

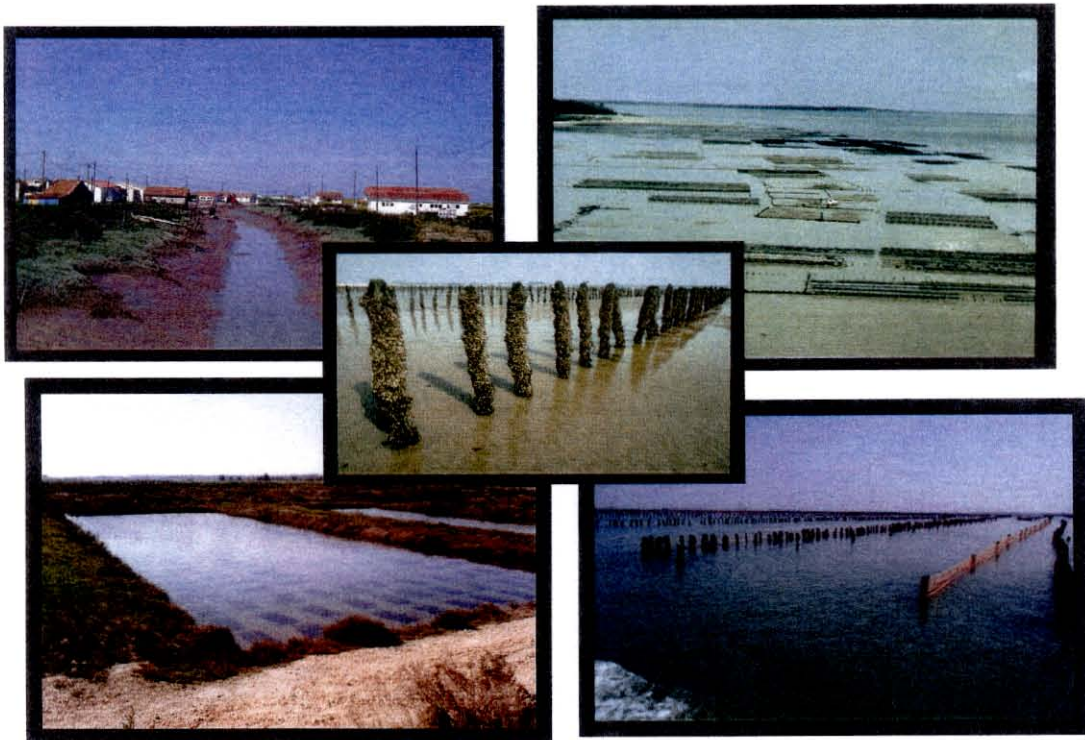


Institut Universitaire de Technologie de
La Rochelle
Département Génie biologique
15 rue François de Vaux de Foletier
17026 La Rochelle cedex 1

Ifremer

Ifremer
Laboratoire LER/PC de
Ronces les Bains
17390 Mus de Loup

ETALONNAGE DE LA METHODE DE DENOMBREMENT DES *ESCHERICHIA COLI* PAR IMPEDANCEMETRIE



Par Ninon AMIAUD
2005

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02679

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

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


**ETALONNAGE DE LA METHODE DE DENOMBREMENT
DES ESCHERICHIA COLI PAR
IMPEDANCEMETRIE**

Pour la modélisation des processus de
contamination chez *Mytilus edulis**, *Crassostrea gigas**
dans le milieu marin.

**Stage de fin d'étude validant un Diplôme Universitaire
et Technologique en Génie Biologique option industrie
agroalimentaire et biologique par Ninon AMIAUD**

Avril - Juin 2005 à La Tremblade.

Maîtres de stage : Messieurs Jean-Yves STANISIERE et Jean-Côme PIQUET
Tuteur pédagogique : Monsieur Gérard ABRAHAM



RESUME

Le laboratoire de microbiologie de l'Ifremer LER/PC de La Tremblade en Charente Maritime, est chargé de la surveillance de la production conchylicole* et du contrôle sanitaire des eaux, du littoral du bassin de Marennes-Oléron. L'objectif principal est la protection de la santé publique.

Cette surveillance se fait par la recherche de la flore indicatrice de contamination fécale* dans l'eau de mer et la matière vivante : *Escherichia Coli* (*E. coli*).

L'Ifremer veut mettre en place un outil de modélisation des flux de contamination aux embouchures des fleuves. Ce projet modélisera la cinétique de contamination et de décontamination dans l'eau de mer et dans les coquillages (huître et moule). Les concentrations bactériennes, dans chaque matrice * : l'eau de mer, les huîtres et les moules, seront déterminées par l'intermédiaire des temps de détection* selon, la méthode indirecte par impédancemétrie* directe, grâce à un analyseur microbiologique : Le Malthus*.

Il est par conséquent nécessaire de réaliser l'étalonnage de cet analyseur, qui détermine des temps de détection. Les concentrations bactériennes sont parallèlement déterminées par la méthode NPP sur microplaque.

Le travail a consisté à conduire, au sein d'une équipe de microbiologistes, des essais en vue d'étalonner le Malthus. Pour cela, plusieurs actions principales ont été réalisées : la préparation des milieux de culture et des diluants, la préparation du matériel, la réalisation des matrices, l'ensemencement des cellules Malthus, leurs incubations, la lecture des résultats, la décontamination et le lavage de la verrerie.

L'étude a montré qu'il y a une relation linéaire entre les temps de détection déterminés par le Malthus et les logarithmes des concentrations bactériennes.

De plus, il a été déterminé qu'il n'y a pas de différence significative entre les courbes de régression des différentes matricesensemencées. A priori, un seul étalonnage peut être utilisé lors de l'expérimentation pour la modélisation.

NB : Les mots suivis du signe * sont expliqués dans le lexique à la page 39.

REMERCIEMENTS

Je tiens, avant tout à remercier Monsieur Philippe GOULLETQUER, Directeur de la station Ifremer de La Tremblade de m'avoir ouvert les portes de son institut, ainsi que Monsieur Jean PROU, chef du laboratoire LER/PC de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je voudrais remercier particulièrement mes maîtres de stage, Monsieur Jean-Yves STANISIERE, cadre de recherche, pour ses conseils et son aide durant la période de mon stage, et Monsieur Jean-Côme PIQUET, responsable technique microbiologie pour sa disponibilité, son aide qui a beaucoup contribué au bon déroulement des analyses.

Je remercie Mademoiselle Cyrielle MONTAUBIN, technicienne microbiologiste, pour son aide et sa gentillesse.

Je remercie aussi l'ensemble du personnel d'Ifremer de La Tremblade pour son accueil et sa bonne humeur.

Enfin, je remercie mon tuteur, Monsieur Gérard ABRAHAM, chef du département Génie Biologique de l'IUT de La Rochelle.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	7
I. PRESENTATION DE L'IFREMER.	8
A. Présentation générale.	8
❖ Ses implantations :	8
❖ Son organisation :	8
❖ Ses missions :	8
B. Historique.	9
C. Présentation de la station Ifremer de La Tremblade.	9
❖ Ses actions :	10
❖ Son organisation :	10
❖ Son personnel :	10
D. Présentation du laboratoire environnement ressource du Pertuis charentais.	10
❖ Les réseaux de surveillance :	10
❖ L'Assurance qualité :	11
II. CONTEXTE.	12
III. OBJECTIFS DE L'ETUDE.	13
IV. PRESENTATION D'ESCHERICHIA COLI.	14
❖ Son taxon :	14
❖ Son habitat :	14
❖ Son pouvoir pathogène :	14
❖ Ses caractères biochimiques :	14
❖ Ses caractères métaboliques :	14
❖ L'indicateur de contamination fécale :	14
V. PRINCIPES GENERAUX.	15
A. Présentation de la méthode de dénombrement indirect par impédancemétrie.	15
❖ Principe de la méthode :	15
❖ Description de l'analyseur microbiologique Malthus :	16
❖ Avantages et inconvénients de la méthode :	18
B. Présentation de la méthode du nombre le plus probable sur microplaques.	18
❖ Principe de la méthode :	18
❖ Avantages et inconvénients de la méthode :	19
VI. PROTOCOLE DE L'ETUDE.	19
A. Plan expérimental.	19
B. Préparation des milieux de culture.	22
❖ Préparations des diluants :	23
❖ Préparation du milieu MCB modifié :	23

C. Préparation de la souche d'<i>Escherichia Coli</i>.	23
D. Préparation des matrices.	24
❖ Préparation des matrices coquillages :	24
❖ Analyse de la colimétrie de la matrice avant ensemencement:	28
❖ Préparation de la matrice Eau de mer:	29
E. Réalisation de l'essai.	29
❖ Ensemencement des microplaques :	29
❖ Ensemencement de la matrice coquillage :	30
❖ Ensemencement de la matrice Eau de mer :	30
VII. RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATIONS.	30
A. La matrice huître.	30
❖ Détermination des temps de détection d' <i>Escherichia Coli</i> :	30
❖ Détermination de la concentration en <i>E. Coli</i> :	30
❖ Résultats expérimentaux :	31
❖ Détermination de la relation entre le temps de détection et la concentration en <i>E. Coli</i> :	31
❖ Analyse statistique :	32
B. L'eau de mer.	33
❖ Résultats expérimentaux :	33
❖ Détermination de la relation entre le temps de détection et la concentration en <i>E. Coli</i> :	34
❖ Analyse statistique :	34
C. La matrice moule.	34
❖ Résultats expérimentaux :	34
❖ Détermination de la relation entre le temps de détection et la concentration en <i>E. Coli</i> :	35
❖ Analyse statistique :	35
VIII. DISCUSSION.	35
❖ Analyse statistique :	37
❖ Bilan des essais réalisés :	37
 CONCLUSION	 38
 LEXIQUE	 39
 BIBLIOGRAPHIE	 41
 TABLES DES ANNEXES	 42

INTRODUCTION

Le littoral de la Charente Maritime tire ses ressources de deux activités principales, le tourisme et la conchyliculture*. La qualité des eaux du littoral nécessite par conséquent, une attention particulière, tant pour la baignade, la pêche à pied que pour la qualité des coquillages. Les mollusques bivalves* marins (moules, coques, palourdes, huîtres), ont été reconnus comme des vecteurs de maladies chez l'homme. Ce risque pour la santé public est lié à la capacité de survie des microorganismes entériques dans l'environnement marin ainsi qu'à certains aspects spécifiques de la physiologie et de la consommation des coquillages.

Les principales causes de contamination du milieu marin sont l'homme (les rejets domestiques) et les activités humaines (industrie et agriculture). Les zones conchylicoles sont particulièrement sensibles à ces pollutions car les coquillages, par leurs pouvoirs de filtration, de rétention et d'accumulation, concentrent la pollution microbiologique. Ils sont donc souvent considérés comme des témoins de la qualité des eaux. Leur situation géographique est aussi un facteur de contamination, en effet, les zones d'élevage de coquillages se situent à proximité des côtes et donc de leurs rejets (égouts). Souvent consommés crus, les coquillages peuvent être à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives* (TIAC) liées à la présence de bactéries pathogènes* ou de virus.

L'évaluation et la gestion de ce risque sanitaire reposent sur la mesure des niveaux de concentration en germes témoins de contamination fécale (*Escherichia coli*) dans l'eau et la matière vivante. Dans le milieu marin, les critères microbiologiques à prendre en compte et les valeurs seuils de contamination sont fixés par deux normes : l'arrêté du 21 mai 1999 relatif au classement de la salubrité et à la surveillance des zones de production et de reparcage des coquillages vivants et le Décret n° 81-324 du 07 avril 1981 établissant la qualité des eaux de baignades. L'impact sanitaire des rejets sur le littoral demeure encore aujourd'hui très mal appréhendé. En effet, le devenir des germes dépend de nombreux paramètres environnementaux agissant à la fois sur leur transport, leur survie et leur accumulation.

Afin d'assurer la qualité sanitaire de la production conchylicole et le contrôle sanitaire des eaux, des dispositifs de surveillance ont été mis en œuvre sur le littoral. Le laboratoire Ifremer (Institut Français de Recherche et de l'Exploitation de la MER) de La Tremblade en Charente Maritime, est chargé de cette surveillance dans le bassin de Marennes-Oléron.

Ces dispositifs opèrent selon des stratégies qui permettent d'évaluer l'évolution de la qualité sur le moyen terme, en revanche ils ne permettent pas la détection et le suivi des pollutions accidentelles. La réponse à ce type de question nécessiterait la mise en place de dispositifs de surveillance beaucoup trop denses du point de vue spatial et temporel. La réalisation de tels réseaux de suivi reste peu envisageable en raison des contraintes logistiques et budgétaires.

Parallèlement, l'usage d'outils mathématiques couplant modèles hydrodynamiques et biologiques permet aujourd'hui d'estimer à des coûts acceptables le devenir des contaminants sur le littoral.

Pour cela, des expérimentations seront effectuées en faisant varier différents facteurs influençant la contamination microbienne. Les concentrations bactériennes seront déterminées à l'aide de la technique indirecte par impédancemétrie directe, avec un analyseur microbiologique : Le Malthus. L'objectif de ce stage est d'étalonner le Malthus.

Après la présentation de l'Ifremer, le contexte et les objectifs de l'étude seront énoncés. Ensuite, le principe des méthodes utilisées et le protocole de la manipulation effectués vont être précisés. Enfin, les résultats seront interprétés et discutés.

I. PRESENTATION DE L'IFREMER.

A. **Présentation générale.**

L'Ifremer est un établissement public à caractère industriel et commercial. Il résulte de la fusion du CNEXO (Centre National d'Exploitation pour les Océans) et de l'ISTPM (Institut Scientifique et Technique de Pêches Maritimes). La réunion de ces deux organismes à vocation maritime, provenait d'une volonté et d'une logique, celles de confier à un seul établissement public, la mission de développer un ensemble de recherches de grandes ampleurs afin de mieux exploiter les ressources de la mer. L'Ifremer est sous la tutelle des ministères chargés de la recherche, des pêches et des cultures marines, de l'équipement, du logement, des transports et de l'environnement.

❖ Ses implantations :

Cet organisme est composé de 78 laboratoires ou services de recherche répartis dans 24 stations ou centres sur le littoral métropolitain (Figure 1) et dans les DOM-TOM (Figure 2).



Figure 1 : Implantations Ifremer en France.

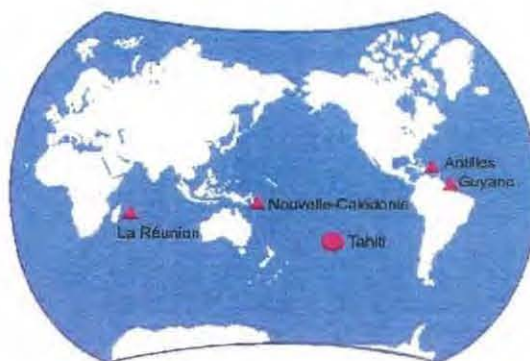


Figure 2 : Implantations Ifremer dans le monde.

Ces stations sont elles-mêmes rattachées à l'un des cinq centres qui sont à Boulogne, Brest, Nantes, Toulon et Tahiti. Le siège social est situé à proximité de Paris à Issy Les Moulineaux, Hauts de Seine.

❖ Son organisation :

L'Ifremer est organisé autour de trois structures, la Direction des programmes et de la stratégie qui anime et coordonne les activités scientifiques et technologiques, les Directions fonctionnelles et la Direction des opérations.

