

PROGRAMME DE RECHERCHE SUR L'ENVIRONNEMENT MARIN
NORD/PAS-DE-CALAIS

ANNEE 1982

POLLUTION BACTERIENNE DES MOULES ET DES COQUES
SUR LE LITTORAL DU NORD/PAS-DE-CALAIS

AVRIL 1983

I.S.T.P.M.
Inspection Régionale
150, quai Gambetta
62200 BOULOGNE-SUR-MER

POLLUTION BACTERIENNE DES MOULES ET DES COQUES
SUR LE LITTORAL DU NORD/PAS-DE-CALAIS

Etude et rapport réalisés par le
Laboratoire de l'Inspection Régionale
I.S.T.P.M.
150, quai Gambetta
62200 BOULOGNE-SUR-MER

Responsable du projet : M. MOREL

I.S.T.P.M. Boulogne/Mer
AVRIL 1983

S O M M A I R E

	Pages
- INTRODUCTION	1
- PRELEVEMENTS	2
- ANALYSES	2
- RESULTATS et COMMENTAIRES	17
- CONCLUSIONS	23
- ANNEXES	24

I N T R O D U C T I O N

La présente étude a été réalisée par l'Inspection Régionale de l'Institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (I.S.T.P.M.) à Boulogne-sur-Mer. Elle entre dans le cadre du programme quinquennal de recherche sur l'environnement littoral Nord/Pas-de-Calais. Son financement a été assuré en partie par l'Etablissement Public Régional du Nord/Pas-de-Calais (marché d'étude n° 82-021).

Le programme de cette étude consiste à déterminer l'état de pollution du littoral de Dunkerque à Ault en faisant un inventaire de la contamination bactérienne des mollusques. Ainsi, 33 stations de prélèvements ont été choisies en tenant compte de la proximité des zones de concentrations urbaines et des estuaires, mais également de l'importance des sites coquilliers et de l'exploitation commerciale qui en est faite. -

La moule (Mytilus edulis), organisme bioaccumulateur, devait être considérée comme le principal témoin de la pollution bactérienne ; cependant, dans 5 stations, nous avons dû la remplacer par la coque (Cardium edule), seul coquillage alors présent en quantité assez importante.

Les nombres de coliformes totaux et fécaux, de streptocoques fécaux et plus accessoirement de salmonelles présents dans les coquillages sont les 4 paramètres analysés dans cette étude. Ils sont considérés comme les germes tests de la contamination fécale.

Un inventaire de la contamination chimique des mollusques est également réalisé dans le même temps par l'Institut Pasteur de Lille. La plupart des stations retenues dans cette étude recoupent les nôtres, complétant ainsi la connaissance de l'état de pollution chimique et bactériologique de la région.

P R E L E V E M E N T S

Les prélèvements de coquillages ont été généralement effectués sur chaque site, à la fréquence d'un par mois, d'avril 82 à mars 83. Ils ont été faits à pied, à marée basse et sur des lots de coquillages présentant une homogénéité de taille (3 à 5 cm pour les moules, 2 à 3 cm pour les coques).

Les stations ont été repérées par un numéro, de 1 à 33, sur les cartes ci-jointes (fig. 1 a jusqu'à j). Une station en eau profonde devait également être retenue comme témoin, mais nous n'avons pas pu obtenir de coquillages en provenance d'une telle zone.

A N A L Y S E S

Les analyses ont été effectuées par le laboratoire I.S.T.P.M. de l'Inspection de Boulogne-sur-Mer en ce qui concerne les prélèvements numérotés de 1 à 17, par le laboratoire I.S.T.P.M. de Le Crotoy pour les prélèvements 28 à 33.

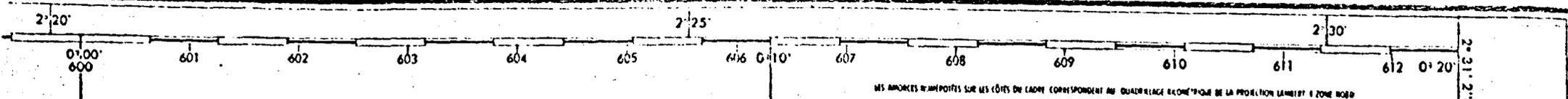
Les échantillons ont été analysés au maximum dans les 4 heures qui suivent leur prélèvement.

I - Dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux.

Le dénombrement des coliformes fécaux (et également celui des coliformes totaux) s'effectue selon la norme française homologuée NF V 45-110 de juin 1981 qui est reprise intégralement en annexe 1.

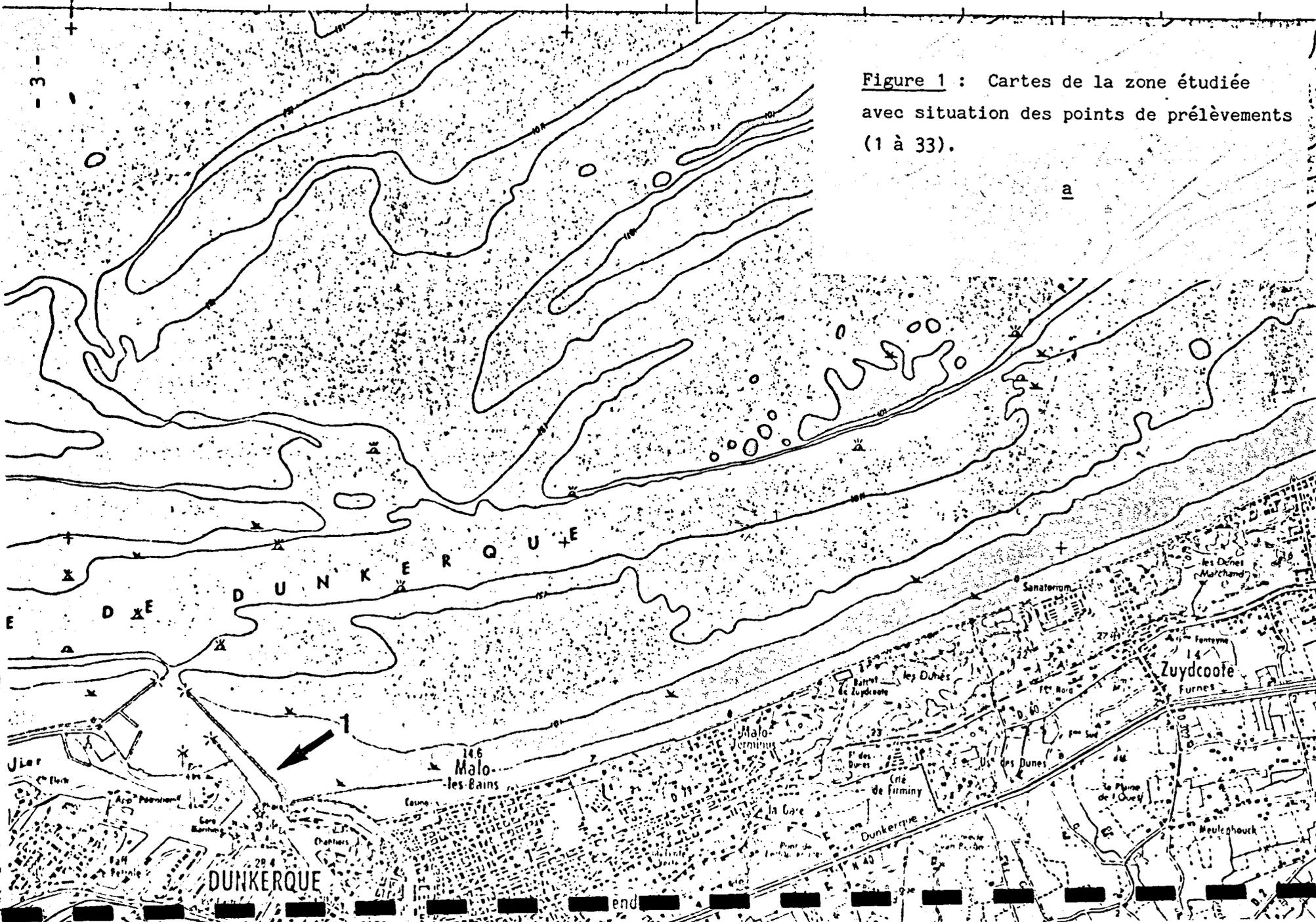
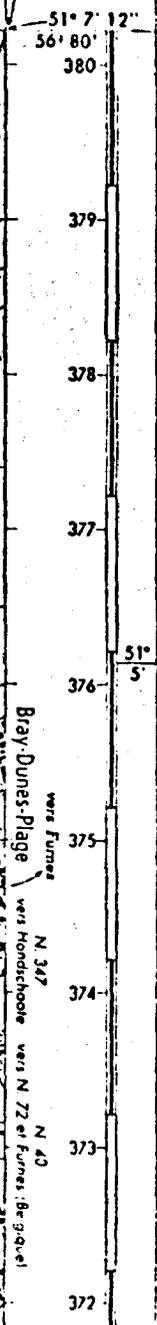
II - Dénombrement des streptocoques fécaux.

