

Adaptation d'une technique en milieu gélosé au contrôle bactériologique des coquillages

*A one plate agar method
for bacteriological examination of shellfish*

Alain Plusquellec * **, S. Corre ***, E. Jacq ***, M. Beucher *, Y. Legal **

*Institut universitaire de technologie, 29334 Quimper, France.

**Laboratoire de biologie marine, Collège de France, 29900 Concarneau, France.

***Micromer, rue Charles Cadiou, ZI du Vernis, 29200 Brest, France.

Mots clés : bivalves, coquillages, contrôle bactériologique, coliformes thermotolérants, milieu gélosé, NPP.

Key-words: bivalve shellfish, bacteriological examination, fecal coliforms, pour plate method, MPN.

RÉSUMÉ

Plusquellec A., S. Corre, E. Jacq, M. Beucher, Y. Legal, 1995 - Adaptation d'une technique en milieu gélosé au contrôle bactériologique des coquillages. Mar. Life, 5 (2) : 11 - 20.

Le contrôle bactériologique des coquillages repose essentiellement sur le dénombrement des coliformes thermotolérants dans 100 grammes de contenu de bivalve (chair et liquide intervalvaire). La technique dite des tubes multiples ou du nombre plus probable (NPP) est le plus souvent retenue. Cette estimation pose cependant beaucoup de problèmes. La présente étude a pour objet de tester une technique d'ensemencement en milieu gélosé pour ce contrôle. Dans cette technique, l'ensemencement d'un volume important, nécessaire pour répondre au critère réglementaire est rendu possible par l'utilisation d'homogénat filtré et de boîtes de Pétri de grande taille. Deux milieux gélosés ont été testés : la gélose MFC et la gélose VRBL. L'estimation obtenue en gélose n'est pas significativement différente du dénombrement par NPP, toutefois un essai de répétabilité montre que la variabilité est plus faible en gélose (2,4%) que par NPP (7,0%). La gamme de comptage possible par l'ensemencement d'une seule boîte est plus large que celle que permet une technique NPP limitée à trois dilutions décimales. Les deux milieux gélosés ont fourni des résultats identiques. Une pré-incubation de ces milieux à 37°C ne modifie pas le résultat. Ces données soulignent l'intérêt de l'ensemencement en gélose par rapport à une technique NPP à trois tubes par dilution.

ABSTRACT

Plusquellec A., S. Corre, E. Jacq, M. Beucher, Y. Legal, 1995 - [A one plate agar method for bacteriological examination of shellfish]. Mar. Life, 5 (2) : 11 - 20.

Bacteriological examination of bivalve shellfish is generally based upon the enumeration of fecal coliforms in bivalve. Most probable number (MPN) methods are most often used for this, in spite of the limitations of this technique. The aim of the present study was to assess the value of an agar method in shellfish bacteriological examination. Inoculation of large volumes was possible by the use of a pre-filtered suspension in a large Petri dish. Two agar media were compared: MFC agar and VRBL agar. No significant difference was observed between agar enumeration and MPN counts. In addition, repeatability assay showed greater accuracy by the agar method than by the MPN technique. The range for counts is wider by a one-plate inoculation than by a three decimal dilutions MPN method. No difference was observed between the two selective agar media. A pre-incubation at 37°C did not influence the agar counts. All these data clearly emphasize the many advantages of the agar method in comparison with a three tube MPN method.

INTRODUCTION

Les coquillages, et particulièrement les bivalves marins, sont souvent cités comme aliments dont la consommation expose à des risques sanitaires (Rippey, 1991 ; Plusquellec, 1992). L'évaluation de ce risque n'est pas simple (Lesne, Vial, 1992). On peut dire, cependant, qu'il est lié à certaines particularités de la biologie, de la production et de la consommation de ces bivalves (Prieur *et al.*, 1990).

Le contrôle bactériologique des coquillages porte essentiellement sur l'évaluation des flores indicatrices de contamination fécale. La qualité des zones de production conchylicole est établie à partir de la concentration en bactéries test : coliformes thermotolérants, *Escherichia coli*.

Ce contrôle préventif ne permet donc d'estimer que les risques liés à des pathogènes intestinaux, mais même pour ceux-ci la relation entre pathogènes et indicateurs peut être médiocre. Cette relation est mauvaise dans le cas des virus (Cole *et al.*, 1986), et ceci a été démontré aussi pour des pathogènes bactériens proches des indicateurs (Fraiser, Koburger, 1984).

Malgré ses lacunes, il apparaît, cependant, que la surveillance bactériologique des eaux conchylicoles a un effet très positif sur la salubrité des coquillages du marché (Anon., 1992) et ceci peut expliquer la faible incidence des bivalves dans les pathologies alimentaires (Plusquellec, 1991).

Selon les pays, la surveillance des eaux conchylicoles est réalisée soit sur les eaux elles-mêmes, soit sur les coquillages de gisement ou de culture. La concentration en bactéries témoins est établie pour 100 ml d'eau ou 100 g de contenu de bivalve, et la qualité bactériologique est estimée par rapport à des critères réglementaires (Poggi, 1992).