❖ Ses missions :

L'Ifremer a plusieurs missions, qui sont :

- Connaître, évaluer et mettre en valeur les ressources des océans et permettre leurs exploitations durables.

- Améliorer les méthodes de surveillance, de prévision, d'évolution, de protection et de mise en valeur du milieu marin et côtier.
- Favoriser le développement économique du monde maritime.

Pour atteindre ces objectifs, l'Ifremer concentre son action dans les domaines suivants : la recherche océanique, l'expertise d'intérêt public (surveillance de l'environnement littoral et contrôle de la qualité des produits de la mer), la mise à disposition de moyens (flotte océanographique et développement technologique), le transfert vers les entreprises et la valorisation de ses activités.

Son budget annuel est de près de 150 millions d'Euros et il emploie 1700 salariés.

B. Historique.

L'Ifremer a été créée par le décret du 5 juin 1984 et modifiée ensuite selon les décrets du 18 février 1998 puis du 14 mars 2002.

La station actuellement installée à La Tremblade résulte de la création de différents organismes.

- 1913: Création de l'AEIO (Association d'Encouragement des Industries Ostréicoles françaises) à La Tremblade.
- 1918: Création de l'OSTPM (Office Scientifique et Technique des Pêches Maritimes).
- 1928: Le laboratoire l'AEIO devient l'OSPTM.
- 1953: Transformation de l'OSPTM en ISPTM (Institut Scientifique et Technique des pêches Maritimes).
- 1954: L'inspection sanitaire et le laboratoire de biologie sont individualisés pour la station de La Tremblade.
- 1984: Création de l'Ifremer
- 2001: L'unité de microbiologie à La Tremblade a été accréditée par le COFRAC.

C. Présentation de la station Ifremer de La Tremblade.

La station de La Tremblade (Photo 1) est implantée en Charente Maritime dans le premier bassin conchylicole d'Europe et son aire de compétence s'étend actuellement de Saint Gilles croix de Vie en Vendée à la rive droite de la Gironde. Elle est spécialisée dans les domaines de la conchyliculture et de la surveillance du littoral.



Photo 1 : Vue aérienne de la station Ifremer de La Tremblade.

❖ Ses actions :

La station apporte conseil et assistance aux professionnels pour le suivi de la reproduction des coquillages. Elle donne son avis aux administrations sur la base des résultats des réseaux de surveillance pour prévenir les risques liés à la consommation des coquillages.

❖ Son organisation :

La station de La Tremblade comprend une éclosérie d'huître et un marais expérimental.

Elle est structurée en deux laboratoires distincts :

- Le laboratoire Environnement Ressources des Pertuis charentais (LER/PC). Il est né le 1er janvier 2004, par la fusion de deux laboratoires de la Direction de l'Environnement littoral (La Rochelle et La Tremblade) et d'un laboratoire de la Direction des Ressources Vivantes (La Tremblade). Ce nouveau laboratoire, devient la vitrine des activités de l'Ifremer sur les littoraux vendéens et charentais, et remplit des missions de surveillance de l'environnement marin et d'évaluation des ressources conchylicoles.

- Le laboratoire Génétique et Pathologie (LGP) étudie les caractères génétiques des mollusques bivalves dans le but d'améliorer la qualité des élevages. Il contrôle aussi les ressources conchylicoles, étudie les agents pathogènes et leurs impacts sur l'environnement.

❖ Son personnel :

La station de La Tremblade compte environ 60 salariés répartis dans les deux laboratoires. Le chef du laboratoire génétique et pathologie est : Tristan RENAULT et celui du laboratoire environnement ressource du Pertuis charentais est Jean PROU.

D. Présentation du laboratoire environnement ressource du Pertuis charentais.

❖ Les réseaux de surveillance :

Ce laboratoire contribue à la connaissance des écosystèmes côtiers, au développement d'outils, de méthodes et de concepts utilisables par les acteurs de l'environnement. Pour répondre à ce besoin le laboratoire dispose de réseaux de surveillance de la qualité du littoral, permettant de garantir aux conchyliculteurs et aux consommateurs des informations fiables concernant la qualité des eaux et des coquillages. Il existe de nombreux réseaux de surveillance réalisés par différents laboratoires, mais le laboratoire LER/PC de La Tremblade gère les trois réseaux suivants :

- Le RNO : Le Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin qui permet l'évaluation des niveaux, de l'évolution des polluants chimiques et des paramètres généraux de la qualité du milieu marin.

- Le REPHY : Le Réseau de surveillance du phytoplancton* et des phycotoxines*

- Le REMI: Le Réseau de surveillance microbiologique évalue la qualité microbiologique des eaux et permet le classement des zones de productions conchylicoles en 4 classes suivant leur niveau de contamination microbiologique déterminée en fonction de la concentration en *Escherichia Coli*.

- zone A : Commercialisation directe autorisée.

- zone B : Distribution après purification en bassin ou lors d'un passage dans un parc de la zone A pendant 48 heures.

- zone C : Distribution après passage dans un parc de la zone A pendant au moins deux mois.

- zone D : Récolte non autorisée.

Le classement des zones conchylicoles est réalisé sur la base de 26 résultats successifs selon les critères bien définis (Tableau 1).

Nombre d' <i>Escherichia Coli</i> dans 100g de CLI*				
zones	230	1000	4600	46000
A	>90%	<10%	0%	
B	>90%		<10%	0%
C	>90%			<10%
D				>10%

Tableau 1 : Evaluation de la qualité microbiologique des zones de production de coquillages en fonction des fréquences de dépassement des seuils de contamination fixés.

Les concentrations en *Escherichia coli* mesurées dans les coquillages constituent des indicateurs de pollution fécale dans les eaux côtières. La concentration en *Escherichia Coli* permet d'évaluer le risque de trouver des germes pathogènes (bactéries ou virus).

De plus, ce réseau permet d'agir rapidement au près des professionnels et de leur production, lors d'évènements tels que la prolifération de microorganismes présentant un danger pour le consommateur.

Les résultats des analyses du REMI, réalisées par l'unité microbiologique du LER/PC ont une importance considérable dans le suivi de la qualité des productions. Ce laboratoire est donc soumis à une démarche qualité stricte. Ce réseau de surveillance réalise des prélèvements mensuels ou trimestriels sur les différentes zones de production conchylicole dans le but d'évaluer leur qualité et d'en suivre l'évolution.

❖ L'Assurance qualité :

Conformément à la politique décidée par la direction de l'Ifremer, la Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral, a mis en place une cellule qualité en 1996 et a lancé un programme de mise sous assurance qualité (d'après la Norme NF EN ISO/CEI 17025) de ses laboratoires côtiers dans la perspective de garantir les résultats des analyses pour chacun de ses 10 laboratoires répartis tout le long du littoral métropolitain.

La mise sous assurance qualité d'un laboratoire ou de ses activités, consiste à mettre à la disposition du laboratoire les moyens nécessaires (main d'œuvre, locaux, matériels) au bon déroulement des analyses. Le but de la mise sous assurance qualité est de pouvoir apporter les preuves tangibles que les analyses ont été réalisées suivant les conditions imposées par les normes et les procédures. L'assurance qualité impose donc de pouvoir retrouver, même plusieurs années après, les preuves du respect des normes en vigueur au moment de l'analyse. Le point le plus important de ce système est donc la transparence.

L'unité de microbiologie du laboratoire LER/PC de la Tremblade a été construite en 1998. Sa conception a été pensée afin de répondre aux normes de qualité et à un objectif d'accréditation* par le COFRAC*. La conception du laboratoire permet de limiter toutes les interactions et les croisements entre les échantillons, par le principe de la marche en avant.

Chaque étape de la manipulation se déroule dans une salle qui lui est spécifiquement attribuée.

L'assurance qualité impose également une rigueur métrologique, c'est à dire que le bon fonctionnement de tous les appareils doit être assuré. Par exemple, les bains-marie et les étuves font l'objet d'une surveillance en continu de leur température. Les balances et le pH-mètre sont contrôlés, avant et après leurs utilisations, à l'aide de masses étalons et de solutions tampon de référence.

II. CONTEXTE.

Pour que les coquillages soient mis sur le marché, il est important d'effectuer des contrôles qualité, car ils jouent un rôle prépondérant dans la transmission des microorganismes responsables de toxi-infection alimentaire collective (TIAC).

Les zones conchylicoles sont particulièrement sensibles aux pollutions, en effet, les coquillages par leurs pouvoirs de filtration, de rétention et d'accumulation concentrent la pollution microbiologique.

La quasi-totalité des microorganismes pathogènes identifiés dans les eaux du littoral sont de provenance fécale et sont en permanence accompagnés d'*Escherichia coli*. L'impact sanitaire de leur rejet sur le littoral demeure très mal appréhendé. En effet, une fois rejetés dans le milieu naturel, les germes en suspension dans l'eau sont transportés sous l'action des courants puis sédimentent. Le devenir des germes dépend de nombreux paramètres environnementaux agissant à la fois sur leur transport, leur survie et leur accumulation. Ces microorganismes ne se multiplient pas dans le milieu marin, leur survie varie en fonction de nombreux facteurs environnementaux parmi lesquels, l'exposition à la lumière, la turbidité la salinité, la température et la prédation. (Figure 3).

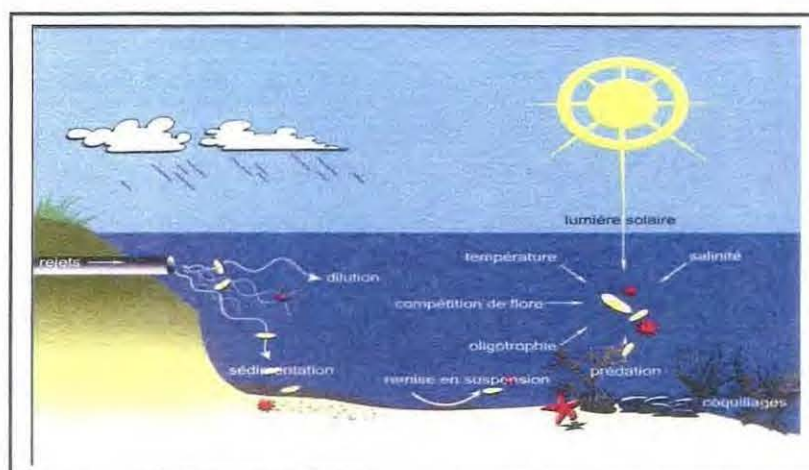


Figure 3 : Le devenir des microorganismes rejetés dans le milieu marin. (copyright Ifremer)

Dans le milieu marin, une contamination fécale peut se traduire par la présence de bactéries pathogènes (comme *Salmonella*, responsable de septicémies* et de gastro-entérites, *Shigella*, *Campylobacter*, *listeria monocytogenes*, responsable d'infection grave et *vibrio cholerae*, agent responsable du choléra) ou de virus (hépatite A).

Aujourd'hui, il est matériellement impossible de rechercher et dénombrer en routine tous les microorganismes et virus pathogènes d'origine entérique, susceptibles de contaminer le milieu naturel. En effet, ce serait trop complexe, prendrait trop de temps, et coûterait trop cher. C'est pourquoi, la surveillance bactériologique est essentiellement basée sur le dénombrement d'*Escherichia Coli*, en tant qu'indicateur de contamination fécale. Pour être fiable un tel indicateur de contamination doit répondre à certains critères comme la spécificité et la justesse.

Le stage s'inscrit dans le cadre d'un projet de développement d'outils opérationnels pour l'évaluation et la gestion du risque sanitaire sur les eaux de baignade et les coquillages

appliqués aux dysfonctionnements de STEP* (Annexe I). C'est un projet de développement d'un modèle de bioaccumulation d'*Escherichia coli* sous sa forme cultivable chez l'huître (*Crassostrea gigas**) et la moule (*Mytilus edulis**) dans les conditions environnementales des Pertuis Charentais. L'usage d'outils mathématiques couplant modèles hydrodynamiques (simulant le transport) et biologiques (calculant le temps de survie des germes et leurs bioaccumulation dans les coquillages) permet d'estimer le devenir des contaminants dans le milieu marin. La modélisation des processus de bioaccumulation d'*Escherichia coli* s'appuie sur un plan expérimental en milieu fermé. Un suivi cinétique de la contamination en *Escherichia coli* dans la chair des bivalves sera réalisé en phase de contamination et en phase de décontamination, dans des bacs d'eau de mer.

Le suivi de la concentration en *Escherichia coli* dans l'eau et la chair des coquillages sera réalisé avec la technique indirecte par impédancemétrie*. Cette méthode a été préférée à la méthode de dénombrement classique par dilutions successives dite NPP, où une sous-estimation de la concentration en germes peut être suspectée notamment pour le dénombrement dans la chair des coquillages. Dans ce cas, l'unité finale de dilution est souvent une particule de chair broyée sur laquelle peut se fixer plus d'un germe. A l'inverse, la méthode indirecte par impédancemétrie est basée sur la modification de la conductance* du milieu de culture par le métabolisme bactérien, elle n'est donc pas soumise à ce biais. En effet, l'activité métabolique n'est pas différente chez une bactérie libre et une bactérie fixée.

La méthode par impédancemétrie s'appuie sur la modification de la conductance du milieu de culture par les bactéries durant leur multiplication. Le dénombrement bactérien repose sur l'existence d'une relation entre la concentration initiale en germes et la durée de la phase de latence des bactéries dans le milieu de culture. Cette durée est d'autant plus longue que la concentration en germe inoculé est faible. La technique par impédancemétrie, permet de mesurer ce temps de latence ou de détection*. La relation reliant le temps de détection et la concentration initiale en germe peut être très différente selon la nature de la matrice analysée.

III. OBJECTIFS DE L'ETUDE.

L'objectif de ce stage est l'étalonnage de la méthode de dénombrement des *Escherichia coli* par impédancemétrie appliqué à l'eau de mer, à la chair de moules et d'huîtres.

Lors de l'expérimentation, une seule souche d'*Escherichia coli* sera utilisée lors de la contamination artificielle. L'étalonnage du Malthus est donc lui aussi réalisé avec cette unique souche d'*E. Coli*, ce qui diffère nettement de son utilisation habituelle et justifie la réalisation d'un nouvel étalonnage.

Les objectifs fixés étaient de déterminer à partir d'un protocole expérimental pré-établi, pour chacune des trois matrices* (eau de mer, huître et moule), la relation linéaire reliant le temps de détection et le logarithme de la concentration en *Escherichia coli*. Les concentrations en *Escherichia Coli* correspondant aux temps de détection obtenus, seront déterminées par la méthode NPP sur microplaque.

A partir des courbes de régressions obtenues pour chaque matrice, l'existence d'une différence significative entre les matrices pourra être testée. S'il s'avère qu'il n'y en a pas, il sera possible d'utiliser un seul étalonnage pour les trois matrices.

IV. PRESENTATION D'ESCHERICHIA COLI.

❖ Son taxon :

Le genre *Escherichia Coli* appartient à la famille des entérobactéries.

❖ Son habitat :

Escherichia Coli est un hôte normal de la flore intestinale de l'homme et des animaux où il représente 80% de la flore bactérienne. C'est une espèce commensale dominante de l'intestin. Il se retrouve en grande quantité dans les matières fécales, à partir desquels il peut se disséminer dans la nature. A ce titre *Escherichia Coli* et plus largement les coliformes*, sont recherchés comme indicateurs de contamination fécale.