La recherche et le dénombrement des streptocoques fécaux se fait sur milieu de ROTHE (test présomptif) et sur milieu de LITSKY (test confirmatif) généralement en même temps que la recherche des coliformes totaux et fécaux.



LES ANCHES RAAPPORTÉES SUR LES CÔTES DU CADRE CORRESPONDENT AU QUADRILLAGE RÉGIONNAIRE DE LA PROJECTION LAMBERT 1 ZONE NORD

Figure 1 : Cartes de la zone étudiée avec situation des points de prélèvements (1 à 33).

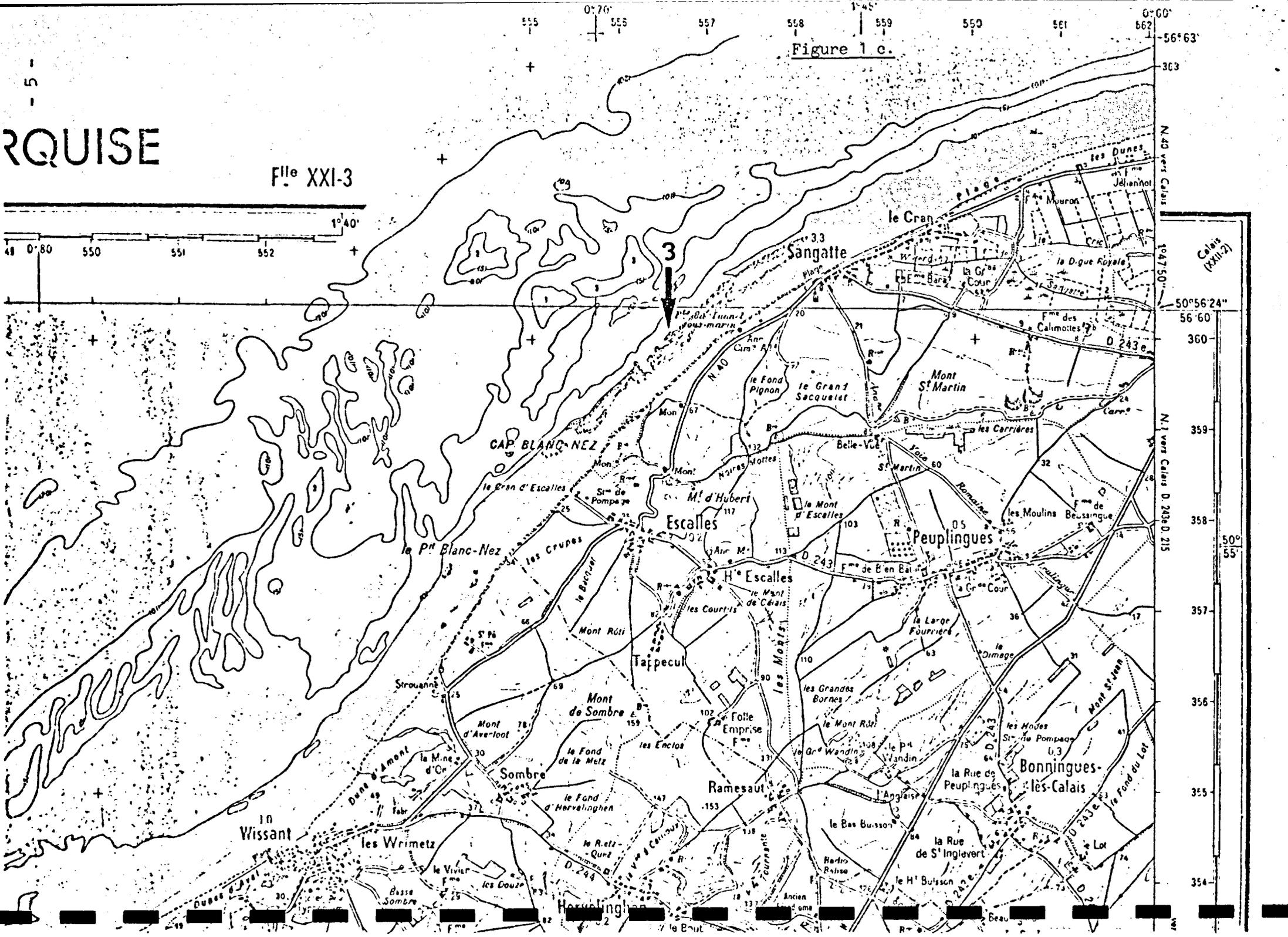
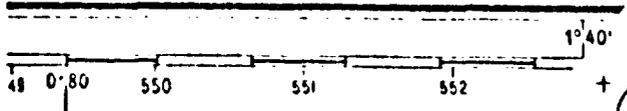


end

ESCALLES

File XXI-3

Figure 1 c.



Calais (XXI-2)

50°56'24"

56°60'