Le critère de base retenu par l'Union européenne est de 300 coliformes thermotolérants pour 100 g de contenu de bivalve (Anon., 1991). En France, c'est aussi cette valeur qui sert de base pour l'analyse bactériologique au stade de la consommation selon un plan à trois classes (Anon., 1980).

Cette valeur de référence est faible et l'analyse bactériologique nécessite, de ce fait, la mise en oeuvre d'une méthode sensible, capable de détecter de faibles niveaux de contamination. C'est cette exigence qui justifie le choix quasi-général de la technique de dénombrement par ensemencements de tubes multiples (technique du nombre plus probable = NPP ; West, 1989).

Cette technique permet, en effet, l'ensemencement de volumes importants de broyats de bivalve. La norme V45-110 (AFNOR, 1981) prévoit l'ensemencement de 10 ml de broyat, puis de ses dilutions décimales.

Cette technique NPP est cependant non satisfaisante à plusieurs points de vue :

- c'est une méthode laborieuse et encombrante qui nécessite la mise en oeuvre de nombreux tubes ;

- la réponse est tardive : 48 heures pour les coliformes totaux, 72 heures pour les coliformes thermotolérants après deux étapes successives ;

- l'estimation obtenue par NPP est peu précise si on se limite, comme l'indique la norme AFNOR 45110, à l'ensemencement de trois tubes par dilution. La table de De Man (De Man, 1983) qui fournit les intervalles de confiance à 95 %, illustre cette imprécision ;

- le nombre de combinaisons probables résultant de ce protocole est limité et la distribution des résultats d'analyse ne correspond pas, en fait, à une variable continue, mais à une variable discrète (Beliaeff, 1992).

Pour ces raisons, d'autres méthodes d'analyse ont été proposées pour le contrôle bactériologique des coquillages. Le dénombrement des indicateurs par inclusion en milieu gélosé a été recommandé par plusieurs auteurs (Al Jebouri, Trollope, 1984). Dans leurs expérimentations sur la contamination et la décontamination des bivalves, Cabelli, Heffernan (1970) ont utilisé l'inclusion du broyat d'un bivalve entier en gélose de Mac Conkey.

La limite des techniques d'ensemencement en gélose tient au faible volume de broyat qu'il est possible d'inclure compte tenu de la texture d'un broyat de bivalve au 1/3. Ce faible volume est peu compatible avec le critère en vigueur qui impose logiquement d'ensemencer plusieurs grammes de contenu de bivalve.

La présente étude a pour objectif de tester la possibilité d'adapter cette technique d'inclusion en milieu gélosé en utilisant deux aménagements par rapport aux techniques classiques :

- la préparation de suspension-mère de coquillages au moyen d'un homogénéisateur de type Stomacher en utilisant un sachet muni d'un filtre qui permet d'obtenir une suspension filtrée relativement claire (Konuma *et al.*, 1982)

- l'ensemencement d'un volume important de cette suspension-mère en utilisant des boîtes de Petri de forte contenance qui permettent l'inclusion de plusieurs grammes de contenu de bivalve.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Cette étude a été conduite sur des échantillons de moules naturellement contaminées. Tous les échantillons ont une origine différente : ils proviennent, soit du marché, soit de la récolte sur des gisements naturels. Le protocole expérimental de cette étude comparative est schématisé dans la figure 1.