❖ Son pouvoir pathogène :

Escherichia coli n'est pas considéré comme une bactérie pathogène*, à l'exception de certaines sous espèces responsables d'infections intestinales. Comme les *Escherichia coli* entérotoxigènes*, les *Escherichia coli* entéropathogènes*, les *Escherichia coli* entéroinvasifs* et les *Escherichia coli* entérohémorragiques*.

Escherichia Coli peut aussi être considéré, chez l'homme, comme pathogène opportuniste. Elle est capable de causer, quand les circonstances s'y prêtent des infections extra intestinales, en particulier au niveau du tractus urinaire.

❖ Ses caractères biochimiques :

La culture d'*Escherichia coli* est facile et rapide, sa température de croissance optimale est 37 °C et le pH de croissance optimal est compris entre 4 et 9.

❖ Ses caractères métaboliques :

Escherichia coli possède la capacité de fermenter le lactose avec production de gaz. Elle possède une enzyme, la β -glucuronidase, qui hydrolyse naturellement les β -D-glucuronides et des composés artificiels comme le 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronides (MUG)*. Elle produit de l'indole à partir du tryptophane à 44°C.

❖ L'indicateur de contamination fécale :

En tant qu'indicateur de contamination fécale *Escherichia Coli* doit répondre à certains critères qui sont :

- son taux doit correspondre à la fréquence d'apparition des TIAC.
- la spécificité : un indicateur de contamination fécale doit appartenir exclusivement à la flore fécale. Il ne doit pas être présent naturellement dans l'environnement.
- la justesse : pour que l'indication soit exacte, il est indispensable que l'indicateur ne se multiplie pas dans l'environnement marin et que la survie du germe dans l'environnement soit proche de celle des germes pathogènes.
- la sensibilité : le taux de l'indicateur doit excéder celui des germes pathogènes de façon à jouer un rôle d'alarme et pallier le caractère aléatoire de la recherche des germes pathogènes le plus souvent en faible nombre.

V. PRINCIPES GENERAUX.

A. Présentation de la méthode de dénombrement indirect par impédancemétrie directe.

Cette méthode mesure l'impédance*, c'est à dire la résistance à conduire un courant électrique au travers d'un milieu conducteur. Elle s'exprime en Ohms. Elle équivaut à l'inverse de la conductance.

Les solutions contenant des ions sont des solutions électrolytiques ou électrolytes. Ces solutions sont des milieux conducteurs. Leur capacité à conduire électricité peut être évaluée par la conductance.

En effet, les ions possèdent une charge électrique positive ou négative et ont donc la propriété de créer un courant électrique mesurable dans la solution.

❖ Principe de la méthode :

Les premières expérimentations dédiées à la mesure impédancemétrique, en microbiologie, ont été rapportées par Stewart en 1899. Il a été découvert, durant le XX^{ème} siècle, que l'impédancemétrie permettait le suivi d'une croissance bactérienne. En effet, avec l'amélioration des connaissances sur le métabolisme bactérien, les scientifiques se sont aperçus qu'il existait une relation entre l'activité métabolique des micro-organismes et les variations de conductance du milieu de culture. (Figure 4).

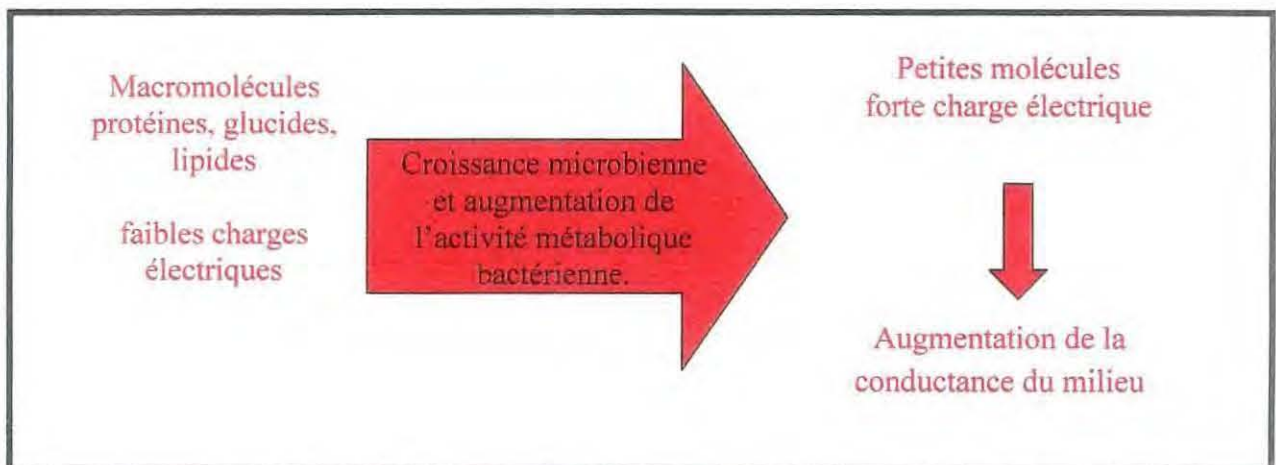


Figure 4 : Effets de la croissance microbienne sur la conductance du milieu de culture.

Cette relation repose sur la propriété qu'ont les microorganismes à dégrader les macromolécules en métabolites ionisés. Au cours de la multiplication bactérienne les macromolécules peu chargées (lipides, glucides) composant le milieu de culture sont métabolisées en molécules plus petites et plus chargées électriquement (acide acétique, acide lactique et autres). Ce phénomène provoque une augmentation continue de la conductance du milieu de culture. la conductance se stabilise seulement lorsque le milieu est épuisé. Dans le cadre de l'analyse par impédancemétrie, lors de la croissance des *Escherichia Coli*, la concentration en ions augmente brutalement, lors du début de la phase de croissance exponentielle des bactéries dans le milieu. Le logiciel de traitement de données "FLEXI" d'un analyseur microbiologique : le Malthus, calcule le point d'inflexion de la courbe de croissance bactérienne. Ce point correspond à une variation significative de conductance due à l'activité des bactéries. A ce point d'inflexion est associé un temps de détection (TD), qui

sépare le moment de l'inoculation des bactéries dans le milieu de culture et l'apparition du signal. Ce temps correspond à la durée de la phase de latence. Cette durée est d'autant plus courte que la concentration initiale, dans le milieu de culture, en *Escherichia Coli* est élevée. La conductance traduit donc la croissance bactérienne (Figure 5). Cette technique permet donc, une détection et une quantification rapide des contaminations microbiennes.

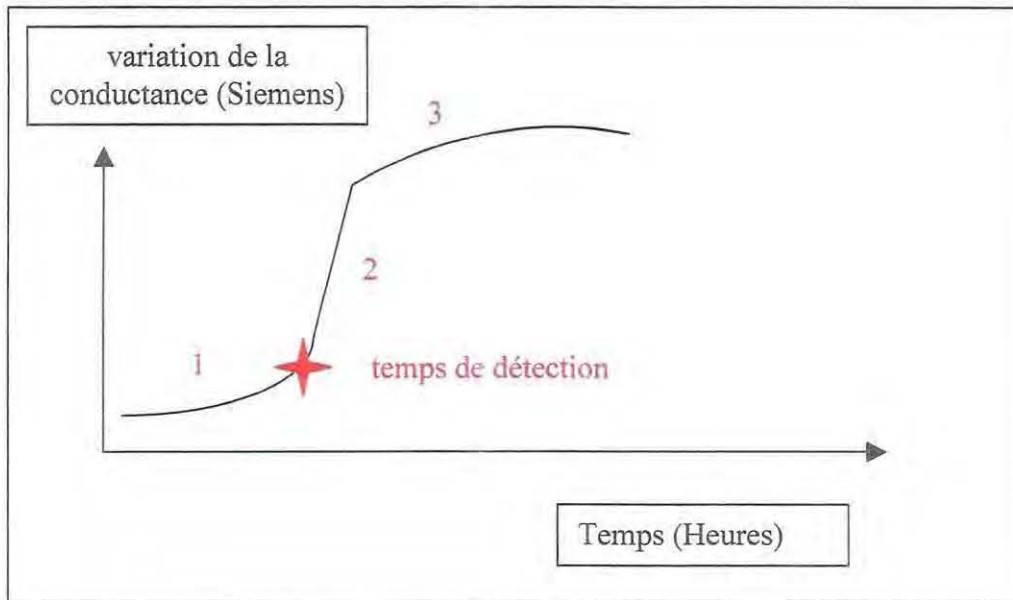


Figure 5 : Variation de la conductance d'une culture d'*Escherichia coli* au cours du temps.

Sur la courbe des variations de conductance au cours du temps, nous observons trois phases distinctes :

- 1 : Phase de latence : C'est la phase d'adaptation enzymatique, où les bactéries s'adaptent au milieu et commencent à se développer.
- 2 : Phase exponentielle : L'augmentation de l'activité métabolique des ions induit l'augmentation de la conductance.
- 3 : Phase stationnaire : L'activité métabolique se stabilise à cause de l'épuisement du milieu de culture.

❖ Description de l'analyseur microbiologique Malthus :

L'analyseur microbiologique Malthus se compose d'une unité d'acquisition et de deux bains-marie dont la température est maintenue à $44^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (Photo 3). Cette température est sélective pour la croissance des *E. coli*. Chaque bain-marie peut contenir 20 cellules Malthus qui sont des flacons de 100 ml contenant 90 ml du milieu de culture MCB. La composition de ce milieu répond aux exigences nutritives et métaboliques des *Escherichia coli*. Ce milieu renferme notamment une peptone optimisant les variations de conductance dues à l'activité métabolique des bactéries, du lactose, du laurylsulfate de sodium, inhibiteur de la flore secondaire et par conséquent favorisant la sélection des *E. Coli* et du chlorure de sodium qui améliore la vitesse de multiplication.

La mesure de la conductance est réalisée grâce aux cellules Malthus qui sont composées d'un bouchon, d'un joint et d'une électrode de platine plongeant dans le milieu de culture (Photo 2).

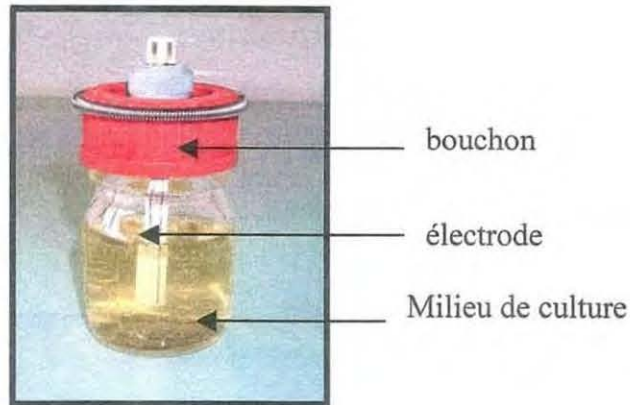


Photo 2 : Cellule Malthus

Les bains-marie du Malthus sont reliés à l'unité d'acquisition, contrôlant et stockant les mesures de conductance, effectuées toutes les 6 minutes. Un logiciel, édite ensuite les résultats. Il détermine ensuite le temps de détection et établit le graphique représentant les variations de conductance en fonction du temps.



Photo 3 : L'analyseur microbiologique Malthus.

Pour un échantillon, deux cellules de mesure sontensemencées avec 10 ml de la suspension de coquillages broyés. Chaque bain-marie reçoit une cellule de mesure. Un connecteur, relié à l'électrode, permet la transmission des valeurs de conductance à l'unité d'acquisition.

❖ Avantages et inconvénients de la méthode :

Par rapport à la méthode NPP de référence, la méthode indirecte par impédancemétrie directe présente des avantages non négligeables. Cette méthode apporte plus de précision et de rapidité (elle permet de réduire d'environ 90 % les temps d'analyses). Les manipulations sont simples et ne demandent que deux cellules de mesures par échantillon. Par conséquent, cette méthode permet une grande flexibilité et les analyses peuvent être lancées à tout moment de la journée. D'autre part, les résultats sont obtenus au minimum 10 heures après l'incubation. Ceci permet de répondre et mettre en place le plus rapidement possible les mesures adéquates face à la contamination du milieu naturel.

Cependant, comme tout appareil, il existe des problèmes de fiabilité. Ce système repose sur de nombreux intermédiaires électroniques et informatiques qui peuvent présenter des défaillances lors de l'analyse. De plus c'est une méthode de dénombrement indirecte, c'est pourquoi un étalonnage de l'appareil par rapport à une technique de référence est nécessaire.

B. Présentation de la méthode du Nombre le Plus Probable sur microplaques.

L'emploi de la microplaque MUG* (composée de 96 puits), dans la technique NPP miniaturisée, décrit dans la norme NF T90-433, apporte rapidité, précision, spécificité et commodité pour la recherche et le dénombrement d'*E. coli*.

❖ Principe de la méthode :

La technique du Nombre le Plus probable (NPP) est basée sur l'hypothèse de la répartition homogène des microorganismes dans le milieu, ce qui n'est jamais le cas. Ceci, souligne donc, la nécessité d'une bonne homogénéisation du milieu et l'existence d'une incertitude lors de la détermination du nombre caractéristique*.

Le principe de cette méthode repose sur des dilutions successives de la matrice à analyser. Un volume connu de chaque dilution est inoculé dans un milieu nutritif. Pour chacune des dilution, l'observation d'un développement bactérien dans le milieu de culture confirme alors la présence d'au moins un germe. Le nombre de puits positifs (c'est à dire où il y a présence de germes) par dilution définit alors le nombre caractéristique qui permet de déterminer, sur la base d'une analyse statistique obéissant à la loi de Poisson, le « Nombre le Plus Probable » d'*Escherichia Coli* présent dans l'inoculât non dilué. Cette correspondance NPP / Nombre caractéristique est établit dans une table.

Sur microplaque, 24 répétitions d'une dilution sont réalisées, ce qui permet une bonne précision de la méthode.

Plus de 95 % des souches d'*E. coli* possèdent une enzyme, la β -glucuronidase, qui hydrolyse naturellement les β -D-glucuronides et peut également hydrolyser des composés artificiels comme le 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronides (MUG).

Ces composés vont donc être hydrolysés par cette enzyme pour donner le 4-méthylumbelliférone, qui est un composé à fluorescence bleue, observable grâce à une lampe UV proche du visible, à 366 nm. Dans cette technique, la présence d'*E. coli* est mise en évidence par l'intermédiaire de la formation de ce composé fluorescent. Le milieu est composé de MUG, de peptone et de salicine à teneur élevée.

Ce milieu est réhydraté par l'eau à analyser. Une série de dilutions (1/2, 1/20, 1/200, 1/2000) est réalisée, dans le milieu DSM synthétique (Diluant Sel Marin). Chaque dilution, est ensuite introduite dans les puits des microplaques à l'aide d'une micropipette à 8 canaux et, 24 répétitions des dilutions sont effectuées (Photo 4). Les microplaques sont ensuite scellées avec de l'adhésif stérile.

