susceptibles de contenir des bactéries pathogènes étaient venu s'arrimer.

Puis, il a été décidé de construire un model réduit de ballast renfermant deux compartiments : un qui sera par la suite contaminé et un témoin qui sera utile à l'analyse de la salinité.

L'objectif étant d'y introduire une espèce bactérienne en concentration connue, c'est la bactérie *Vibrio parahemoliticus* qui sera choisie.

Par la suite, on analyse l'eau tout les jours en étalant 0,1ml sur une boîte de pétri de milieu TCBS, milieu sélectif des *Vibrio*.

Au bout de plusieurs semaines, il n'y avait plus de bactéries dans l'eau et la question se posait si les bactéries ne s'étaient réfugiées dans les sédiments. L'analyse des sédiments a donc été effectuée.



**Prélèvement de sédiment dans le ballast**

Par l'analyse, il en a été déduit que les bactéries avaient été retrouvées dans les sédiments dans la même concentration qu'elles y avaient été introduites.

Par la suite la bactérie retrouvée fut envoyée à Nantes afin d'y être étudiée.

**Ballast\*** : Compartiment d'un navire que l'on remplit plus ou moins d'eau de mer afin de l'équilibrer.