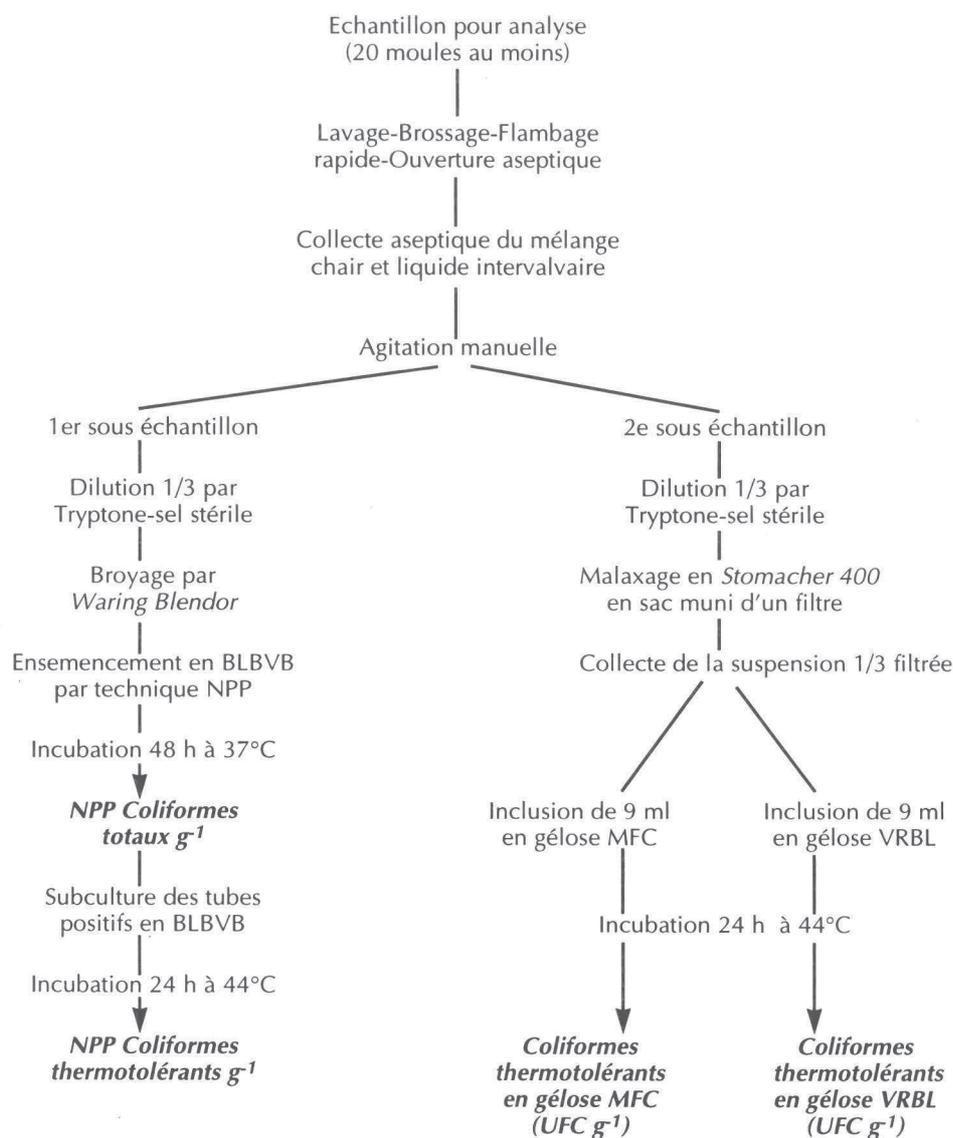


Figure 1- Schéma récapitulatif de l'étude comparative. / Summary scheme for the comparative study.

Préparation des échantillons

Un échantillon est constitué de 20 bivalves au moins. Les moules sont brossées et lavées, puis ouvertes aseptiquement après bref flambage de la coquille. Le contenu des bivalves (chair et liquide intervalvaire) est recueilli dans un flacon stérile. Il est soumis à une vigoureuse agitation manuelle, puis réparti approximativement en deux sous-échantillons équivalents. Chacun de ces sous-échantillons est additionné de solution tryptone-sel stérile pour obtenir une dilution 1/3 (v/v).

Le premier sous-échantillon est transféré dans un pot stérile et soumis à un broyage dans un broyeur de type *Waring blender* pendant 30 secondes, selon les recommandations AFNOR. Ce sous-échantillon sera analysé ensuite par la tech-

nique NPP et correspond donc à la méthode conventionnelle d'analyse des coquillages vivants.

Le second sous-échantillon est introduit dans un sac de polyéthylène séparé en deux compartiments par un filtre de cellulose. Après une minute de malaxage dans l'appareil *Stomacher 400*, la suspension filtrée est recueillie dans le plus petit compartiment. Cette suspension sera utilisée pour le dénombrement par inclusion en gélose.

Analyse bactériologique

Les deux sous-échantillons précédents sont considérés comme appariés et analysés, d'une part par la technique de référence : méthode NPP après broyage au *Waring-blendor*, d'autre part par inclusion en gélose après malaxage au *Stomacher*.

– Technique des tubes multiples (NPP)

La technique utilisée est dérivée de la technique AFNOR 45110. Cette technique comporte deux étapes et utilise le Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant avec cloche (BLBVB-BIOKAR Diagnostics BK 002). Un aménagement très généralement pratiqué dans les laboratoires de contrôle conchylicole a été appliqué ici :

–ensemencement de 5 ml de suspension-mère au 1/3 dans trois tubes de 10 ml de BLBVB (milieu préparé à la concentration 1,5 pour tenir compte du volume ensemencé) ;

–ensemencement de 5 ml d'une dilution au 1/10^e de la suspension-mère dans trois tubes de 10 ml de BLBVB(x1,5) ;

–ensemencement de 5 ml d'une dilution au 1/100^e de la suspension-mère dans trois tubes de 10 ml de BLBVB(x1,5).

Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les tubes positifs (avec gaz) font l'objet d'une subculture sur un nouveau milieu BLBVB qui est incubé cette fois au bain thermostaté à 44°C. Après 24 heures, les tubes positifs (gaz positifs) sont comptés et permettent d'obtenir le NPP de coliformes thermotolérants.

Ce résultat comme celui des dénombrements en gélose est rapporté à 100 g de contenu de bivalve.

– Technique d'inclusion en gélose

Cette technique est basée sur l'ensemencement en double couche dans une seule boîte de Pétri de 140 mm de diamètre. 9 ml de suspension préfiltrée sont introduits en fond de boîte. Cet inoculum correspond donc à 3 grammes de contenu de bivalve. 50 ml de milieu gélosé en surfusion sont coulés aussitôt et le mélange est homogénéisé manuellement. Après gélification du milieu, une deuxième couche de gélose est coulée en surface. Deux milieux ont été testés en parallèle :

– la gélose MFC (Membrane Fecal Coliforms-BBL 11365). Ce milieu a été utilisé sans acide rosolique (Le Chevallier *et al.*, 1984).