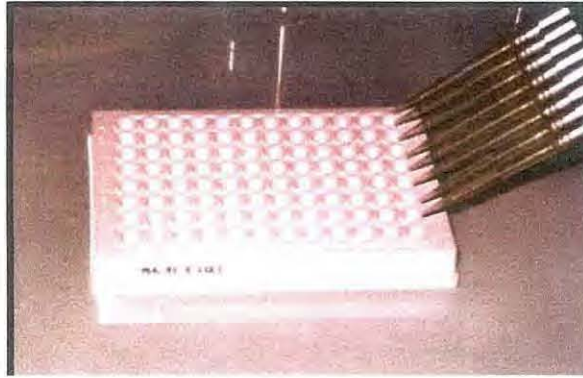


Photo 4 : Ensemencement d'une microplaque.

Cette technique a été choisie car les microplaques sontensemencées avec des dilutions d'une souche bactérienne ne contenant aucune particule. Il n'y a donc pas de source d'incertitude liées aux phénomènes d'adhésion des bactéries sur les particules.

❖ Avantages et inconvénients de la méthode :

Cette méthode est fiable mais il n'y a pas qu'*Escherichia Coli* qui libère le 4-méthylumbelliférone. En effet, d'autres *Enterobacteriaceae* et *vibrionaceae* possèdent cette activité, des *Shigella*, des *Salmonella* et quelques *Yersinia*, ce qui peut être source d'erreurs. Cette méthode est pratique et rapide, il faut simplement réaliser des dilutions et ensemen- cer les microplaques. Mais le temps d'incubation est de 36 à 72 h, ce qui est relativement long et constitue l'inconvénient majeur. En effet, ce délai d'attente ne permet pas d'intervenir rapidement lors d'épisodes de contamination fécale. Néanmoins, cette technique apporte justesse, précision et gain de temps à la méthode NPP.

I. PROTOCOLE DE L'ETUDE.

A. Plan expérimental.

L'objectif est de déterminer, pour chaque matrice étudiée la relation entre le temps de détection Malthus et la concentration en *Escherichia coli* .

Pour ce faire, une souche d'*Escherichia coli* issue du milieu naturel possédant un temps de survie élevé en eau de mer est utilisée. Après sa mise en culture dans un bouillon cœur cerveau pendant 24 heures, la culture mère ainsi obtenue est diluée au 1/100^{ème} avec de l'eau de mer à 32 psu. Elle est laissée sous agitation pendant 3 heures à l'obscurité afin de recréer le stress osmotique que subira cette même souche durant les expérimentations. La culture subie ensuite une série de dilutions au 1/10^{ème} dans du tryptone sel jusqu'à obtenir une dilution au 10⁻⁹ de la culture mère.

La concentration de chaque dilution fille ensuite estimée par un double dénombrement par la méthode NPP sur microplaque MUG. Cette méthode de dénombrement s'avère ici non sous estimée du fait de l'absence de particules dans les différentes dilutions.

En parallèle, chacune des dilutions d'*Escherichia coli* est utilisée pour contaminer les différentes matrices étudiées. Pour chaque matrice et pour chacune des dilutions, deux cellules Malthus sont inoculées, ce qui permet l'obtention de deux temps de détection.

Pour la matrice eau de mer, chaque cellule Malthus est inoculée par 1 ml de la dilution fille et 1 ml d'eau de mer stérile est introduit, puis 8 ml de tryptone sel sont ajoutés. Pour les matrices CLI d'huîtres et de moules, chaque cellule Malthus est inoculée par 1 ml de dilution d'*Escherichia coli*, 3 ml de CLI stérile dilué au 1/3 ainsi que 6 ml de tryptone sel sont ajoutés. (Figure 6)

Les résultats obtenus permettent d'établir pour chaque matrice une courbe de régression linéaire reliant la moyenne des temps de détection au logarithme décimal de la moyenne des concentrations en *Escherichia coli*.

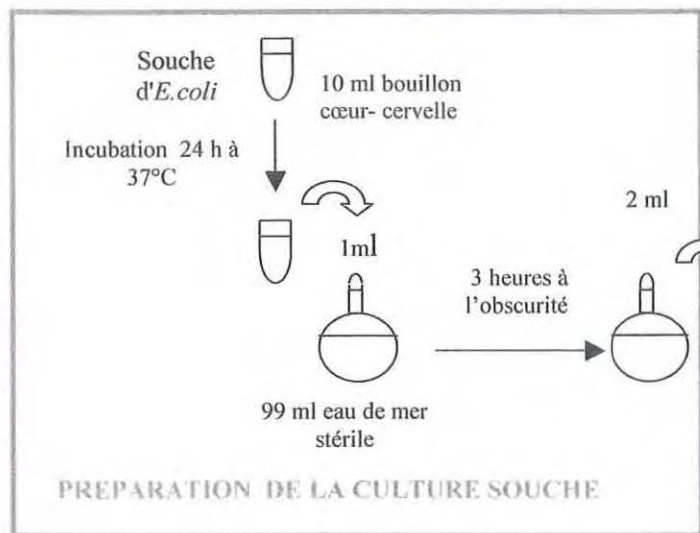
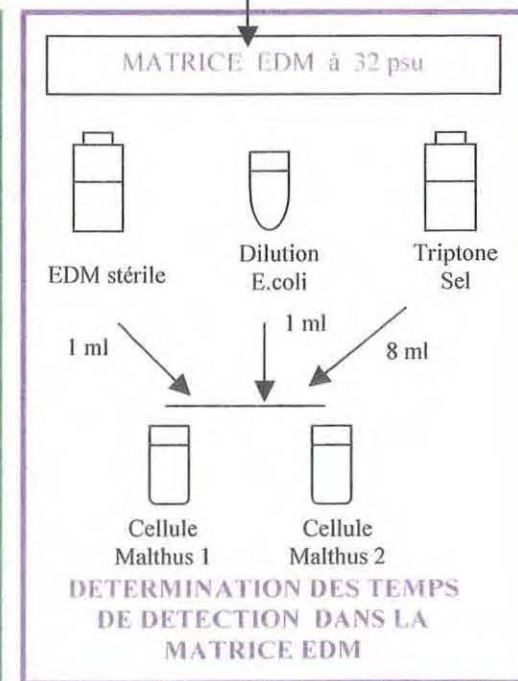
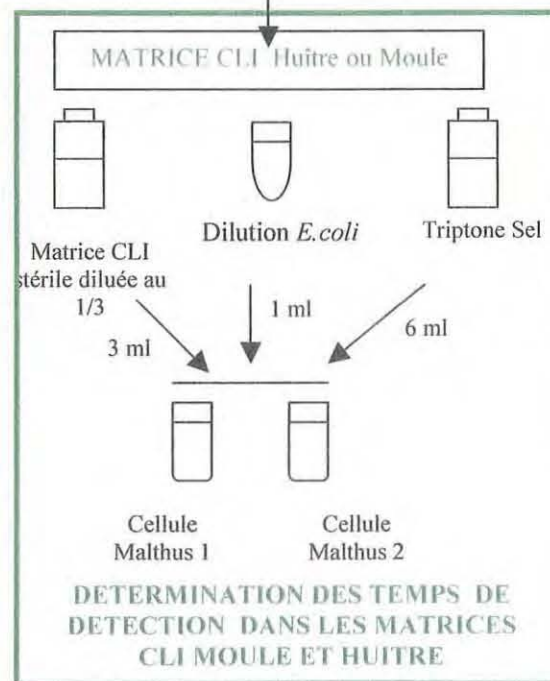
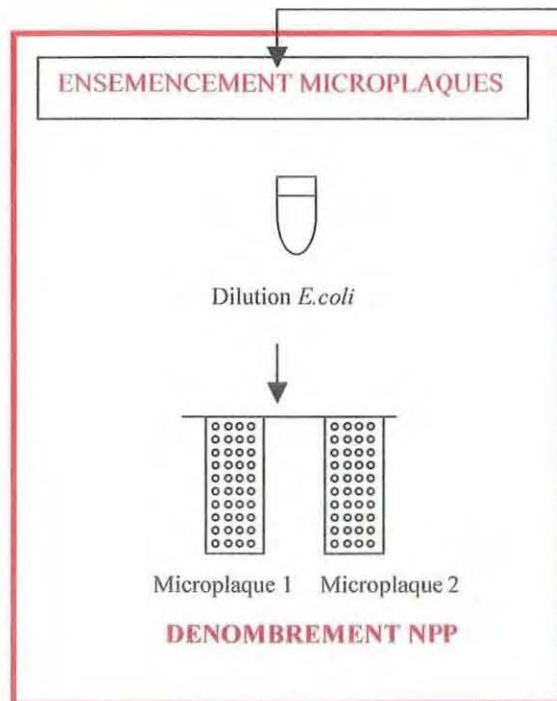
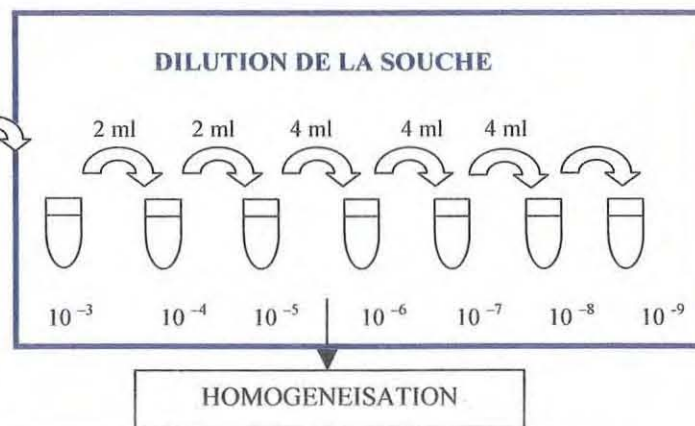


Figure 6 : schéma général de la manipulation.



B. Préparation des milieux de culture.

La préparation des milieux de culture se fait dans une salle spécifique (Photo 5). Dans cette salle, sont regroupés, les procédures de préparation des milieux et les formulaires d'enregistrement, qui permettent de conserver une traçabilité de la fabrication des milieux de culture et des diluants. Une balance et un pH-mètre aident à la préparation des milieux.

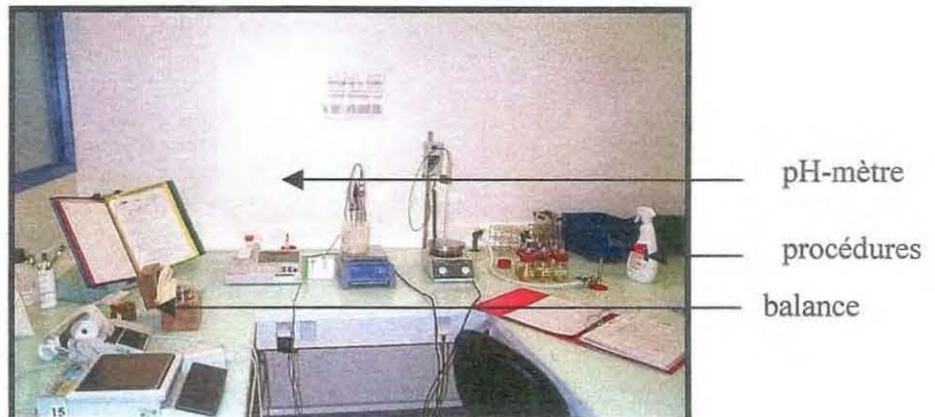


Photo 5 : Salle de préparation des milieux de culture.

Chaque milieu préparé, est stérilisé, à l'autoclave, avant son utilisation (Photo 6).

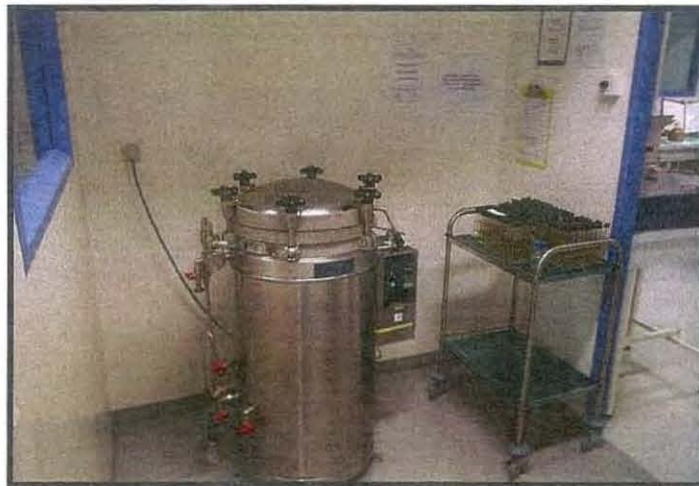


Photo 6 : L'autoclave de stérilisation.

Quelques jours avant le début de la manipulation, les milieux nécessaires à la manipulation doivent être préparés.

Pour chaque essai (correspondant à 6 dilutions de la souche) et la préparation des matrices, 14 cellules Malthus composées du milieu MCB (Malthus Coliform Broth), 4 tubes de 18 ml de tryptone sel (TS 18), 3 flacons de 36 ml de TS, 12 tubes de 9 ml de DSM (diluant sel marin), 36 tubes de 18 ml de DSM, 99 ml de Eau de mer stérile, 50 ml de eau de mer stérile et 1 tube de 10 ml de bouillon cœur-cerveille seront utilisés.

Le matériel nécessaire est : 12 microplaques, des cônes stériles, un flacon stérile, 5 bols, des pipettes de 10 ml, des pipettes de 2 ml, des boîtes de pétri stériles et 80 huîtres ou 350 moules.

❖ Préparations des diluants :

➤ Tryptone sel (TS) :

Le TS est un diluant notamment utilisé lors de la dilution au tiers de la matrice CLI. 18 ml de tryptone sel (TS 18), sont aussi utilisés lors de la réalisation des dilutions de la souche d'*Escherichia Coli*.

Sa préparation consiste à diluer 9.5 g de TS déshydraté en poudre dans 1 litre d'eau ultrapure. Les volumes sont ensuite distribués dans les tubes à l'aide d'un distributeur : une dispensette*.

➤ Diluant Sel Marin (DSM) :

Le DSM est utilisé pour diluer la souche d'*E.Coli*, avant son ensemencement sur microplaques.

Il faut diluer 22.5 g de DSM déshydraté en poudre dans 1 litre d'eau ultrapure.

❖ Préparation du milieu MCB modifié :

Ce milieu est spécifiquement utilisé pour la technique par impédancemétrie, il permet la croissance sélective des *Escherichia Coli*.

Il est nécessaire de diluer 10.9 g de MCB, 10g de tryptone et 4.7 g de lactose dans 1 litre d'eau ultrapure.

C. Préparation de la souche d'*Escherichia Coli*.

Les matrices sont encensées avec une souche d'*Escherichia coli* isolée à partir de manipulations précédentes et provenant du milieu naturel. Elle a été sélectionnée car son temps de survie, qui a été évalué expérimentalement auparavant, est plus élevé que celui des autres souches testées. L'utilisation de cette souche permettra donc de ne pas sous évaluer la survie des microorganismes lors de la détermination du modèle.

La souche d'*Escherichia Coli* est conservée dans des tubes de conservation contenant un milieu nutritif pauvre qui ne permet pas le développement de la souche bactérienne mais sa survie. Sa croissance se fait ensuite dans 10 ml d'un bouillon cœur-cerveille, durant 18 à 24 h à l'étuve à 37°C. (Figure 6, page 21). Le bouillon cœur-cerveille est un milieu nutritif tamponné. Après homogénéisation, 1 ml de ce bouillon est dilué dans 99 ml d'eau de mer stérile, il est important de laisser sous agitation pendant 3 heures avec le moins de lumière possible, afin de mettre la souche dans les conditions environnementales.