360

359

358

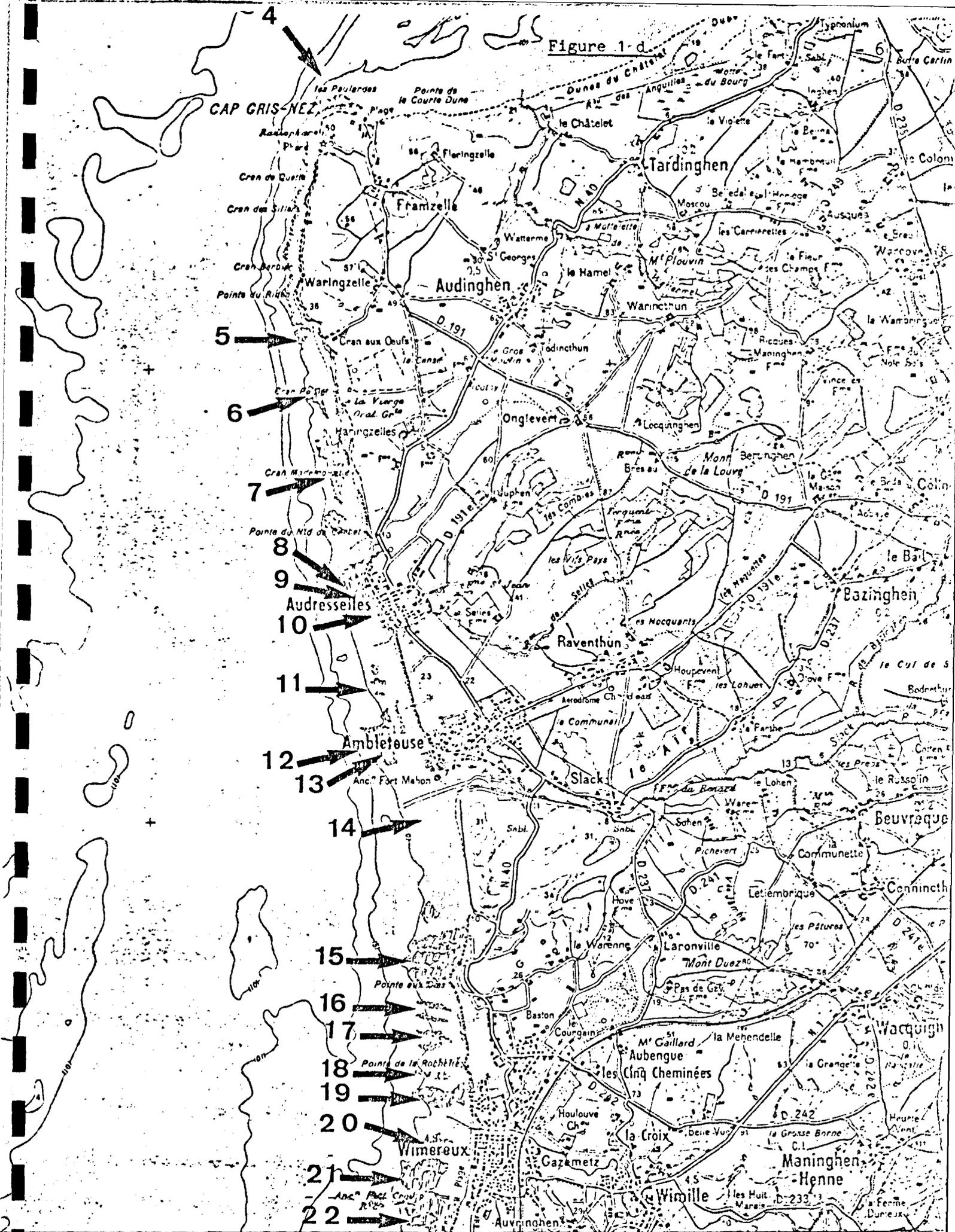
357

356

355

354

Figure 1-d



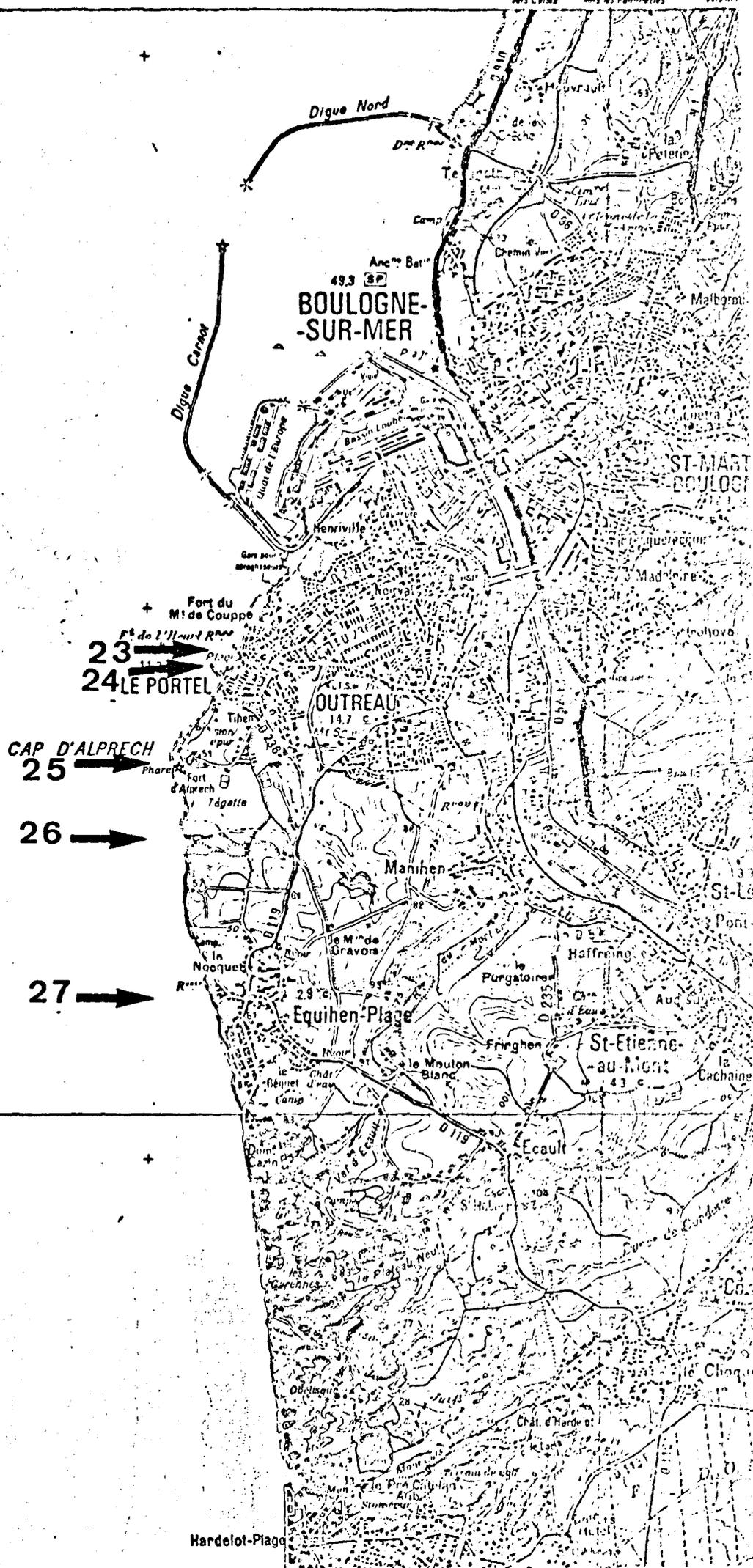
N 40 vers Boulogne-s-Mer N 1 vers Boulogne-s-Mer