– la gélose VRBL (Violet Red Bile Lactose-Merck 1406) d'usage général en bactériologie alimentaire.

Ces milieux ont été incubés à 44°C et après 24 heures, les colonies caractéristiques ont été dénombrées (colonies bleu franc en gélose MFC, colonies rouge violacé en gélose VRBL).

Le résultat est exprimé en nombre d'unités formant colonie (UFC) pour 100ml de coquillage (N_{MFC} et N_{VRBL}).

Vingt essais ont été réalisés en double sur gélose MFC pour tester l'influence d'une pré-incubation de deux heures à 37°C avant l'incubation à 44°C.

Estimation de la répétabilité

Des répétitions d'analyse sur un même lot de moules ont été réalisées pour tester la répétabilité de chacune des techniques.

700 ml de contenu de moules ont été recueillis puis répartis en 24 fractions après mélange manuel vigoureux. Douze de ces fractions ont été broyées au *Waring blender* et analysées par la technique NPP, les 12 autres ont été homogénéisées au *Stomacher* et analysées par la méthode d'inclusion en gélose MFC.

Influence de la filtration

Konuma *et al.* (1982) avaient montré que les résultats quantitatifs obtenus par le sac *Stomacher* modifié et le sac *Stomacher* sans filtre étaient absolument équivalents. Nous avons tenté de vérifier ceci dans le cas des moules ; pour cela, des duplicats ont été réalisés, d'une part à partir du compartiment filtré, d'autre part à partir du compartiment sans filtration. Cet essai limité a été réalisé sur 12 prélèvements avec ensemencement des duplicats, soit en MFC, soit en VRBL.

Analyse statistique des résultats

Les deux techniques mises en oeuvre (inclusion et NPP) ont été comparées, d'une part par une étude de régression, d'autre part par un test de comparaison de moyenne dans le cas d'échantillons appariés (test t de Student).

La répétabilité a été estimée par le coefficient de variation. La différence de variabilité entre les méthodes a été estimée par la comparaison des variances d'échantillons similaires.

RÉSULTATS

Comparaison des deux milieux gélosés

Le dénombrement des colonies caractéristiques en milieu gélosé a été aisé pour la plupart des échantillons. Les interférences entre colonies et débris alimentaires qui sont souvent observées pour les broyats non filtrés, n'apparaissent pas ici dans le cas de suspensions de moules filtrées. Pour quelques échantillons fortement contaminés, le comptage des colonies s'est avéré impossible (indifféremment pour les deux milieux). Ces échantillons n'ont donc permis qu'une estimation par défaut.

Le comptage sur les milieux MFC et VRBL a été possible sur 45 des 50 couples d'échantillons testés.

Pour chaque échantillon la différence ($\log N_{MFC} - \log N_{VRBL}$) a été calculée. La moyenne des différences obtenues sur l'ensemble des échantillons n'est pas significativement différente de zéro ($p > 0,05$), et ne permet donc pas de conclure à une différence entre ces deux milieux.

Une étude de régression permet d'analyser plus finement la relation entre ces deux séries de comptages (figure 2).

La régression est hautement significative. L'équivalence entre les deux méthodes suppose une relation du type $Y=X$, la relation obtenue ici est :

$$\log N_{MFC} = 0,89 \log N_{VRBL} + 0,32$$

Les écarts types sur la pente et l'ordonnée à l'origine sont respectivement de 0,06 et 0,17 et permettent de conclure que la pente de la droite ne diffère pas significativement de 1, et que l'ordonnée à l'origine ne diffère pas significativement de 0 ($p > 0,05$).

Cette bonne correspondance entre les deux milieux gélosés testés permet donc de considérer les ensemencements en gélose MFC et gélose VRBL à partir d'un même échantillon comme des répliquats.

Par conséquent, pour la comparaison qui suit, entre milieu gélosé et technique NPP, la moyenne géométrique entre le dénombrement MFC

et le dénombrement VRBL a été calculée. Cette moyenne sera comparée au résultat NPP.

Comparaison entre technique NPP et inclusion en gélose

Les résultats d'analyse en milieu liquide ont donc été comparés aux résultats moyens obtenus sur les deux milieux gélosés selon le même protocole que pour la comparaison entre milieux gélosés.

La gamme de dilution choisie pour la technique NPP s'est révélée insuffisante dans de nombreux cas. Les échantillons fortement contaminés ont fourni une réponse positive pour tous les tubes ensemencés et ceci ne permet donc qu'une estimation par défaut (> 6600 pour 100ml). La comparaison des deux méthodes a donc porté sur 33 paires de résultats.