Après **homogénéisation** qui est une étape très importante pour ne pas fausser l'expérimentation, des dilutions de la souche seront réalisées jusqu'à 10⁻⁹ (figure 7). Ces dilutions peuvent également être diluées préalablement au demi ou au tiers pour élargir la plage de résultats.

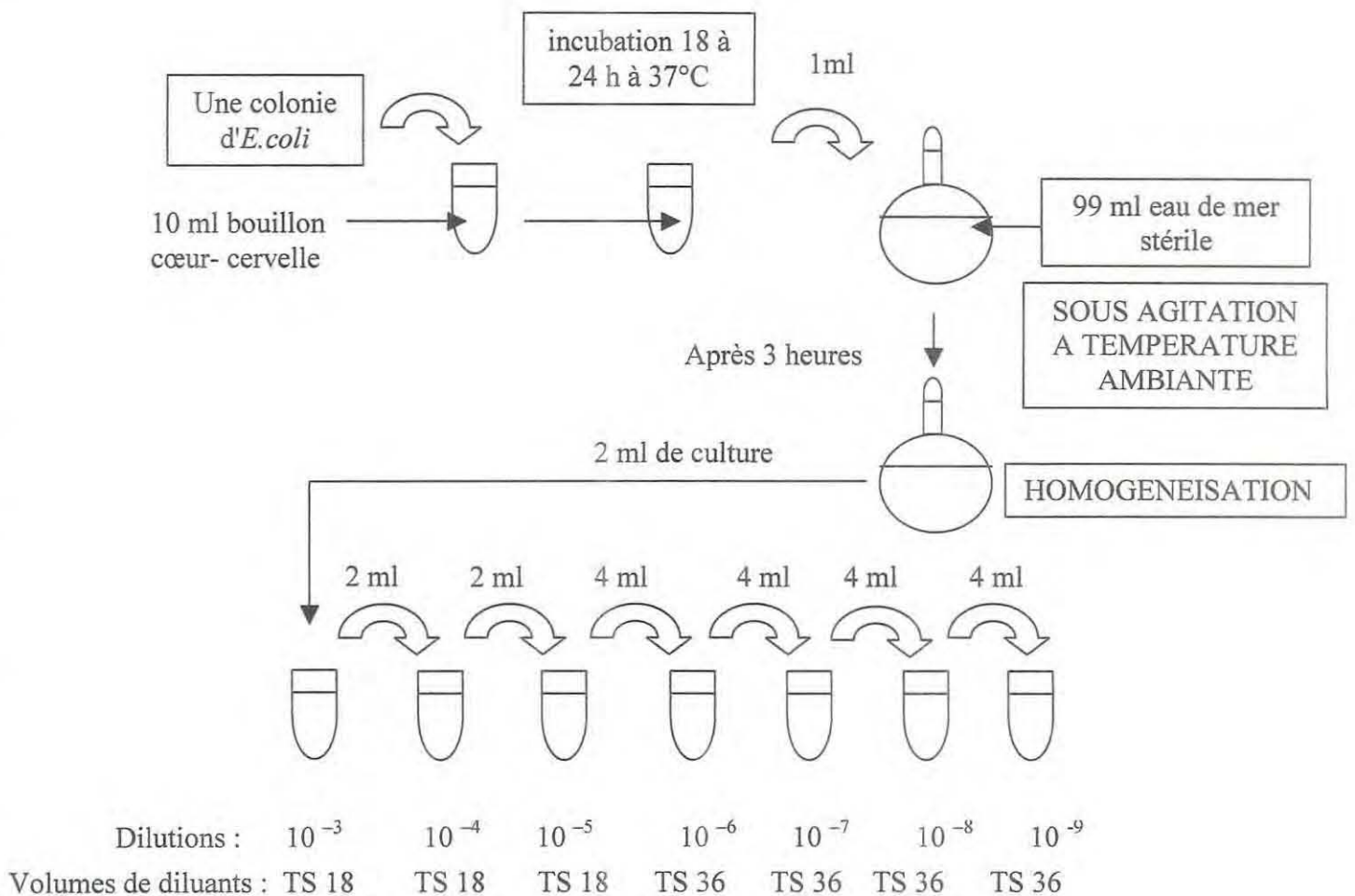


Figure 7 : Préparation et dilutions de la souche de *E.Coli*

D. Préparation des matrices.

❖ Préparation des matrices coquillages :

La matrice Chair et Liquide Intervalvaire de coquillages (CLI)* peut être réalisée à partir de moules ou d'huîtres non contaminées en *Escherichia coli*.

Via le réfrigérateur double porte les échantillons de coquillages sont réceptionnés dans la salle de "préparation des échantillons". Chaque coquillage est alors nettoyé à l'aide d'une brosse pour éliminer la vase. Les échantillons sont ensuite conservés dans des bacs en plastique au réfrigérateur réservé à la "mise en attente des échantillons" à une température de 6°C. Chaque échantillon est doté d'un numéro, noté sur une étiquette avec les renseignements (type de coquillage, date, heure et lieu du prélèvement) nécessaires à l'identification. Conformément au plan d'assurance qualité, les résultats concernant les échantillons sont notés sur une fiche d'analyse (Annexe II).

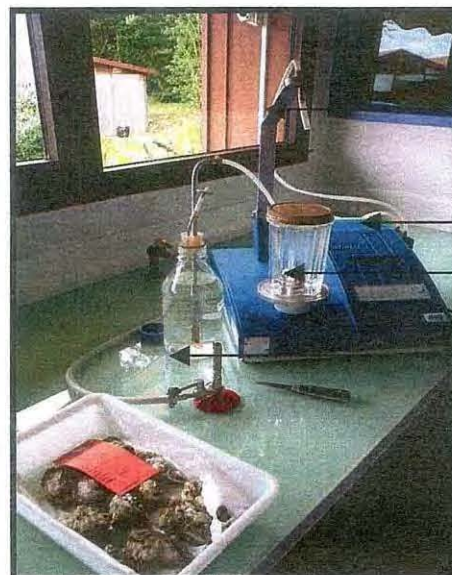
Les préparations des matrices et les ensemencements s'effectuent dans une salle conçue spécialement dans ce but (Photo 7).



Photo 7 : Salle des ensemencements.

Avant toute opération, la paillasse est désinfectée et l'ensemble du matériel nécessaire est préparé (minuteurs, couteau, alcool). Le bec bunsen est alors allumé, car la préparation de la matrice CLI (huître ou moule) doit se réaliser sous asepsie. Chaque coquillage est ouvert stérilement et introduit dans un bol "Waring". Environ 8 huîtres ou 35 moules sont introduits par bol car le poids de la CLI doit être compris entre 75 et 100 g. Il est important de recueillir cette masse à partir d'au moins 5 coquillages afin de réaliser une suspension représentative de l'échantillon.

Grace au "dilumat" (Photo 8), un système de dilution automatisé, qui comprend une balance et un bras déverseur, la CLI est diluée au tiers avec du tryptone sel.



bras déverseur

"Dilumat"

bol "Waring"

Tryptone sel

Photo 8 : Préparation de la suspension de coquillages à l'aide du dilumat.

La chair et le liquide intervalvaire (CLI) des coquillages sont ensuite broyés durant 45 secondes, à l'aide d'un bol "Waring" qui est composé d'une hélice qui s'actionne lorsqu'elle est correctement enclanchée dans le broyeur.

La suspension est laissée à décanter durant 20 minutes à température ambiante. (Photo 9). Cette dernière étape permet de revivifier les microorganismes stressés par le broyage et d'obtenir 3 phases distinctes.



mousse due au broyage

phase liquide utilisée (surnageant)

phase épaisse composée
de grosses particules

Photo 9 : Suspension de coquillages dilué au 1/3 laissée à décanter.

Seul le surnageant (ou phase liquide) est utilisé pour l'analyse. Il est récupéré et introduit dans des flacons stériles. La mesure de la salinité est effectuée. Les flacons sont ensuite congelés à -20°C afin de les conserver, avant leur utilisation, lors de la réalisation de l'essai.

Il est possible de synthétiser la préparation de la CLI selon un schéma général. (Figure 8).

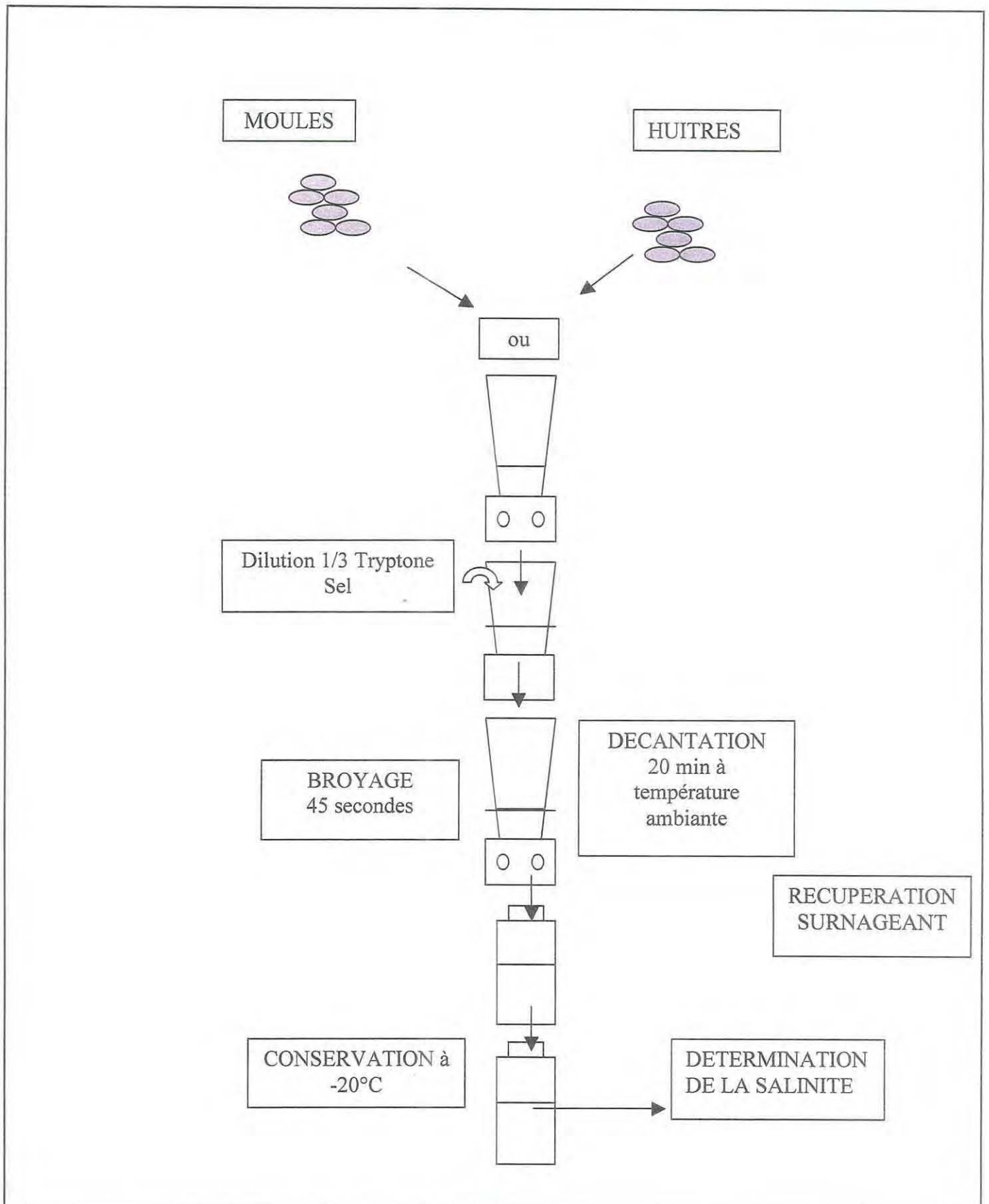


Figure 8 : Préparation de la matrice CLI

❖ Analyse de la colimétrie de la matrice avant ensemencement:

Afin de ne pas fausser les résultats, il est nécessaire d'utiliser une matrice CLI stérile en *Escherichia coli*. Un témoin négatif sur la matrice CLI (composée d'huîtres ou de moules) est réalisé à chaque essai. Pour cela, l'analyseur microbiologique le Malthus a été utilisé. Le résultat doit être inférieur à 100 *E.coli* pour 100g de matrice, car il s'agit de la limite de la méthode.

Deux cellules Malthus sont ensemencées pour chacun des flacons de CLI. (Figure 9)

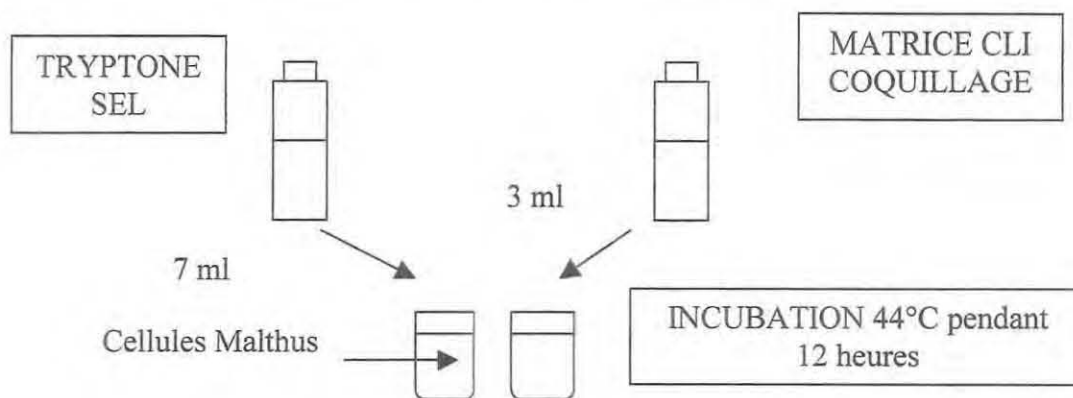


Figure 9 : Analyse de la colimétrie* dans la CLI

Chaque cellule est ensuite équipée d'un connecteur et, après agitation, est mise à incuber à 44 °C pendant au moins 10 h. Les cellules sont connectées au dispositif de mesure de la conductance après l'enregistrement dans l'unité d'acquisition de l'analyseur Malthus, de l'emplacement de chaque cellule et du numéro de l'échantillon. L'heure de mise en incubation des cellules de mesure est notée sur la fiche d'analyse pour permettre la traçabilité de l'analyse et donner la preuve de sa conformité (Annexe II).

Environ 10 heures après l'incubation, les résultats sont obtenus. Il est important de vérifier si les bains-marie du système Malthus ont bien été maintenus à une température de 44°C ± 0,5°C pendant toute la durée des analyses. Ensuite, il faut vérifier pour chaque cellule de mesure que les courbes des variations de conductance enregistrées sont bien interprétables (Annexe III). Dans le cas où la courbe ne serait pas interprétable, une fiche d'anomalie est rédigée et les composants électroniques (électrodes et connecteurs) sont testés.