544 545 546 547 548 549 0' 80" 550 551 552 553

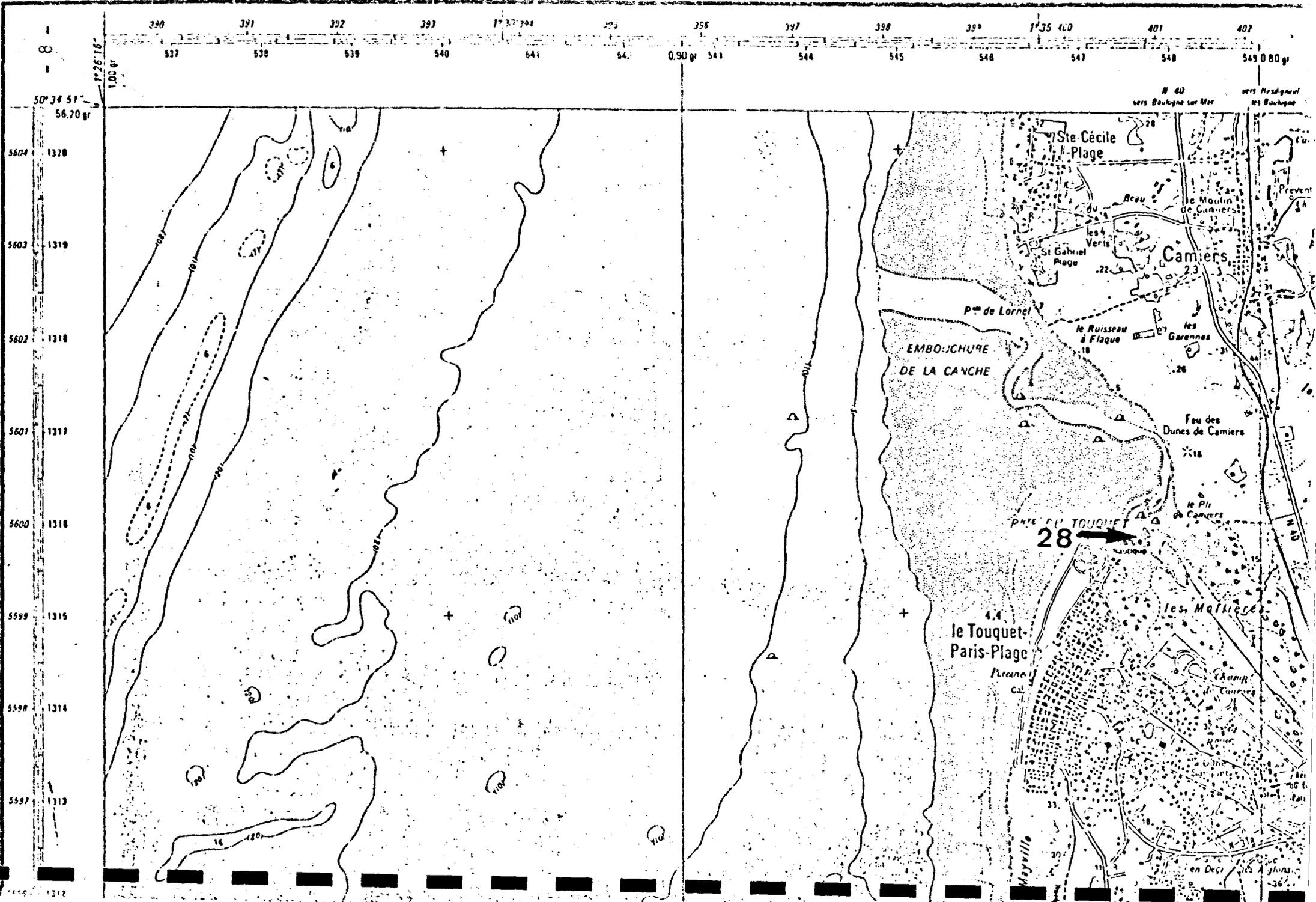
1°35'

1°40'

Figure 1 e.