La moyenne des différences ($\log NPP - \log$ gélose) a été calculée. La moyenne des différences

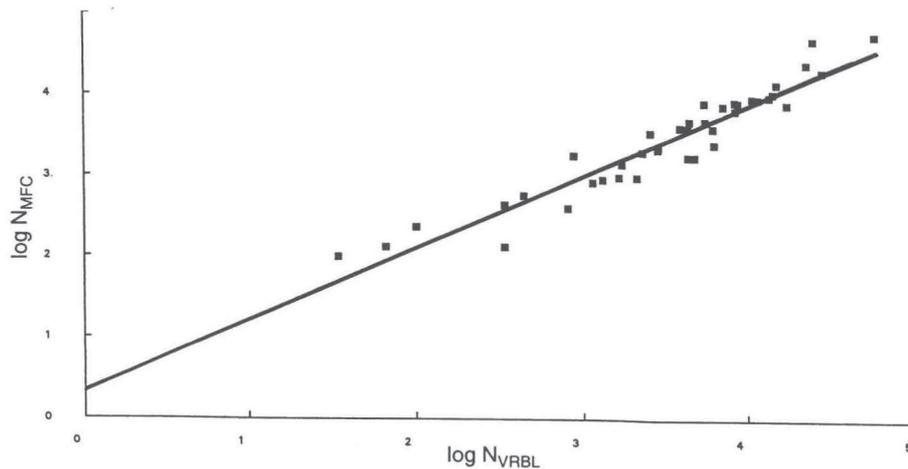


Figure 2 - Comparaison des géloses MFC et VRBL : N=Nombre de coliformes thermotolérants pour 100 ml de contenu de bivalve. / Comparison of MFC agar and VRBL agar (regression study): N=enumeration of fecal coliforms in bivalve (100 ml).

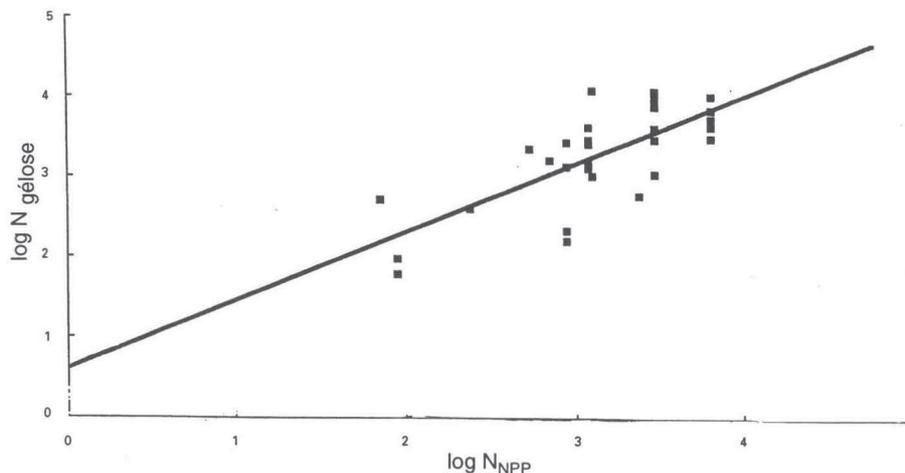


Figure 3 - Comparaison des résultats obtenus par technique NPP et par technique en gélose : N= Nombre de coliformes thermotolérants pour 100ml de contenu de bivalve. / Comparison of MPN results and agar counts (regression study): N=enumeration of fecal coliforms in bivalve (100 ml).

obtenues sur l'ensemble des échantillons n'est pas significativement différente de zéro ($p > 0,05$), et ne permet donc pas de conclure à une différence entre ces deux techniques.

La régression log gélose/log NPP est représentée sur la figure 3 ; cette régression est hautement significative. La relation entre les deux méthodes est donnée par l'équation:

$$\log N_{\text{gélose}} = 0,84 \log N_{\text{NPP}} + 0,60$$

La pente et l'ordonnée à l'origine ont été comparées respectivement à 1 et 0 et les valeurs de t obtenues sont non significatives ($p > 0,05$).

Un résultat identique a été obtenu en comparant séparément la technique NPP à chacun des deux milieux gélosés.

Tous ces éléments corroborent donc l'hypothèse d'équivalence des deux techniques, dans la limite de l'échantillonnage réalisé.

Répétabilité des méthodes

Les répétitions de 12 analyses identiques réalisées, d'une part par la technique NPP, d'autre part par la technique d'inclusion en MFC permettent d'établir pour chaque méthode une variabilité que l'on peut estimer par la variance ou le coefficient de variation. Ces valeurs et la distribution des résultats obtenus sont représentées sur la figure 4.

Les variances des deux méthodes diffèrent (test F de Fisher $p < 0,01$) : la variance obtenue par la technique NPP est très significativement supérieure à celle de la technique en milieu gélosé. L'examen des coefficients de variation confirme cette observation (7,07% pour la méthode NPP, 2,44% pour la méthode en gélose).

Influence d'une pré-incubation à 37°C

Pour 20 échantillons, l'ensemencement en gélose MFC a été réalisé en double. Une des boîtes

a été portée directement à 44°C, l'autre boîte a été incubée pendant 2 heures à 37°C avant d'être portée à 44°C. Des résultats interprétables ont été obtenus pour 17 couples de valeurs, et la moyenne des différences a été calculée ($d = 0,045$; écart type = 0,11). Le test t appliqué à ces valeurs indique que la moyenne des différences ne diffère pas significativement de zéro ($p > 0,05$). Une pré-incubation de deux heures à 37°C apparaît donc ici sans incidence sur le comptage final.