A partir des courbes qui sont interprétables, un temps de détection est obtenu. Ensuite, les résultats sont enregistrés et imprimés (Tableau 3).

référence de la cellule Malthus	n° flacon	type de coquillages	bactérie recherchée	Temps de détection (min)	Durée de l'analyse (min)
1A2	1	huître	<i>E. Coli</i>	0,0	17,0
2A2	2	huître	<i>E. Coli</i>	0,0	17,0

Tableau 3 : Temps de détection d'*E.Coli* dans la matrice CLI d'huître avant l'ensemencement.

D'après une table de correspondance réalisée grâce à un étalonnage de l'analyseur microbiologique Malthus précédemment effectué par la méthode NPP en tubes, la concentration en *Escherichia Coli* dans les flacons de CLI en fonction du temps de détection

peut être déterminée. Ici, le temps de détection déterminé par le Malthus, est égal à 0 pour chacune des cellules Malthus, il y a donc moins de 100 *E. Coli* pour 100 g de CLI. La manipulation peut donc se poursuivre.

❖ Préparation de la matrice Eau de mer.

L'eau de mer provenant de la station de La Tremblade sera utilisée pour les dilutions de la souche et comme matrice pour les ensemencements. Elle est extraite du site de Perquis situé à proximité de l'embouchure de la Seudre. Elle est stérilisée à l'autoclave avant son utilisation.

E. Réalisation de l'essai.

❖ Ensemencement des microplaques :

La concentration exacte d'*Escherichia Coli* dans les dilutions de la souche est déterminée, pour cela la technique du nombre le plus probable (NPP) par microplaques est utilisée. Les dilutions comprises entre 10^{-6} et 10^{-9} seront utilisées car les résultats sont fiables seulement si les valeurs des concentrations sont comprises entre 0,4 bactéries par ml et 820 bactéries par ml.

Les dilutions sont ensuite diluées avec du DSM. Chaque dilution au DSM est transférée dans une boîte de Pétri vide et stérile. A l'aide d'une pipette multicanaux (8 canaux), 24 puits de la microplaque sont ensemencés, par dilution (Figure 6, page 21).

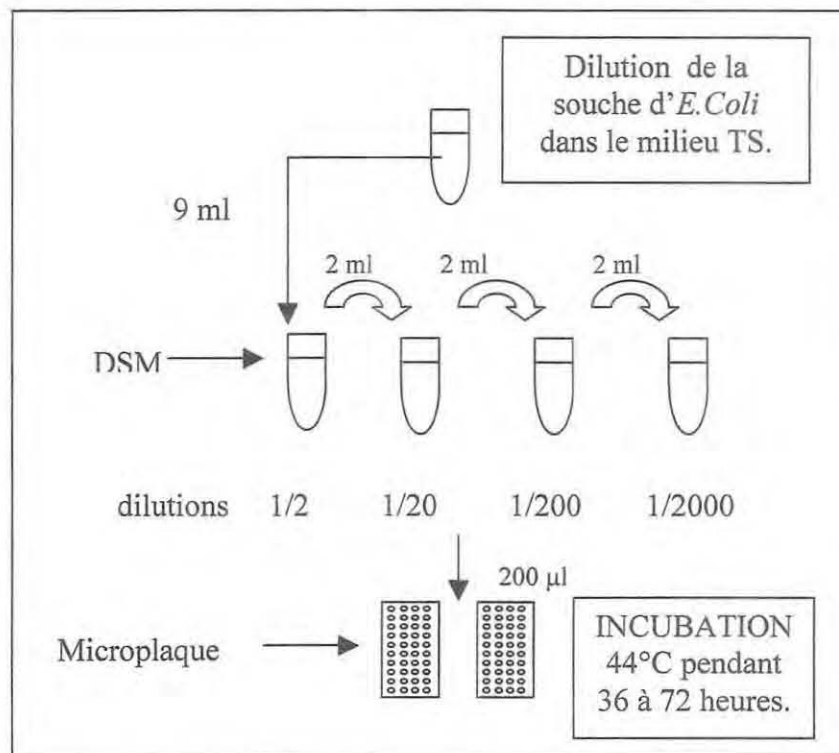


Figure 10 : Ensemencement des microplaques.

❖ Ensemencement de la matrice coquillage :

Dans chacune des deux cellules Malthus, 3 ml de la matrice CLI (réalisée avec des huîtres ou des moules), sont introduits. Ensuite, elles sontensemencées avec 1 ml de chaque dilution de la souche d'*E. Coli* (Figure 6, page 21 et Figure 11),

❖ Ensemencement de la matrice Eau de mer :

Deux cellules Malthus sontensemencées, avec 1 ml d'eau de mer stérile et 1ml de la souche d'*E. Coli*. Ensuite, 8 ml de Tryptone Sel est introduit. (Figure 11).

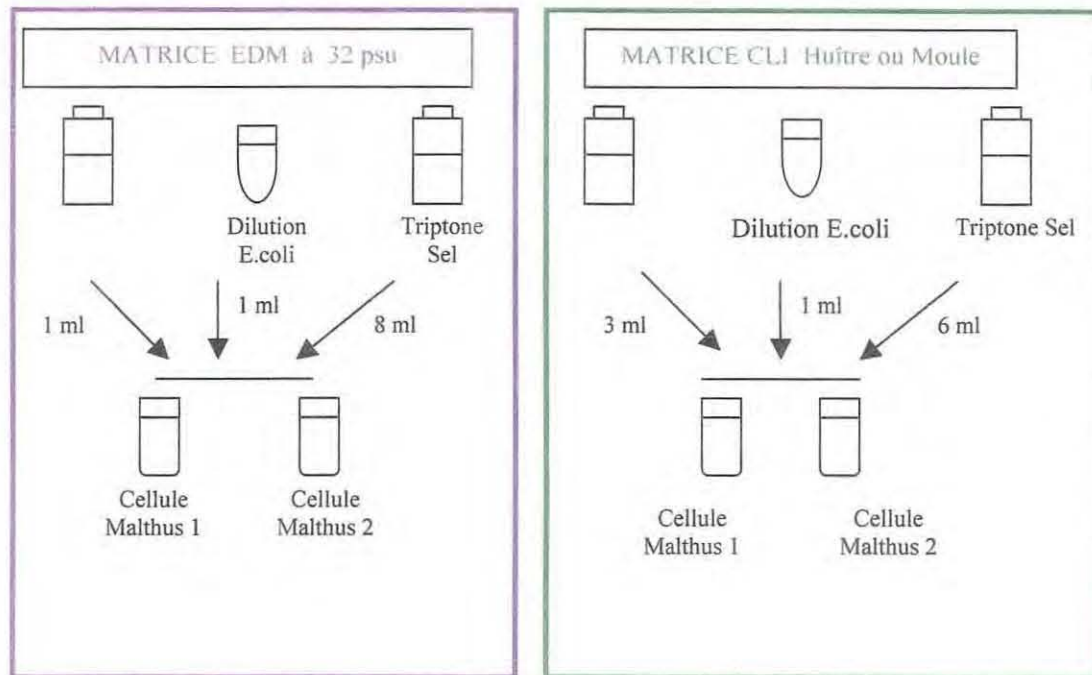


Figure 11 : Ensemencements des matrice Moule, Huître et eau de mer.

VII. RESULTATS EXPERIMENTAUX ET INTERPRETATIONS.

A. La matrice huître.

❖ Détermination des temps de détection d'Escherichia Coli :

Les temps de détection déterminés par l'appareil sont recueillis et vérifiés. Les résultats sont interprétables seulement si les deux temps de détection obtenus ont un écart inférieur à 1,3 heures. De plus, les temps de détection doivent être compris entre 5 et 12 heures.

Ensuite, pour les résultats exploitables, les moyennes géométriques des temps de détection sont effectuées. (Tableaux 4, 5 et 6).

❖ Détermination de la concentration en Escherichia Coli :

Les microplaques, incubées de 36 à 72 heures à 44°C, sont exposées sous une lampe UV, le nombre de puits présentant une fluorescence bleue est comptabilisé.

D'après une table statistique de détermination, il est possible d'en déduire les NPP d'*Escherichia Coli*, en fonction du nombre de puits positifs. (Tableaux 4, 5 et 6).

❖ Résultats expérimentaux :

Au total 6 séries d'analyses ont été réalisées entre le 20/04/2005 et le 18/05/2005 dont les résultats sont notifiés dans le Tableau 4.

Date	Matrice	NPP1 <i>E.coli</i> pour 100 g	NPP2 <i>E.coli</i> pour 100 g	Moyenne NPP	Log NPP	TD1 heures	TD2 heures	Moyenne TD
20/04/2005	Huître	13992	16149	15032	4.2	7.8	7.9	7.8
20/04/2005	Huître	2192	1754	1961	3.3	8.5	8.7	8.6
20/04/2005	Huître	119	38	67	1.8	9.6	9.5	9.5
20/04/2005	Huître	18031	29260	22969	4.4	7	7	7.0
27/04/2005	Huître	13230	11034	12082	4.1	7.6	7.6	7.6
27/04/2005	Huître	24432	29260	26737	4.4	7.7	7.7	7.7
27/04/2005	Huître	14588	25049	19116	4.3	6.9	7.2	7.0
27/04/2005	Huître	35184	30642	32835	4.5	7	6.9	6.9
27/04/2005	Huître	141890	116120	128360	5.1	6.5	6.8	6.6
03/05/2005	Huître	113330	96780	104729	5.0	6.9	6.8	6.8
03/05/2005	Huître	1508	3113	2167	3.3	7.9	8	7.9
03/05/2005	Huître	8767	14390	11232	4.1	9.4	9.6	9.5
11/05/2005	Huître	635	250	398	2.6	10.8	10.8	10.8
11/05/2005	Huître	292	204	244	2.4	10	11	10.5
11/05/2005	Huître	208	204	206	2.3	10.7	10.2	10.4
17/05/2005	Huître	1754	1672	1713	3.2	9.1	9.1	9.1
17/05/2005	Huître	21632	16017	18614	4.3	7.9	8	7.9
17/05/2005	Huître	24432	21391	22861	4.4	7.8	7.6	7.7
18/05/2005	Huître	72140	63980	67938	4.8	6.8	6.7	6.7
18/05/2005	Huître	8516	7860	8181	3.9	7.2	7.5	7.3
18/05/2005	Huître	1116	669	864	2.9	8.7	8.1	8.4
18/05/2005	Huître	21391	11333	15570	4.2	7	7	7.0
18/05/2005	Huître	2787	1583	2100	3.3	8.1	8.1	8.1
18/05/2005	Huître	204	163	182	2.3	8.9	8.9	8.9

Tableau 4 : Résultats expérimentaux pour la matrice Huître.

❖ Détermination de la relation entre le temps de détection et la concentration en *E.Coli* :

D'après les résultats obtenus, pour chaque matrice (Eau de mer, Huître et Moule), la relation entre les temps de détection et la concentration en *E. Coli* doit être établit.

Afin de réaliser l'analyse statistique, à l'aide du logiciel Statgraphics, les moyennes géométriques* des deux valeurs de NPP et des deux temps de détection obtenus, sont calculées, pour chaque dilution.

L'analyse statistique des résultats repose sur une régression linéaire entre les logarithmes des concentrations bactériennes (Log NPP) en fonction des temps de détection.

Les résultats de l'analyse de régression montrent donc que la concentration en *E.Coli* peut être estimée en fonction du temps de détection (Figure 12, 13 et 14).

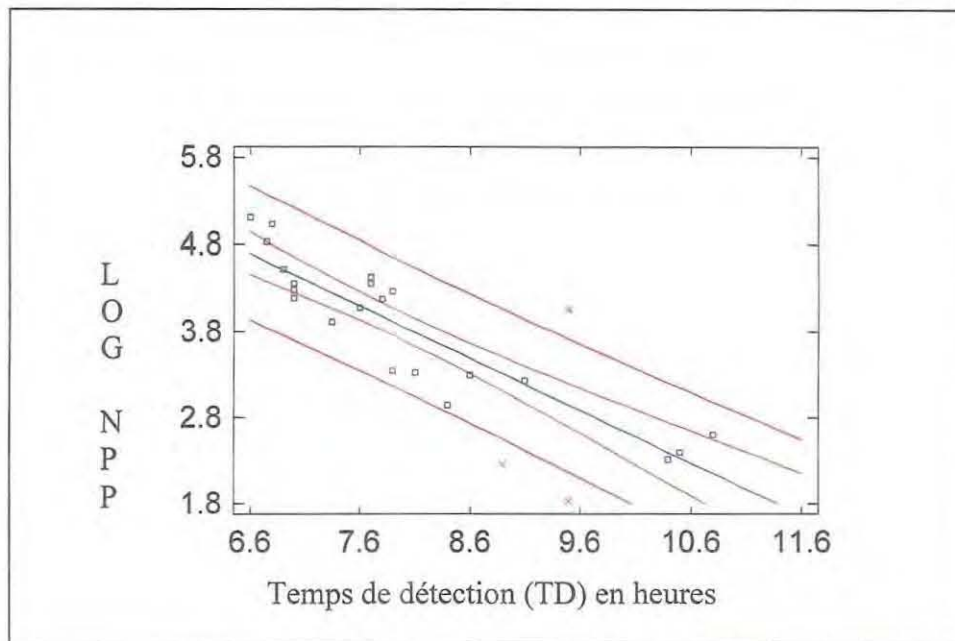


Figure 12 : Courbe de régression des Log NPP en fonction des TD pour la matrice Huître.

❖ *Analyse statistique :*

Certains points de l'analyse ont du être supprimés, quand les logarithmes des concentrations bactériennes était inférieur à 2 (qui est le seuil de détection du Malthus) ou si les points sont à l'extérieur des courbes roses (qui représentent les limites qui permettent d'exclure les résultats aberrants).

Les courbes rouges quant à elles, correspondent à l'intervalle des logarithmes des concentrations bactériennes moyennes. La courbe bleue représente les logarithmes prévus. L'analyse statistique des résultats, a permis de déterminer la relation entre les logarithmes des concentrations bactériennes et les temps de détection pour la matrice huître. Le coefficient de corrélation est égal à $-0,913229$, ce qui indique une relation linéaire entre les log des concentrations bactériennes et les temps de détection. Le coefficient de détermination R^2 , pour cette courbe est égal à $0,83399$. Ce coefficient permet d'évaluer le degré de dissociation entre les deux variables et ainsi de pouvoir juger de la qualité de l'ajustement des points par la droite de régression. Un coefficient de détermination proche de 1, permet de dire de façon satisfaisante que l'ajustement est bon. Au contraire, plus le coefficient se rapproche de 0, plus le nuage de points est diffus autour de la droite de régression. Ici, il est possible de dire que l'ajustement des points, par la droite de régression, est satisfaisant. L'équation du modèle ajusté est : $\text{Log NPP} = 8,71578 - 0,607955 * \text{TD}$.

B. L'eau de mer.

❖ Résultats expérimentaux :

Pour la matrice Eau de Mer, au total 8 séries d'analyses ont été réalisées entre le 20/04/2005 et le 25/05/2005 dont les résultats sont notifiés dans le Tableau 5.