Hardelot-Plage



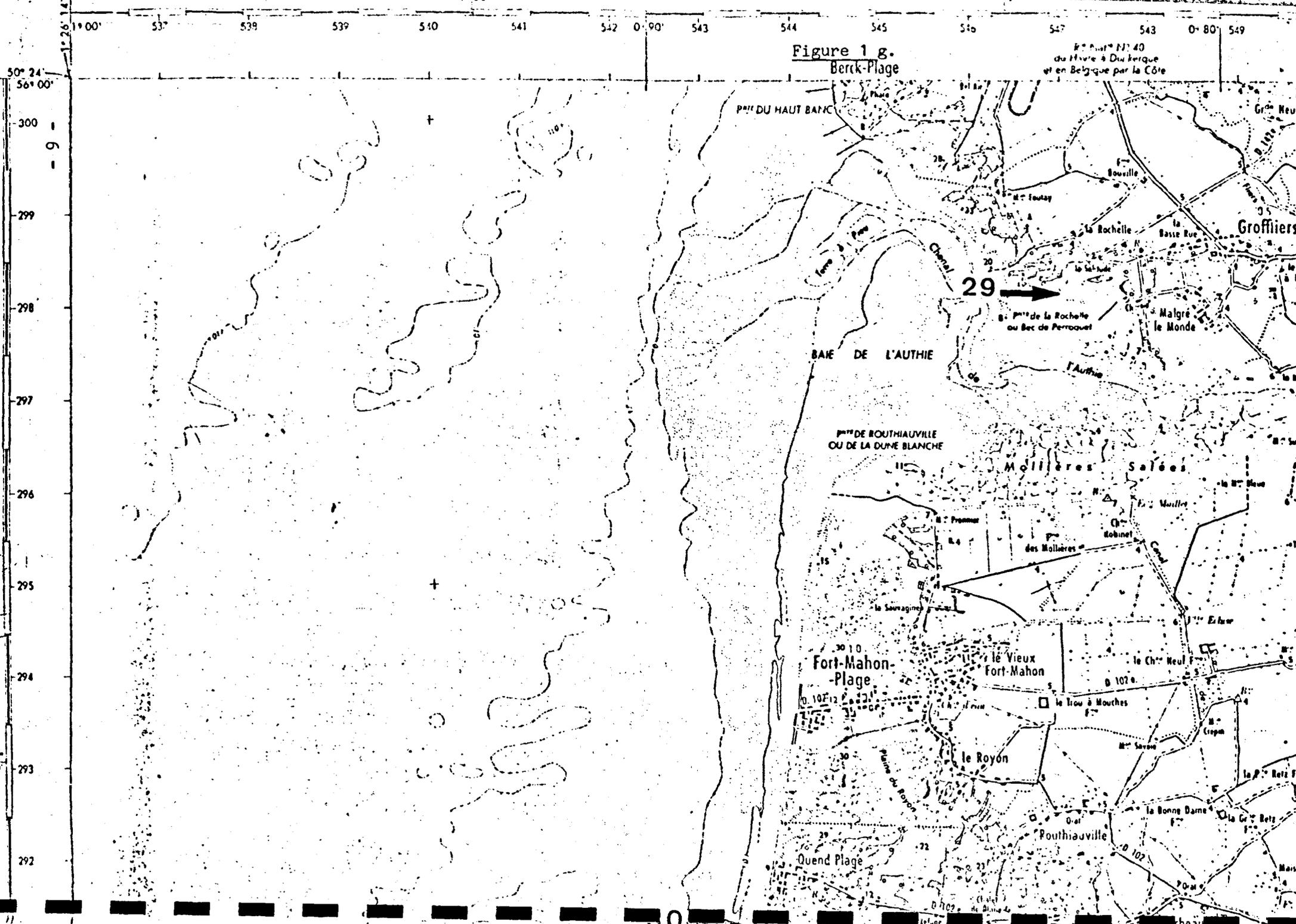


Figure 1 g.
Berck-Plage

R. Plan N° 40
du Havre à Duinkerque
et en Belgique par la Côte

29 →

BAIE DE L'AUTHIE

P. DE BOUTHIAUVILLE
OU DE LA DUNE BLANCHE

Fort-Mahon-
Plage

le Vieux
Fort-Mahon

le Royon

Quend Plage

Pouthiauville

Mollères Salées

Groffiers

Malgré
le Monde

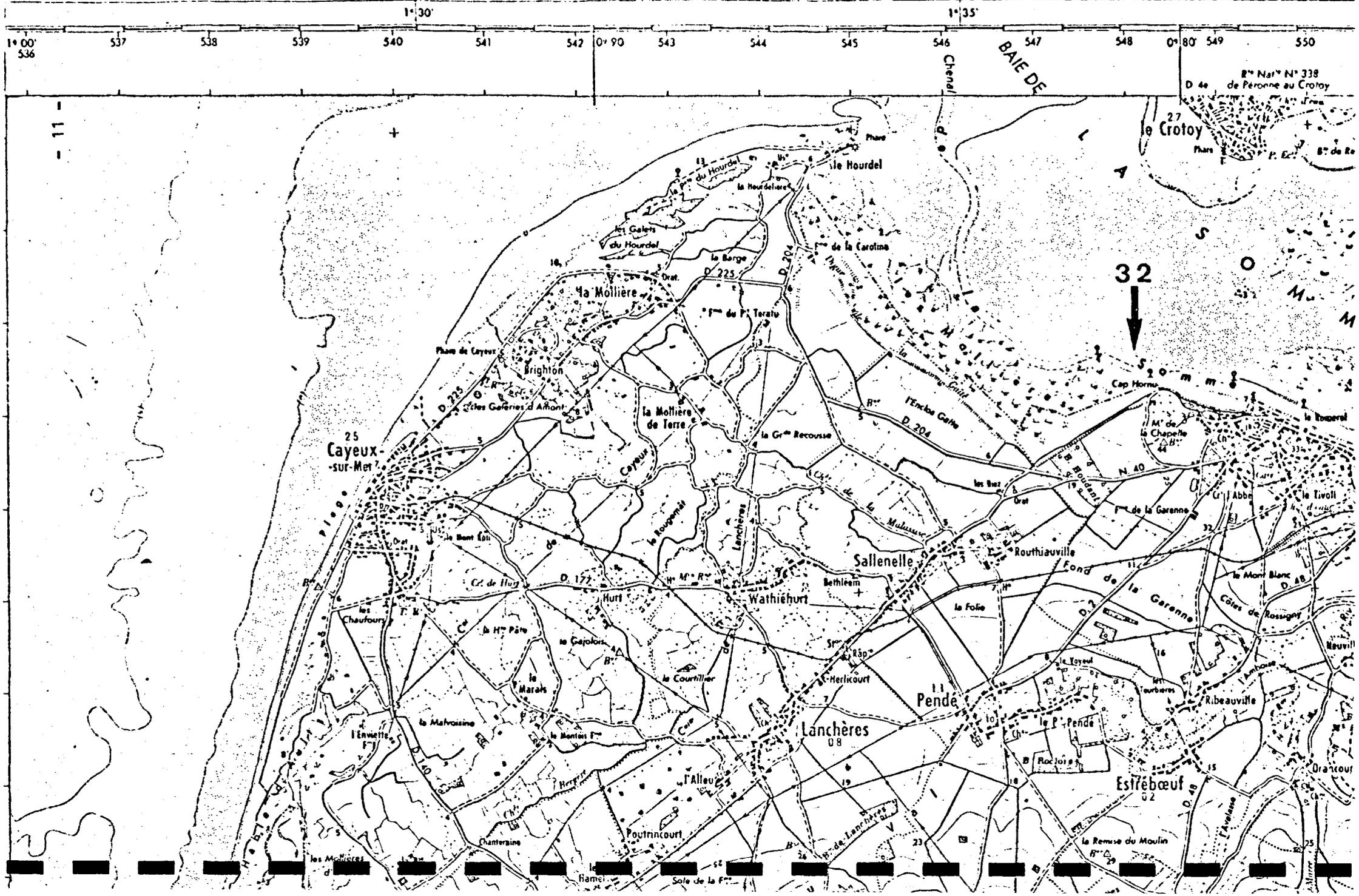
le Trou à
Mouches

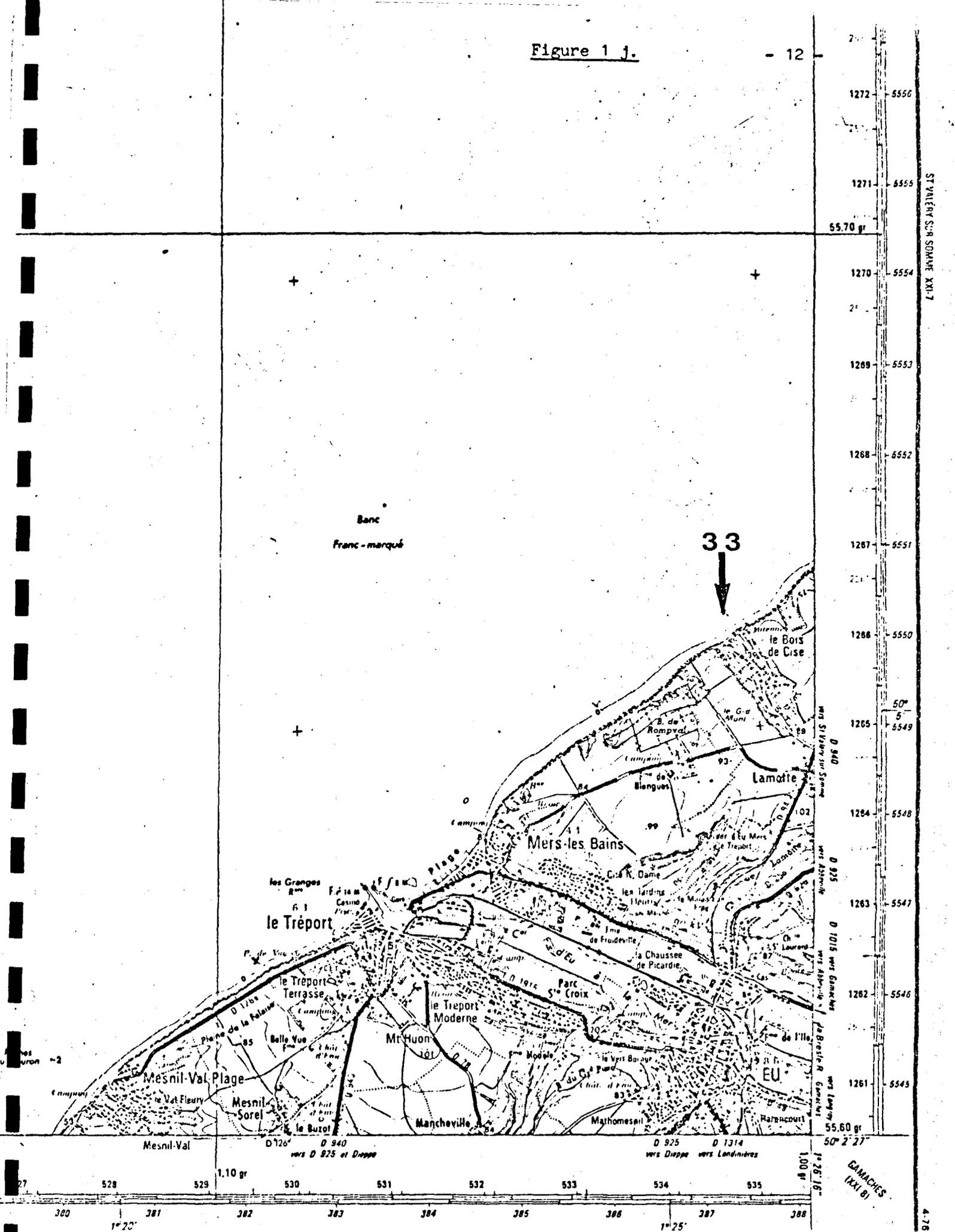
la Bonne Dame

la Gr. Bette

le Durieux

le Chau





Population en milliers d'habitants	0.1	0.08	Pont. Passerelle. Gué. Bac
Calvaire, tombe, statue religieuse, Cimetière	Tr	Sig	Lac, étang permanent. Étang à niveau variable. Étang périodique. Marais
Station. Sîle. Chem. néo	Tr	Sig	Source, fontaine, Puits, citerne, Château d'eau, réservoir
			Cascade. Barrage. Digue

1) Milieux utilisés.

- Composition du milieu de ROTHE :

	Milieu simple	Milieu double
. peptone	20 g	40 g
. glucose	5 g	10 g
. chlorure de sodium	5 g	10 g
. phosphate bipotassique	2,7 g	5,4 g
. phosphate monopotassique	2,7 g	5,4 g
. Azohydrate de sodium	0,2 g	0,4 g
. Eau distillée	1000 g	1000 g

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu déshydraté commercialisé par diverses marques en chauffant modérément - Filtrer.

Ajuster le ph : 6,8 à 7.

Répartir le milieu double à raison de 10 ml par tube de 20 x 200.

Stériliser à l'autoclave 15 minutes à 115°C.