Influence de la filtration

Les différences entre le dénombrement avec filtration (F) et sans filtration (NF) ont été calculées, la moyenne des différences ($\log F - \log NF$) est significativement supérieure à zéro. A partir de cet essai limité, on observe donc que les résultats obtenus à partir de la suspension filtrée sont supérieurs à ceux qu'on obtient sans filtration. Ceci est explicable en grande partie par les difficultés rencontrées pour le comptage des colonies à partir de suspension non filtrée.

DISCUSSION

Avant de commenter ces résultats, il convient de souligner la difficulté que l'on rencontre lorsque l'on veut évaluer une technique par rapport à une méthode de référence, qui elle-même, est jugée défectueuse.

La présente étude souligne nettement ces insuffisances de la technique NPP. L'utilisation de cette gamme d'ensemencement en 9 tubes aboutit à un nombre très limité de combinaisons probables (14 selon De Man, 1983), la distribution des résultats n'est pas continue. Ce regroupement des valeurs apparaît nettement sur l'étude de régression gélose-NPP (figure 3), et limite considérablement la portée de cette comparaison. Il est net également dans la

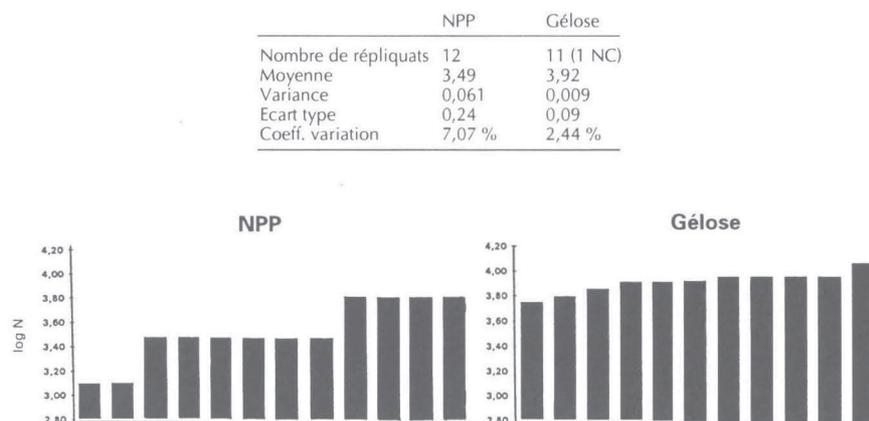


Figure 4- Distribution des valeurs du test de répétabilité : N= Nombre de coliformes thermotolérants pour 100ml de contenu de bivalve. / Repeatability of MPN and agar techniques (distribution of results).

distribution des valeurs obtenues pour le test de répétabilité (figure 4). Cette gêne apparaît également dans des études comparatives du même type comme par exemple l'évaluation d'une méthode nouvelle par rapport à la méthode NPP (Dupont *et al.*, 1994). Elle apparaît encore dans les études de relation entre fréquence de pathogènes et classes de contamination en indicateurs (Plusquellec, 1991).

Ce nombre limité de valeurs probables aurait pu avoir une incidence favorable sur la répétabilité des mesures à partir d'un même lot de bivalves. Ce n'est pas ce qui ressort de l'étude de répétabilité réalisée ici. La variance obtenue pour les ensemencements en gélose est faible, surtout si l'on considère que l'échantillon de moules est constitué de moules de même origine, mais sommairement homogénéisé avant la répartition et justifiant de ce fait une variance liée à la prise d'échantillon. Cette variance en milieu gélosé est significativement inférieure à celle que l'on obtient par la technique NPP. La technique en milieu gélosé présentée ici (limitée à l'ensemencement d'une seule boîte) offre donc une précision supérieure à la méthode NPP avec trois tubes par dilution.

Cette précision des mesures, de même que la nécessité d'obtenir une variable continue, sont des éléments déterminants, en particulier lors d'études quantitatives sur l'évolution des bactéries dans les coquillages qui nécessitent de suivre des variations faibles et de les interpréter statistiquement (Corre *et al.*, 1991; Beucher, 1993).

Outre ces notions de continuité et de précision de la mesure, il était important de savoir si les estimations en milieu gélosé et en milieu liquide différaient. En effet, il a souvent été avancé que l'utilisation de milieux sélectifs gélosés incubés à hautes températures pour le dénombrement des coliformes thermotolérants conduit à une sous-estimation par rapport à la méthode en milieu liquide où est réalisée une étape préliminaire à 37°C. Les techniques NPP seraient donc mieux adaptées pour le recouvrement des indicateurs ayant subi des stress divers (West, Coleman, 1986; Delattre, 1988).

Cette sous-estimation en milieu gélosé n'apparaît pas du tout dans notre étude. Au contraire, les dénombrements en gélose fournissent des valeurs supérieures à ceux des milieux liquides (bien que la différence soit non significative). Cette inaptitude à cultiver en milieu gélosé sélectif ne ressort donc ici, ni dans l'étude comparée gélose-NPP, ni dans le test de répétabilité, bien que les coquillages marins puissent être considérés a priori comme un milieu où les coliformes thermotolérants ont subi un réel stress (Gauthier *et al.*, 1993). Le recouvrement des bactéries ayant subi un stress est possible aussi en milieu gélosé; Hackney *et al.* (1979) obtiennent un meilleur recouvrement par leur technique en gélose que par la technique NPP standard.