Date	Matrice	NPP1 <i>E. coli</i> pour 100 g	NPP2 <i>E. coli</i> pour 100 g	Moyenne NPP	Log NPP	TD1 heures	TD2 heures	Moyenne TD
20/04/2005	Eau de mer	13992	16149	15032	4.2	7.9	8.8	8.3
20/04/2005	Eau de mer	2192	1754	1961	3.3	0	9.1	9.1
20/04/2005	Eau de mer	119	38	67	1.8	11.2	0	11.2
27/04/2005	Eau de mer	18031	29260	22969	4.4	7.1	7.2	7.1
27/04/2005	Eau de mer	13230	11034	12082	4.1	7.8	7.7	7.7
27/04/2005	Eau de mer	24432	29260	26737	4.4	7.5	7.5	7.5
27/04/2005	Eau de mer	14588	25049	19116	4.3	7.3	7.3	7.3
03/05/2005	Eau de mer	35184	30642	32835	4.5	7.2	7.3	7.2
03/05/2005	Eau de mer	141890	116120	128360	5.1	6.7	7	6.8
03/05/2005	Eau de mer	113330	96780	104729	5.0	6.9	6.7	6.8
03/05/2005	Eau de mer	1508	3113	2167	3.3	8.3	8	8.1
11/05/2005	Eau de mer	204	292	244	2.4	10.5	11.2	10.8
11/05/2005	Eau de mer	204	208	206	2.3	10.7	10.4	10.5
11/05/2005	Eau de mer	292	208	246	2.4	10.6	10.8	10.7
11/05/2005	Eau de mer	163	160	161	2.2	10.7	11.3	11.0
17/05/2005	Eau de mer	24432	21391	22861	4.4	7.9	8	7.9
17/05/2005	Eau de mer	21632	16017	18614	4.3	8.2	8.3	8.2
17/05/2005	Eau de mer	2846	4212	3462	3.5	9.1	9.2	9.1
17/05/2005	Eau de mer	1672	1754	1713	3.2	9.4	9.1	9.2
18/05/2005	Eau de mer	2787	1583	2100	3.3	8.9	8.6	8.7
18/05/2005	Eau de mer	21391	11333	15570	4.2	7.6	7.7	7.6
18/05/2005	Eau de mer	1116	669	864	2.9	8.9	8.9	8.9
18/05/2005	Eau de mer	8516	7860	8181	3.9	7.9	8	7.9
18/05/2005	Eau de mer	72140	63980	67938	4.8	7.6	7.3	7.4
24/05/2005	Eau de mer	132300	145880	138924	5.1	7	6.7	6.8
24/05/2005	Eau de mer	13230	9092	10968	4.0	7.6	7.6	7.6
24/05/2005	Eau de mer	949	1433	1166	3.1	8.9	8.9	8.9
25/05/2005	Eau de mer	12483	7214	9490	4.0	7.5	7.5	7.5
25/05/2005	Eau de mer	1859	1433	1632	3.2	9	8.8	8.9
25/05/2005	Eau de mer	47151	67050	56227	4.7	7	7	7.0
25/05/2005	Eau de mer	6547	5634	6073	3.8	7.7	7.6	7.6
25/05/2005	Eau de mer	460	350	401	2.6	8.8	8.6	8.7

Tableau 5 : Résultats expérimentaux pour l'eau de mer.

❖ Détermination de la relation entre le temps de détection et la concentration en E.Coli :

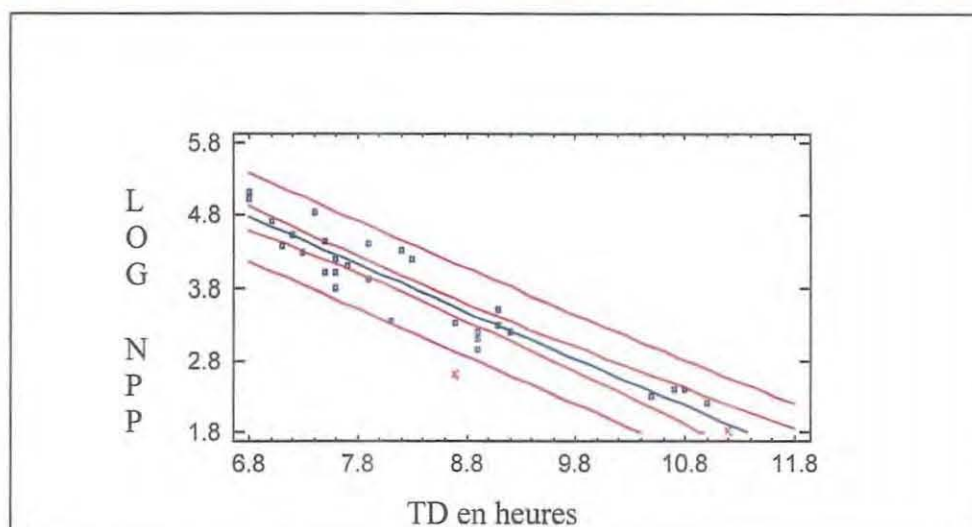


Figure 13 : Courbe de régression des Log NPP en fonction des TD pour la matrice EDM.

❖ Analyse statistique :

L'analyse statistique des résultats, a permis de déterminer la relation entre les logarithmes des concentrations en *Escherichia Coli* et des temps de détection pour la matrice Eau de mer. Le coefficient de corrélation est égal à $-0,94208$, ce qui indique une relation linéaire entre les variables. Le coefficient de détermination R^2 est égal à $0,887514$, ce qui montre que l'ajustement réalisé, par la droite de régression, est bon. L'équation du modèle ajusté est $\text{Log NPP} = 9,17601 - 0,648449 * \text{TD}$.

C. La matrice moule.

❖ Résultats expérimentaux :

Pour la matrice CLI Moule au total deux séries d'analyses ont été réalisées entre le 24/05/2005 et le 01/06/2005 dont les résultats sont notifiés dans le Tableau 6.

Date	Matrice	NPP1 <i>E.coli</i> pour 100 g	NPP2 <i>E.coli</i> pour 100 g	Moyenne NPP	Log NPP	TD1 heures	TD2 heures	Moyenne TD
24/05/2005	Moule	163	119	139	2.1	8.1	8.1	8.1
24/05/2005	Moule	949	1433	1166	3.1	7	7.8	7.4
24/05/2005	Moule	13230	9092	10968	4.0	7.3	7.1	7.2
24/05/2005	Moule	132300	145880	138924	5.1	6.7	6.6	6.6
01/06/2005	Moule	109510	129850	119247	5.1	7.3	7.7	7.5
01/06/2005	Moule	838	863	850	2.9	8.6	8.9	8.7
01/06/2005	Moule	4669	3575	4086	3.6	8.2	8.5	8.3
01/06/2005	Moule	255	403	321	2.5	9.7	9.9	9.8

Tableau 6 : Résultats expérimentaux pour la matrice Moule.

❖ Détermination de la relation entre le temps de détection et la concentration en E.Coli :

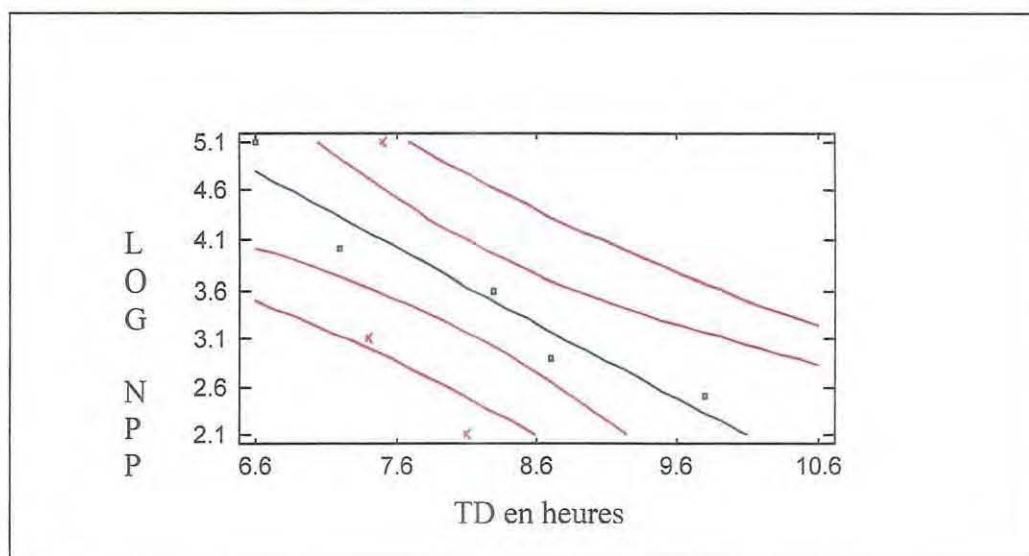


Figure 14 : Courbe de régression des Log NPP en fonction des TD pour la matrice Moule.

❖ Analyse statistique :

L'analyse statistique des résultats, a permis de déterminer la relation entre les logarithmes des concentrations microbiennes et des temps de détection pour la matrice Moule. Mais, nous manquons de points pour avoir une analyse statistique fiable.

VIII. DISCUSSION.

La relation entre les concentrations bactériennes et les temps de détection a été déterminé pour chacune des trois matrices.

Mais, l'étude avait aussi pour but de déterminer s'il existe un effet matrice, c'est à dire si les différentes matrices (Eau de mer, Huître ou Moule) interviennent dans l'obtention des temps de détection. En effet, la composition de la matrice (huître, moule ou eau de mer) pourrait influencer la dégradation du milieu par les micro-organismes, et par conséquent, modifier la durée de la phase de latence et donc des temps de détection.

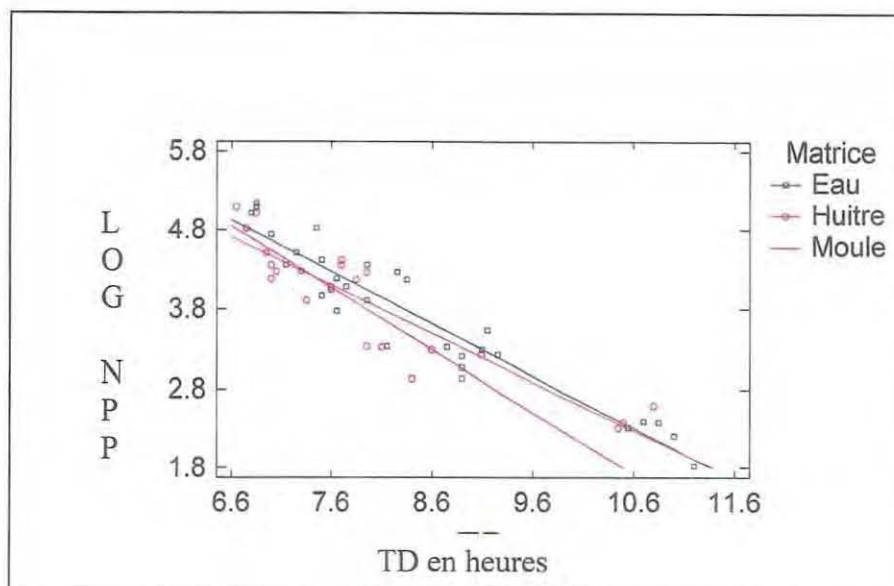


Figure 15 : Les trois courbes de régression superposées.

Les résultats de chaque matrice sont donc analysés sur une seule courbe de régression afin de déterminer s'il y a ou non un effet matrice. (Figure 15).

Pour tester l'effet matrice nous vérifions, en appliquant une méthode statistique adaptée, si la pente et la valeur à l'origine des différents modèles obtenus sont significativement différent entre eux. Le test indique au niveau de confiance à 90% ou plus qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative entre les pentes et les valeurs à l'origine des modèles. Ce qui indique que les modèles ne sont pas significativement différents entre eux. L'hypothèse d'un effet matrice peut donc être rejeté. Ce résultat confirme que pour l'ensemble des matrices, un même modèle unit le temps de détection et la concentration en germe. Il est donc possible, a priori d'utiliser un même étalonnage pour l'expérimentation (Figure 16).

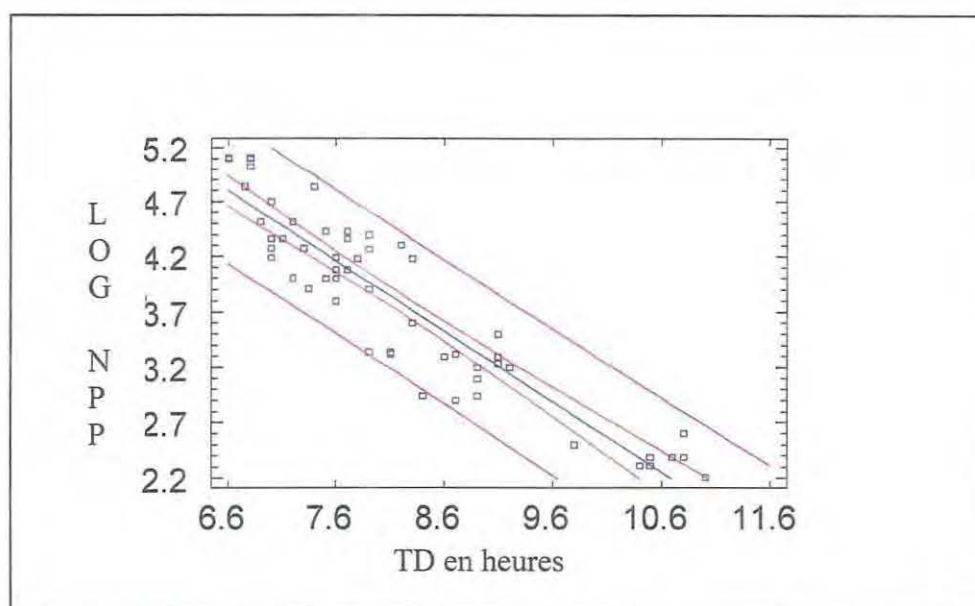


Figure 16: Courbe de régression des Log NPP en fonction des TD.

❖ Analyse statistique :

Le coefficient de détermination R^2 est égal à 0,856768, ce qui indique un ajustement relativement satisfaisant. Le coefficient de corrélation est égal à $-0,925618$, ce qui prouve une relation linéaire entre les variables. En effet, il y a une relation linéaire entre le logarithme de la concentration en *E. Coli* et le temps de détection.

L'analyse statistique donne un modèle linéaire pour décrire la relation entre Log NPP et temps de détection. L'équation du modèle ajusté est : $\text{Log NPP} = 9,00065 - 0,636402 * \text{TD}$.

❖ Bilan des essais réalisés :

Lors de cette manipulation, environ 50 essais interprétables ont été réalisés. Toutefois, un certain nombre d'interrogation sur ces résultats peuvent se poser. Le nombre d'essai réalisé est-il suffisant pour conclure sur l'absence de différences entre les matrices ? Les niveaux de contaminations atteints, sont-ils suffisamment répartis sur l'ensemble de la gamme ?

CONCLUSION

Cette étude avait pour but de réaliser l'étalonnage de la méthode de dénombrement des *Escherichia coli* par impédancemétrie pour la modélisation des processus de contamination et décontamination chez *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas* et l'eau de mer. Il s'agissait d'étalonner un analyseur microbiologique : La Malthus, qui détermine des temps de détection.

Des cellules Malthus et des microplaques, ont étéensemencées avec des dilutions d'une souche d'*Escherichia Coli*, afin de déterminer la relation entre temps de détection et concentration bactérienne.

Ensuite, avec les résultats obtenus, des droites de régression des logarithmes des concentrations bactériennes en fonction des temps de détection sont effectuées, pour les matrices étudiées (Eau de mer, Huître et Moule).