- Composition du milieu de LITSKY :

. peptone	20	g
. glucose	5	g
. chlorure de sodium	5	g
. phosphate bipotassique	2,7	g
. phosphate monopotassique	2,7	g
. azohydrate de sodium	0,3	g
. éthyl violet	0,0005	g
. eau distillée	1000	g

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu déshydraté commercialisé par diverses marques en chauffant modérément - Filtrer.

Ajuster le ph : 6,8 à 7.

Répartir à raison de 10 ml par tube de 16 x 160.

Stériliser 15 minutes à 115°C.

2) Ensemencement.

On ensemence chaque tube de milieu de ROTHE avec un volume uniforme de 10 ml constitué soit par le broyat obtenu lors de la préparation de l'échantillon (voir norme NF V 45-110 en annexe 1) soit par un mélange broyat + eau salée 1 % stérile.

3) Incubation.

- Test présomptif (milieu de ROTHE) :

Placer à l'étuve à 37°C durant 48 heures.

Tout tube présentant après ce délai un trouble est présumé contenir un streptocoque fécal, il doit être obligatoirement repiqué sur milieu confirmatif de LITSKY.

- Test confirmatif (milieu de LITSKY) :

Placer à l'étuve à 37°C durant 48 heures.

Tout tube présentant après ce délai un trouble net ou un louche accompagné d'un petit amas violacé dans le fond du tube, est considéré positif.

4) Résultats.

Le dénombrement est donné par la table N.P.P.

III - Recherche des salmonelles.

Nous nous sommes bornés ici à une recherche biochimique des salmonelles permettant d'aboutir au diagnostic de groupe.

1) Milieux utilisés.

- Composition du milieu d'enrichissement sélectif au sélénite :

. peptone	5 g
. phosphate de sodium	10 g
. lactose	4 g
. bi-sélénite de sodium	4 g
. eau distillée	1000 g

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu déshydraté commercialisé diverses marques en chauffant modérément jusqu'à complète dissolution.

Ajuster le ph : 7.

Répartir 20 ml par tube de 20 x 200.

Ne pas autoclaver.

Stériliser 10 minutes au bain marie bouillant.

- Composition de la gélose au désoxycholate-citrate-lactose (D.C.L.) :

. peptone	5	g
. extrait de viande	5	g
. citrate de sodium	8,5	g
. hyposulfite de sodium	5,4	g
. citrate ferrique	1	g
. désoxycholate de sodium	5	g
. rouge neutre	0,02	g
. agar	12	g
. eau distillée	1000	g

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu déshydraté commercialisé par différentes marques en chauffant lentement jusqu'à ébullition qui ne doit pas être poursuivie - Après léger refroidissement, ajuster à 1 litre.

Ajuster le ph : 7,3 - Répartir à raison de 100 ml par flacon.

Ne pas stériliser.

- Composition de la gélose au vert brillant de Kristensen (V.B.) :

. protéose-peptone	10	g
. extrait de levure	3	g
. chlorure de sodium	5	g
. lactose	10	g
. saccharose	10	g
. vert brillant	0,0125	g
. rouge de phénol	0,08	g
. agar	12	g
. eau distillée	1000	g

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu déshydraté commercialisé par différentes marques en chauffant jusqu'à ébullition.

Ajuster le ph à 7 après refroidissement - Répartir à raison de 100 ml par flacon.

Stériliser 15 minutes à 115°C.

2) Enrichissement sur milieu sélectif au sélénite.

2 ml de broyat de coquillages sont placés dans un tube contenant 20 ml de milieu liquide au sélénite. Laisser incuber 24 heures à 37°C.

3) Isolement sur milieux gélosés.

Les géloses au D.C.L. et V.B. sontensemencées à partir du milieu d'enrichissement. Laisser incuber 24 heures à 37°C.

4) Examen des colonies isolées.

- Sur gélose au D.C.L. :

- . colonies incolores ou blanchâtres à centre noir : salmonelles possibles
- . colonies rouges : E. coli et autres coliformes lactose +

- Sur gélose V.B. :

- . colonies roses et halo rouge : salmonelles possibles
- . colonies vertes et halo jaune-vert : coliformes ou autres germes lactose + et saccharose +

5) Galerie de diagnostic biochimique.

Les colonies typiques repérées sur les boîtes précédentes sontensemencées sur galeries API pour l'identification des entérobactéries (se reporter à la technique d'ensemencement et à la fiche de diagnostic différentiel des entérobactéries édités par la maison API).

RESULTATS et COMMENTAIRES

Les résultats concernant le dénombrement des coliformes totaux, des coliformes fécaux, des streptocoques fécaux et la recherche des salmonelles sont regroupés en annexe 2 a, b, c et d. Afin de permettre une meilleure visualisation des résultats, les quantités moyennes de coliformes fécaux sont représentées par des disques de diamètre proportionnel sur les cartes de l'annexe 3.

I - Résultats du dénombrement des coliformes totaux.

En ce qui concerne les coliformes totaux, on constate que le nombre moyen de germes sur 12 mois est très élevé pour chacune des 33 stations, allant de 1 115 à Audinghen (Caberlin) jusqu'à 55 750 en Baie de Canche avec une moyenne générale de 16 137.

Certaines valeurs n'ont pu être définies avec précision, le nombre maximal N.P.P. étant dépassé (ex : + 72 000). Pour le calcul des moyennes, nous avons alors pris le nombre maximal (+ 72 000 = 72 000).

Aucune norme officielle ne définit le nombre de coliformes totaux à ne pas dépasser dans les coquillages. Cependant, à titre indicatif, on peut comparer ces résultats aux nombres guides et impératifs pour les eaux de baignade :

nombres G (guides) : moins de 500 dans 100 ml
nombres I (impératifs) : moins de 10 000 dans 100 ml.

II - Résultats du dénombrement des coliformes fécaux.

Comme pour les coliformes totaux, on constate que le nombre moyen de coliformes fécaux sur 12 mois est très élevé pour chacune des 33 stations. La moyenne pour l'ensemble des analyses est de 5 850 germes pour 100 ml de broyat.

Il existe cette fois un arrêté (annexe 4) fixant le nombre le plus probable de coliformes fécaux à ne pas dépasser pour que les coquillages soient considérés comme salubres. Ce nombre est fixé à 300.

Si on le compare aux résultats obtenus, seule une station sur 33 est conforme: il s'agit du point n° 5 à Audinghen (Caberlin). Les autres s'échelonnent de 305 à 38 700 coliformes fécaux, les moins contaminées étant celles du secteur proche du n° 5 (Audinghen); les plus contaminées, les baies de Canche et d'Authie, le secteur d'Ambleteuse à Equihen et Sangatte.

Les résultats d'analyses bactériologiques étant théoriquement plus aléatoires que ceux concernant les analyses chimiques, quelques prélèvements ont été doublés sur un mois. Nous n'avons pas constaté de différences très significatives dans les numérations de coliformes fécaux :

	1ère analyse	2ème analyse (15 jours plus tard)
Juin - point 6	90	108
Juin - point 21	0	108
Août - point 21	0	273

Nous avons essayé de relier les précipitations moyennes mensuelles littorales aux nombres de coliformes fécaux. Comme le montre les données consignées dans le tableau 1 et la figure 2, une augmentation des précipitations d'un mois sur l'autre entraîne systématiquement une augmentation du nombre de coliformes fécaux dans les coquillages. Le phénomène s'explique en grande partie par un lessivage des sols lors de fortes précipitations qui contribue à entraîner vers la mer les coliformes fécaux.

III - Résultats du dénombrement des streptocoques fécaux.

Les résultats concernant le dénombrement des streptocoques fécaux confirment ceux des coliformes totaux et fécaux. Aucune norme officielle, comme pour les coliformes totaux, ne fixe le nombre de streptocoques fécaux à ne pas dépasser dans les coquillages. Cependant, on considère généralement que 2 500 est la limite acceptable.