La filtration de l'échantillon a pu être évoquée aussi comme une cause possible de sous-esti-

mation par perte de bactéries (Grabow *et al.*, 1991). Notre étude conduit à une conclusion opposée : les dénombrements apparaissent plus élevés dans l'échantillon filtré.

Dans la méthode en milieu gélosé, une pré-incubation à 37°C pendant deux heures n'aboutit pas à des dénombrements plus élevés que l'incubation directe à 44°C. Cette observation confirme celle de Yoovidhya et Fleet (1981) qui n'avaient pas obtenu un meilleur recouvrement d'*E. coli* dans les huîtres après une revivification à 37°C.

L'utilisation de la technique NPP est souvent justifiée par la sensibilité de la méthode qui permet de détecter des contaminations faibles par l'ensemencement de volumes importants. Dans le cas précis du protocole décrit ici, le dénombrement est possible entre 24 coliformes thermotolérants pour 100 g (un seul tube positif) et > 6600 pour 100 g (tous les tubes positifs). On peut comparer les limites de détection de la technique d'inclusion en gélose décrite ici à ces deux seuils.

Sur les boîtes de 140 mm de diamètre, le comptage a été possible jusqu'à environ 1000 colonies. Si on considère que 5 colonies constituent un nombre minimal pour une estimation satisfaisante, les limites inférieure et supérieure de dénombrement par cette méthode en une seule boîte sont respectivement de $1,7 \cdot 10^2$ pour 100 g et $3,3 \cdot 10^4$ pour 100 g. L'amplitude de la zone de comptage est donc du même ordre que celle de la technique NPP, et inclut les valeurs seuils utiles pour l'interprétation selon le plan à trois classes. L'ensemencement de 0,1 ml de suspension filtrée (en boîte de Pétri de diamètre 90 mm) constituerait un complément intéressant au protocole en milieu gélosé présenté plus haut. La limite supérieure de détection se trouverait repoussée à $6 \cdot 10^5$ coliformes thermotolérants pour 100 g, et donc au-delà du seuil de $6 \cdot 10^4$ coliformes thermotolérants pour 100 g, retenu dans le classement des zones conchylicoles.

Pour les comptages portant sur des faibles nombres de colonies, on peut admettre selon les recommandations de l'ISO que le dénombrement peut s'exprimer sous forme de nombres estimés. La norme ISO 4832 (AFNOR, 1991) fournit les limites de confiance au seuil de 5 % pour ces petits nombres. On remarque que même pour ces faibles comptages la précision est supérieure à celle de la méthode NPP.

CONCLUSION

L'intérêt d'une technique d'ensemencement en gélose par rapport à une technique NPP à trois tubes par dilution et trois dilutions successives apparaît clairement ici.

L'utilisation de suspension-mère filtrée permet un comptage aisé des colonies sans interférence avec des débris de tissu. Elle permet aussi l'ensemencement d'un volume important et rend donc

possible le dénombrement en-deçà du seuil réglementaire de 300 coliformes thermotolérants pour 100 g.

L'estimation obtenue ne diffère pas globalement de l'estimation par NPP. Elle offre en outre une précision supérieure et pour une gamme de comptage plus large.

Le résultat obtenu provient d'un comptage direct de colonies. La distribution est donc continue.

Aux qualités précédentes viennent s'ajouter des avantages pratiques non négligeables :

- facilité de mise en oeuvre (ensemencement d'une seule boîte),
- faible coût lié à cet ensemencement unique,
- délai de lecture court (24 heures au lieu de 72 heures pour la méthode NPP),
- possibilité de confirmer directement les colonies suspectes sans passer par une étape d'isolement.

- adaptation aisée aux nouveaux milieux de culture gélosés, et en particulier aux milieux récemment apparus, permettant le dénombrement sélectif d'*E. coli* par l'intermédiaire de la β glucuronidase.

L'obtention d'homogénats pré-filtrés est de manière plus générale un apport intéressant dans les techniques indirectes de détection bactérienne (impédancemétrie, technique PCR...) dans lesquelles le matériel vivant non bactérien peut provoquer des interférences néfastes.

Cette approche expérimentale a permis de démontrer l'intérêt d'une étude plus complète qui portera à la fois sur les milieux gélosés traditionnels pour le dénombrement des coliformes thermotolérants et les milieux nouveaux, en mettant en oeuvre plusieurs espèces de coquillages.