Ceci, a permis de prouver qu'il existe une relation linéaire entre les temps de détection et les logarithmes des concentrations bactériennes. Ensuite, il a pu être déduit qu'il n'y a pas de différence significative entre les trois matrices. Il est donc, à priori possible d'utiliser un seul étalonnage pour la modélisation des processus de contamination et décontamination d'*E. Coli* chez *Crassostrea gigas*, *Mytilus edulis* et dans l'eau de mer.

D'un point de vue personnel, lors de ce stage, j'ai pu apprendre à adapter le protocole expérimental en fonction de l'évolution des résultats dans le but de faire avancer le projet. J'ai pu acquérir des connaissances sur l'environnement marin. Ce stage m'a aussi permis de mettre en application mes connaissances acquises en cours, d'obtenir une expérience professionnelle en microbiologie et de me rendre compte des avantages de la vie active.

Travailler au sein de ce laboratoire de microbiologie, m'a aussi permis de découvrir les nombreuses activités réalisées et la technique de dénombrement par impédancemétrie.

D'autre part, effectuer mon stage dans un laboratoire accrédité m'a permis de prendre conscience de l'importance de la rigueur et de la traçabilité.

LEXIQUE

Accréditation: Reconnaissance par un organisme du niveau d'assurance qualité en conformité avec des textes de référence.

Bactéries pathogènes : Bactéries capables d'entraîner des perturbations plus ou moins importantes chez l'hôte.

Bio-accumulation : accroissement de la population bactérienne dans le milieu.

Bivalve : Ce dit des coquillages composés de deux valves jointes par un muscle charnière.

CLI: Chair et liquide intervalvaire* des coquillages.

COFRAC : Comité français d'Accréditation.

Coliformes : Ce terme regroupe toutes les entérobactéries ayant des caractères communs : bacilles à gram négatif, ne possédant pas d'oxydase, non sporulés, capables de fermenter le lactose avec production de gaz en 48h à 37 °C.

Colimétrie : Concentration en *Escherichia coli* dans le milieu.

Conchyliculture : Elevage de coquillages comestibles (huîtres, moules, palourdes...).

Conductance : Elle correspond à l'inverse de la résistance. Elle s'exprime en Siemens.

Crassostrea gigas : Espèce d'huître, aussi appelée « huître creuse Japonaise ».

Dispensette : Appareil qui permet de délivrer de manière constante un volume défini.

Escherichia coli entérotoxigènes : Ces bactéries adhèrent à la paroi cellulaire et produisent une toxine responsable de la diarrhée du voyageur.

Escherichia Coli entéropathogènes : Bactéries responsables de gastro-entérites infantiles à cause de leurs pouvoirs d'adhésions aux cellules et de sécrétion d'une toxine.

Escherichia Coli entéroinvasif : Ces bactéries envahissent les cellules épithéliale du gros intestin et sont responsables du syndrome dysentérique*

Escherichia coli entérohémorragiques : Ces bactéries provoquent des diarrhées et des émissions de sang car ils induisent des lésions sur les muqueuses intestinales.

Impédance : Grandeur qui mesure le quotient de la tension par l'intensité. Elle s'exprime en ohms. Elle équivaut à l'inverse la conductance.

Impédancemétrie : Mesure de l'impédance.

Indicateur de contamination fécale : Microorganisme appartenant exclusivement à la flore fécale. Il est indispensable que l'indicateur ne se multiplie pas dans l'environnement marin.

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

Malthus: Analyseur microbiologique par impédancemétrie. Il comprend deux bains-marie (44°C), une unité d'acquisition de données contrôlant et stockant les mesures de conductance et un ensemble informatique traitant les données. Il effectue des mesures de conductance toutes les 6 minutes.

Matrice: Type d'échantillon ou support à partir duquel est réalisé l'analyse (exemple de matrice : eau de mer, moule, huître).

Moyennes géométriques : Racine carrée du produit de deux nombres.

MUG : Le 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronides.

Mytilus edulis : Espèce de moules, aussi appelée « moule bleue »

Nombre caractéristique: Il correspond aux nombres de tubes ou de puits positifs par dilution pour la méthode NPP. (positif = présence de germes)

NPP: Nombre le Plus Probable.

Phytoplancton : Ensemble des algues microscopiques qui sont en suspension dans l'eau.

Phycotoxine : C'est une toxine produite par certaines espèces de phytoplancton.

REMI : Le Réseau de surveillance microbiologique évalue la qualité microbiologique des eaux conchylicoles dans son domaine géographique et permet le classement des zones de production conchylicole en 4 classes suivant le niveau de contamination microbiologique.

Septicémie : Etat pathologique provoqué par le développement de germes pathogènes dans le sang, leur dissémination dans l'organisme et l'action des toxines qu'ils produisent.

STEP : Station d'épuration.

Syndrome dysentérique : Maladie infectieuse caractérisée par une inflammation du gros intestin.

Temps de détection : Le temps nécessaire à l'apparition d'une variation significative de conductance. Il correspond au premier point d'inflexion de la courbe de conductance rendant compte de l'activité des germes dans le milieu. Le temps de détection est inversement proportionnel au nombre de germes initialement apportés dans le milieu.

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective : Manifestation pathologique (infection et/ou intoxication) identique chez un ensemble de personnes, lié à la consommation d'un même aliment.

BIBLIOGRAPHIE

- <http://www.ifremer/>
- *Dossier microbiologique sur les méthodes d'analyses microbiologiques : NPP sur microplaques et impédancemétrie.*
- JF HERNANDEZ, JM GUIBERT, JM DELATTRE, C. OGER, C CHARRIERE, B.HUGHES, R. SERCEAU and F. SINEGRE. *Evaluation of miniaturized procedure for enumeration of Escherichia coli in seawater, based upon hydrolysis of 4-Methylumbelliferyl β -D- Glucuronide.* 1991.
- Jacques DUPONT, Dominique MENARD, Christiane HERVE, Frédérique CHEVALIER, Benoît BELIAEFF et Bernadette MINIER. *Estimation de l'abondance d'Escherichia Coli dans les mollusques bivalves marins par Conductance-métrie.* 1993.
- Biokar Diagnostics. Produits pour la microbiologie.
- PINEAU, J. *Validation interne de la méthode de dénombrement des Escherichia Coli présumés par impédancemétrie.* 2002.
- Jean-Côme PIQUET, Christian AUGER, Cyrielle MONTAUBIN. *Contamination microbienne du milieu marin.* Mars 2005.
- Jacques DUPONT, Dominique MENARD, Christiane HERVE, Frédérique CHEVALIER, Benoît BELIAEFF et Bernadette MINIER.. *Dénombrement des Escherichia Coli dans les coquillages par Conductance-métrie.* 1995.
- Jean LESNE, Bernard FESTY, et Jean-Yves LE GALL. *Coquillages et santé publique du risque à la prévention.* 1992.

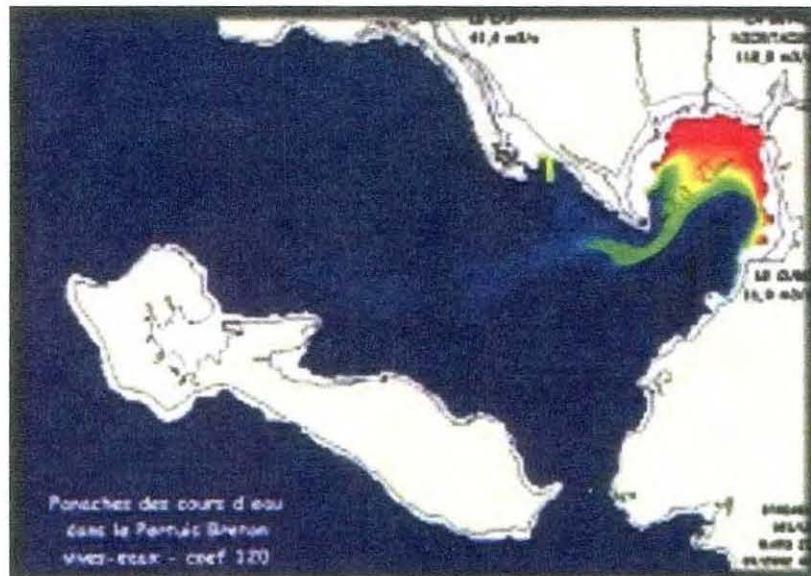
TABLES DES ANNEXES

<u>ANNEXE I</u> : Cartes de modélisation des flux d'eaux douces dans les embouchures des fleuves.	44
<u>ANNEXE II</u> : Fiches d'enregistrement des résultats d'analyses microbiologique.	45
<u>ANNEXE III</u> : Courbe de conductance traduisant un de temps de détection valide.	48
<u>ANNEXE IV</u> : Courbe de conductance traduisant un de temps de détection non valide.	49

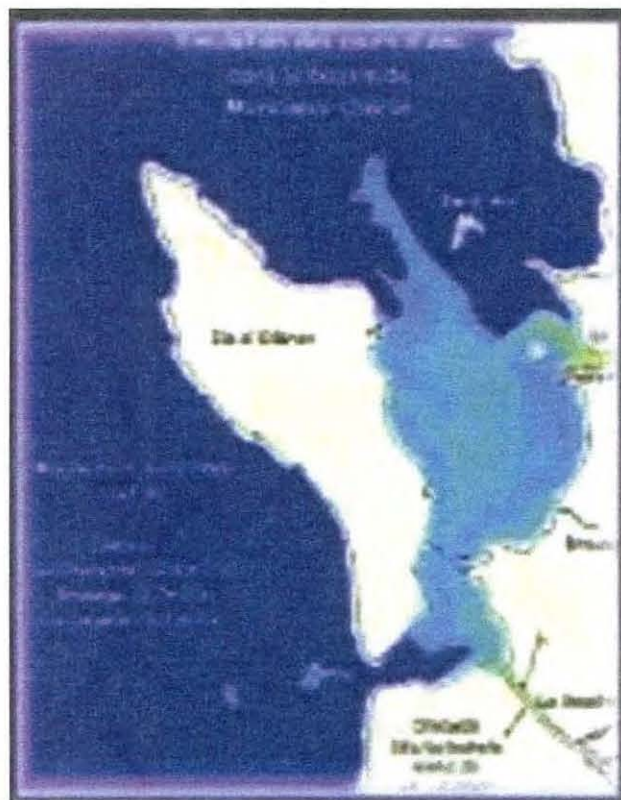
ANNEXES

ANNEXE I :

**CARTE DE MODELISATION DES FLUX D'EAUX DOUCES DANS LE
PERTUIS CHARENTAIS:**



**CARTE DE MODELISATION DES FLUX D'EAUX DOUCES DANS LE
BASSIN DE MARENNE-OLERON:**



ANNEXE II :
FICHES D'ENREGISTREMENT DES RESULTATS D'ANALYSES
MICROBIOLOGIQUES.

« Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages marins vivants »

Technique indirecte par impédancemétrie directe

Echantillon N° :

Programme :

REMI C CMIC Points noirs (PN) Autres :

Prélèvement :

POINT : N° QUADRIGE :

Date : / / Heure : hmn

Taxon : Huîtres Moules Palourdes Coques Autres :

Suspension – mère :

Dilumat n°28

Visa opérateur :

Balance n°:

Broyeur – Mixeur n° : 16 27

étiquette dilumat Délai entre le prélèvement et le début de l'analyse :heures

Heure de mise en incubation des cellules : hmn visa :

Révisé par :

Vérifié par:

Approuvé par :

date :

date :

date :

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 :

<u>Milieux utilisés</u>	N° d'autoclavage
<u>Tryptone Sel (dilution au 1/3)</u>	
<u>MCB (milieu Malthus)</u>	
<u>Tryptone Sel 70 ml</u>	

« Dénombrement des *Escherichia coli* et des Entérocoques intestinaux dans les eaux de surface et résiduaires »

Méthode miniaturisée par ensemencement en milieu liquide

Echantillon N° :

Programme :

REMI C CMIC Points noirs (PN) Autres :

Prélèvement :

POINT :

N° QUADRIGE :

C. Date : / /

Heure : hmn

Paramètres physico-chimiques :

Température :°C

Salinité :‰

Conductimètre n° :

Thermomètre n° :

Ensemencement :

Visa opérateur :

Pipette multicanaux : 42 43 13

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

<u>INCUBATION</u>	<u><i>Escherichia coli</i></u>	<u>Entérocoques intestinaux</u>
	<u>36 à 72 h à 44°C +/- 0,5°C</u>	<u>36 à 72h à 44°C +/- 0,5°C</u>
<u>n° incubateur</u>	<u>36</u>	<u>36</u>
<u>Date</u>		
<u>Heure</u>		
<u>visa</u>		
<u>LECTURE</u>		
<u>Date</u>		
<u>Heure</u>		
<u>visa</u>		

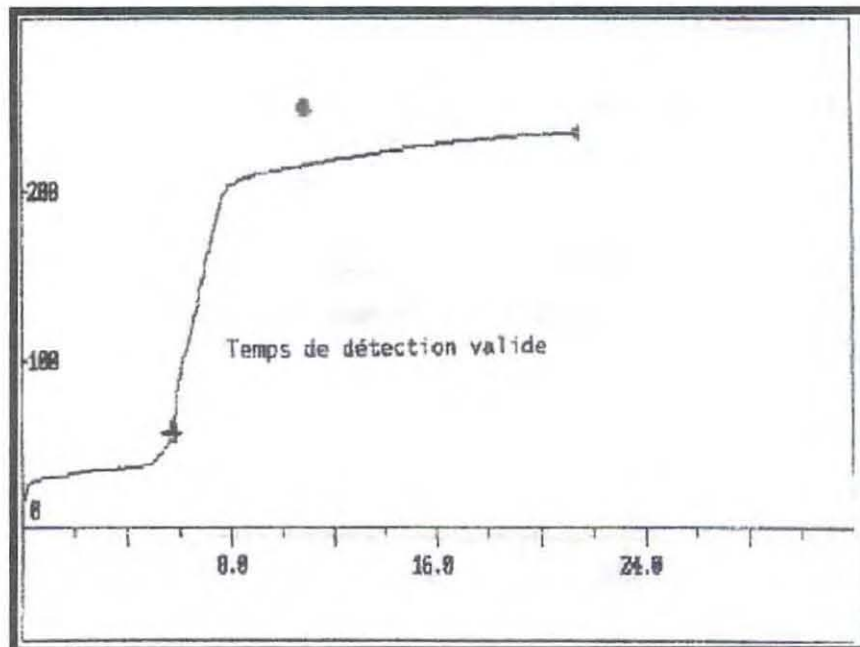
<u>Résultats NPP microplaques</u>	<u>Nb puits positifs</u>	<u>NPP pour 100 ml d'eau</u>
<u><i>Escherichia coli</i></u>		
<u>Entérocoques intestinaux</u>		

Milieux de culture utilisés :

<u>Milieux utilisés</u>	<u>N° d'autoclavage</u>
<u>DSM 9 ml</u>	
<u>DSM 18 ml</u>	
<u>Eau déminéralisée stérile</u>	
<u>Microplaque <i>E.coli</i></u>	
<u>Microplaque Entérocoques</u>	

ANNEXE III:

COURBE DE CONDUCTANCE TRADUISANT DES TEMPS DE
DETECTION VALIDE.



ANNEXE IV :

COURBE DE CONDUCTANCE TRADUISANT DES TEMPS DE
DETECTION NON VALIDE.