Cette limite est dépassée dans la plupart des cas sauf à Dunkerque, Sangatte, au Cap Gris-Nez, à Audinghen (Caberlin et Poissonnet), Audresselles (Grosse Hure) et Ambleteuse (Les-Liettes).

	PRECIPITATIONS moyennes mensuelles en mm d'eau	Nombre de COLIFORMES FECAUX dans 100 ml de chair de coquillages	Nombre de STREPTOCOQUES FECAUX dans 100 ml de chair de coquillages
Avril 82	18	1 695	6 988
Mai	33	5 443	1 601
Juin	86	7 518	4 171
Juillet	45	2 012	2 675
Août	35	2 484	3 156
Septembre	66	3 421	2 603
Octobre	836	13 288	14 308
Novembre	121	5 362	12 007
Décembre	68	4 071	16 541
Janvier	59	2 518	12 140
Février	35	3 736	6 282
Mars 83	41	19 957	10 086

Tableau 1 : Précipitations moyennes mensuelles,
nombre de coliformes fécaux et de streptocoques fécaux
d'avril 1982 à mars 1983.

Figure 2 : nombre de Coliformes fécaux en fonction des précipitations (en mm d'eau)

nombre de
Coliformes
fécaux

échelle: 1000 Coliformes fécaux

10 mm d'eau

19957

15000

13288

10000

7518

5443

5362

4071

3736

3421

2518

2484

2012

1695

1000

0 10 18 33 35 41 45 59 66 68 86 121 830 836 précipitations (en mm en

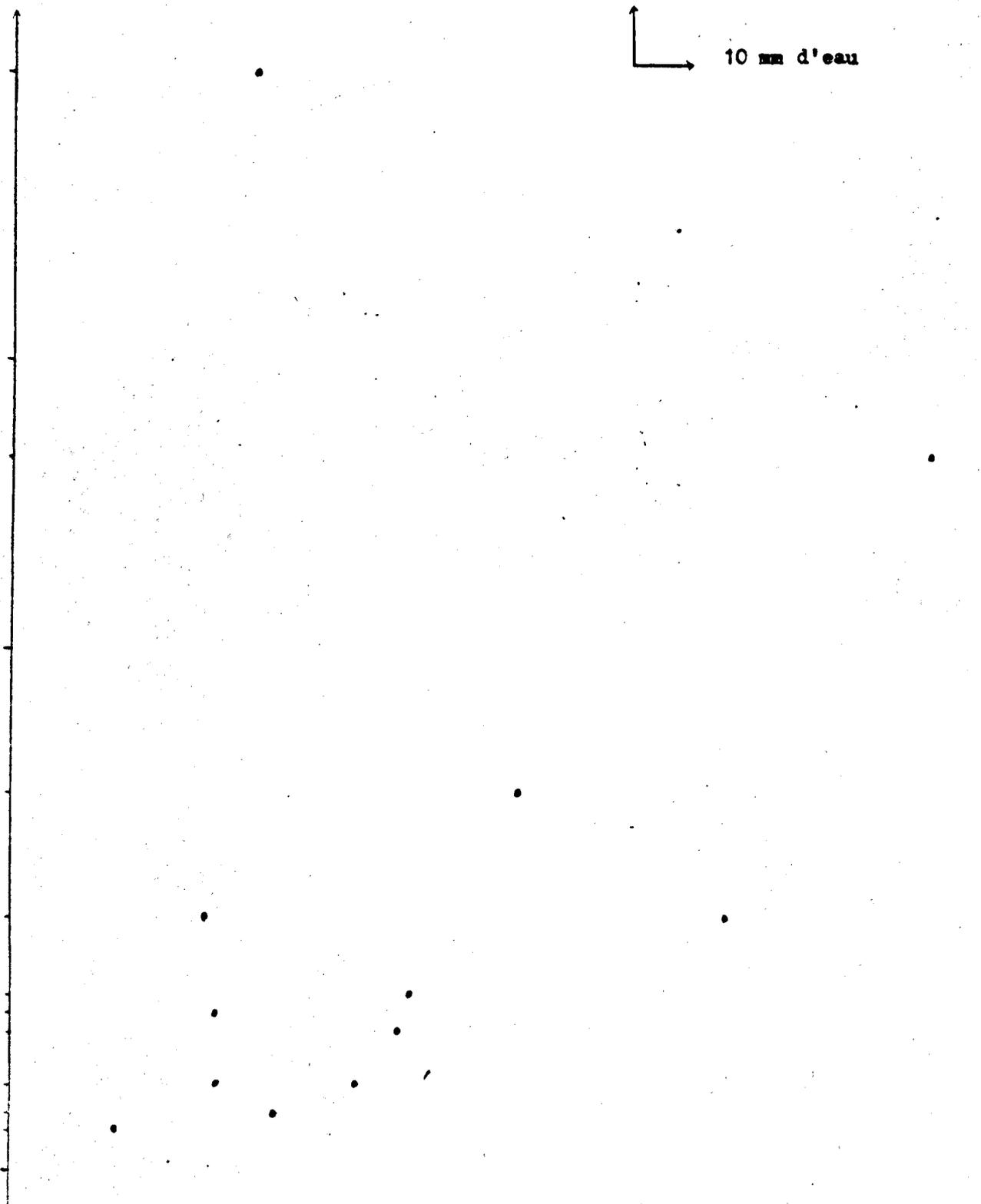
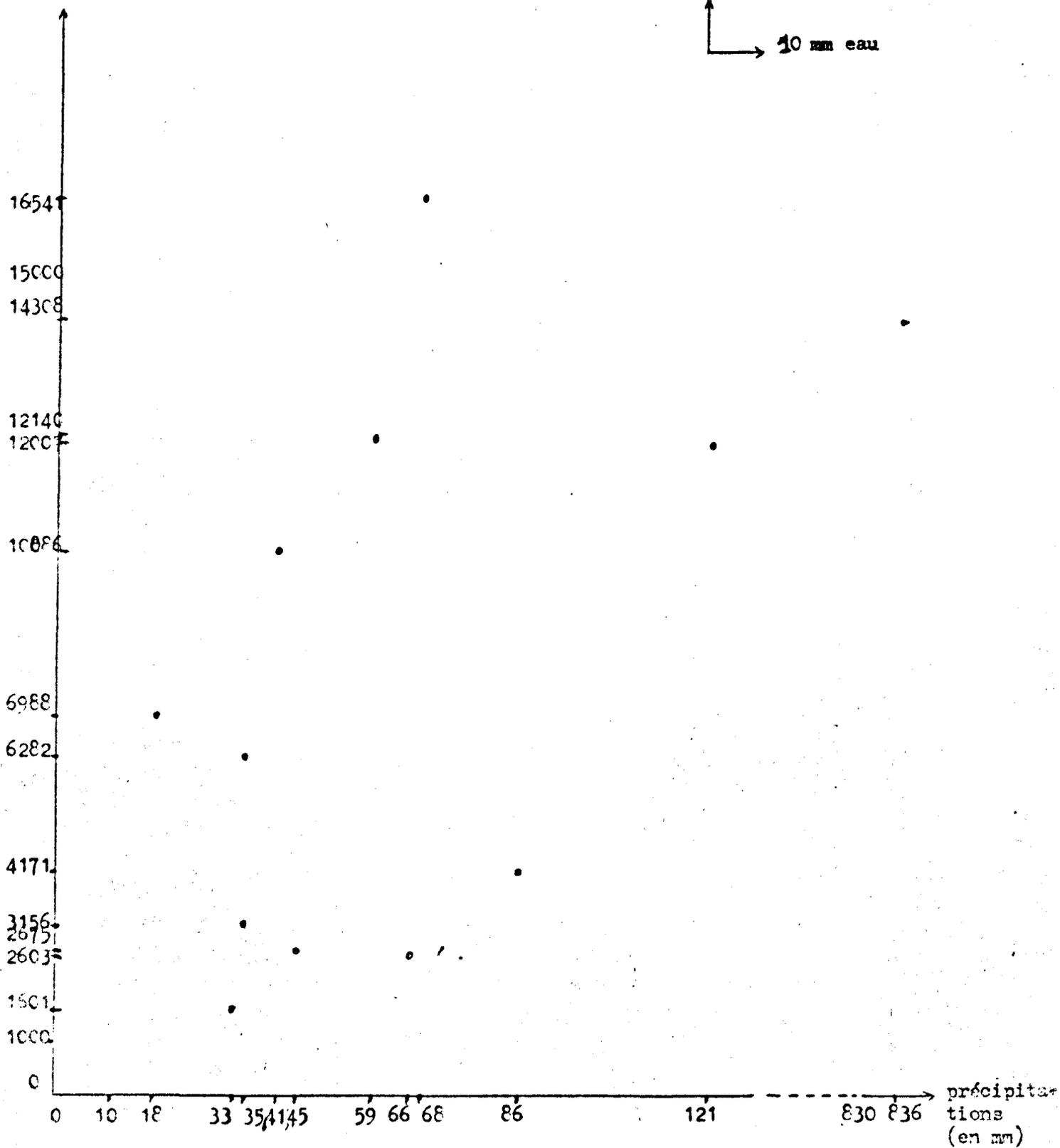