BIBLIOGRAPHIE

- Al Jebouri M.M., D.R. Trollope, 1984 - Indicator bacteria in freshwater and marine molluscs. *Hydrobiologia*, **111** : 93-102.
- AFNOR, Norme V 45-110, juin 1981 - Dénombrement des coliformes fécaux dans les eaux conchylicoles et dans les coquillages marins vivants.
- AFNOR, Norme ISO 4832, juillet 1991 - Directives générales pour le dénombrement des coliformes. Méthode par comptage des colonies.
- Anon., 1980 - Critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale - Arrêté du 21-12-1979. *Journal officiel de la République française*, 19 janvier 1980.
- Anon., 1991 - Directive européenne du 15 Juillet 1991 - Règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants. *Journal officiel des Communautés européennes* : 14.
- Anon., 1992 - Microbiological criteria for molluscan shellfish. *J. Food Prot.*, **55** (6) : 463-480.
- Beliaeff B., 1992 - *Contributions méthodologiques à un réseau de surveillance bactériologique de l'environnement marin littoral*. Thèse de doctorat de l'Université Paris VII (Biomathématiques).
- Beucher M., 1993 - *Etude de l'accumulation, de la rétention, et du relargage de bactéries entériques par l'huître Crassostrea gigas*. Diplôme Ecole Pratique des Hautes Etudes - Paris - 92 pp.
- Cabelli V.J., W.P. Heffernan, 1970 - Accumulation of *Escherichia coli* by the Northern Quahaug. *Appl. Microbiol.*, **19** (2) : 239-244.
- Cole M.T., M.B. Kilgen, L.A. Reily, C.R. Hackney, 1986 - Detection of enteroviruses and pathogens indicators in Louisiana oysters and their overlaying waters. *J. Food Prot.*, **49** (8) : 596-601.
- Corre S., E. Jacq, A. Plusquellec, M. Beucher, D. Prieur, 1991 - Fecal coliform accumulation and depuration in the oyster *Crassostrea gigas*. *Kieler Meeresforsch.*, **8** : 303-308.
- Delattre J.M., 1988 - Indicateurs fécaux et stress en milieu marin : étude des variations à court terme. *Oceanis*, **14** (1) : 89-95
- De Man J. C., 1983 - MPN tables, corrected. *Eur. J. appl. Microbiol.*, **17** : 301-305.
- Dupont J., D. Menard, C. Hervé, B. Minier, 1994 - Analytical procedure for use of conductance measurement to estimate *Escherichia coli* in shellfish. *J. appl. Bact.*, **77** : 296-302.
- Fraiser M.B., J.A. Koburger, 1984 - Incidence of *Salmonella* in clams, oysters, crabs and mullet. *J. Food Prot.*, **47** (5) : 343-345.
- Grabow W.O.K., J. C. De Villiers, N. Prinsloo, 1991 - An assessment of methods for the microbiological analysis of shellfish. *Water Sci. Technol.*, **24** (2) : 413-416.
- Gauthier M. J., P.M. Munro, G.N. Flatau, R.L. Clément, V.A. Breittmayer, 1993 - Nouvelles perspectives sur l'adaptation des Entérobactéries dans le milieu marin. *Mar. Life*, **3** (1-2) : 1-18.
- Hackney C.R., B. Ray, M.L. Speck, 1979 - Repair detection procedure for enumeration of fecal coliforms and Enterococci from seafoods and marine environments. *Appl. environ. Microbiol.*, **37** (5) : 947-953.
- Konuma K., A. Suzuki, H. Kuruta, 1982 - Improved Stomacher 400 bag applicable to the spiral plate system for counting bacteria. *Appl. environ. Microbiol.*, **44** (1) : 765-769.
- Le Chevallier M.W., P.E. Jakanoski, A.K. Camper, G.A. Mc Feters, 1984 - Evaluation of m-T7 agar as a fecal coliform medium. *Appl. environ. Microbiol.*, **48** (2) : 371-375.
- Lesne J., J. Vial, 1992 - Risque et prévention. In : *Coquillages et santé publique-Du risque à la prévention*. ENSP Editeur, pp : 125-150.
- Plusquellec A., 1991 - *Salmonella* et bivalves marins. Contrat IFREMER N° 90 5 580233.
- Plusquellec A., 1992 - La contamination bactérienne des coquillages. In : *Coquillages et santé publique-Du risque à la prévention*. ENSP Editeur, pp : 51-78.
- Poggi R., 1992 - La préparation des coquillages à la vente. Les aspects technologiques et réglementaires. In : *Coquillages et santé publique-Du risque à la prévention*. ENSP Editeur, pp : 247-286.
- Prieur D., G. Mevel, J.L. Nicolas, A. Plusquellec, M. Vigneulle, 1990. - Interactions between bivalve molluscs and bacteria in the marine environment. *Oceanogr. mar. Biol. a. Rev.*, **28** : 277-352.
- Rippey S.R., 1991. - *Shellfish borne disease outbreaks*. US Shellfish Sanitation Program, techn. rep.

West P.A., 1989 - Human pathogens and public health indicator organisms in shellfish. In : *Methods for the microbiological examination of fish and shellfish*. B. Austin, D.A Austin (eds.) Ellis Horwood Ltd Chichester. J. Willey & Sons., pp : 273-308.

West P.A., M.R. Coleman, 1986 - A tentative national reference procedure for isolation and enumeration of *Escherichia coli* from bivalve molluscan shellfish by most probable number method. *J. appl. Bact.*, **61** : 505-516.

Yoovidhya T., G.H. Fleet, 1981 - An evaluation of the A1 most probable number and the Anderson and Baird Parker plate count methods for enumerating *Escherichia coli* in the Sydney rock oyster *Crassostrea commercialis*. *J. appl. Bact.*, **50** : 519-528.

Reçu en octobre 1995 ; accepté en septembre 1996.
Received October 1995; accepted September 1996.