Figure 3 : nombre de STREPTOCOQUES FÉCAUX en fonction des PRÉCIPITATIONS (en mm)

nombre de
Streptocoques
fécaux

échelle: 1000 Streptocoques fécaux

↑
10 mm eau
→



La moyenne pour l'ensemble des analyses est de 7 314 avec des pointes en baies de Canche, d'Authie, de Somme et Le Portel - Equihen.

Les résultats du tableau 1 et la figure 3 montrent également l'influence des précipitations sur le taux des streptocoques fécaux dans les coquillages. Dans ce cas, il semble que l'effet dû aux précipitations se répercute sur plusieurs mois, conséquence certainement d'une plus grande résistance des streptocoques fécaux. Les germes seraient alors des indicateurs d'une pollution fécale plus ancienne.

IV - Recherche des salmonelles.

Contrairement au dénombrement des germes tests de la contamination fécale, pour lesquels les analyses ont été effectuées sur chacun des 33 prélèvements mensuels, la recherche des salmonelles s'est effectuée sur 2 stations choisies parmi les plus contaminées en coliformes fécaux et streptocoques fécaux.

Malgré cela, nous n'avons pas trouvé de salmonelles dans aucune des 23 recherches effectuées.

CONCLUSIONS

L'étude de la pollution bactérienne des moules et des coques sur le littoral Nord/Pas-de-Calais nous aura permis de constater la mauvaise qualité bactériologique des coquillages et, par conséquent, de l'eau dans laquelle ils vivent.

La moyenne de l'ensemble des analyses de coliformes fécaux effectuées sur les coquillages approche les 6'000 germes soit près de 20 fois plus que la norme de salubrité exigée. Heureusement, la présence de germes pathogènes (salmonelles) est assez rare.

Les secteurs les plus touchés sont localisés au niveau des baies de Somme, d'Authie mais surtout de Canche et dans les secteurs d'Ambleteuse à Equihen et Sangatte. Il n'existe pas, à proprement parlé, de zone exempte de contamination. Les seuls secteurs acceptables sont ceux d'Audinghen et, à un degré moindre, d'Ault.

Les résultats de cette étude sur 1 an sont confirmés par les analyses qu'effectue l'I.S.T.P.M. chaque année dans le cadre de sa mission de contrôle de la salubrité des coquillages et qui ont déjà conduit au classement insalubre de Le Portel (partie) et des baies de Canche, d'Authie et de Somme. D'autres zones sont en cours de classement insalubre : le littoral boulonnais du Cap Blanc-Nez à Equihen.

L'état de pollution bactérienne du littoral de Dunkerque à Ault est donc grave et il est nécessaire, à court terme, de réduire cette pollution en s'attaquant à son origine.

L'activité conchylicole dans notre région est très liée aux problèmes de pollution bactérienne. Si on veut conserver cette activité ou même la développer, c'est sur les secteurs mytilicoles qu'il faudra en premier porter l'effort d'assainissement. Faute de réduire rapidement les sources de pollution de l'eau, ce sont les coquillages eux-mêmes qu'il faudra épurer.

A N N E X E S

- 1 - Norme AFNOR de dénombrement des coliformes fécaux dans les eaux conchylicoles et dans les coquillages marins vivants
- 2 - Résultats d'analyses :
 - a - Dénombrement des coliformes totaux
 - b - Dénombrement des coliformes fécaux
 - c - Dénombrement des streptocoques fécaux
 - e - Recherche des salmonelles
- 3 - Cartes des quantités de coliformes fécaux
- 4 - Arrêté Interministériel du 12 octobre 1976 fixant les normes de salubrité des zones conchylicoles

NORME FRANÇAISE
HOMOLOGUÉE

PRODUITS DE LA PECHE
DÉNOMBREMENT DES COLIFORMES FÉCAUX
DANS LES EAUX CONCHYLICOLES
ET DANS LES COQUILLAGES MARINS VIVANTS

NF
V 45-110
Juin 1981

éditée par l'association française de normalisation (afnor) — tour europe cédex 7 92080 paris la défense — tél. (1) 778-13-26

AVANT-PROPOS

La méthode décrite dans la présente norme peut être adoptée comme méthode de référence et s'étendre à l'ensemble des laboratoires appelés à faire des recherches similaires. Elle a été simplifiée au mieux pour ne pas multiplier le nombre d'analyses, sans en réduire cependant sa fidélité.

La technique de numération en milieu liquide (méthode du nombre le plus probable - NPP) a été préférée car elle permet de révéler, pour le travail ordinaire, des quantités de micro-organismes comprises dans une gamme plus étendue que la technique sur milieu solide. De plus, la facilité de préparation et d'utilisation des milieux compense l'imprécision statistique des résultats.

En raison du caractère particulier des produits concernés, les normes de Directives générales (1) ne sont pas applicables.

1 OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente norme décrit une méthode de dénombrement des coliformes fécaux considérés comme micro-organismes tests de salubrité dans les eaux conchyloles et les coquillages marins vivants.

(1) NF V 08-016 Directives générales pour le dénombrement des coliformes — Technique du nombre le plus probable après incubation à 30 °C.

NF V 08-017 Directives générales pour le dénombrement des coliformes fécaux et *Escherichia coli*.

Homologuée par arrêté
du 1981-05-11
(J.O. 1981-05-16)
effet le 1981-06-11

© afnor 1981
Droits de reproduction
et de traduction réservés
pour tous pays

afnor 81130

NF V-45-110 1^{er} tirage 81-05

Fish products — Enumeration of faecal coliforms in conchological waters and in living shell fishes
Fischereierzeugnisse — Zählung von coliformen Fäkalkeimen in Muschelgewässern
und in lebenden Seemuscheln

2 DÉFINITIONS

Pour les besoins de la présente norme, les définitions suivantes sont applicables :

Coliformes fécaux (1) : coliformes thermotolérants, qui, à la température de 44 °C fermentent le lactose avec production de gaz et donnent de l'indole à partir du tryptophane.

Eaux conchylicoles : eaux marines ou saumâtres permettant la vie et la croissance de coquillages (mollusques bivalves et gastéropodes) destinés à la consommation directe par l'homme.

3 PRINCIPE

3.1 Ensemencement de trois tubes (2) contenant un milieu sélectif liquide à triple concentration avec une quantité déterminée de l'échantillon pour essai (eau conchylicole, ou, dans le cas des coquillages, suspension au 1/3).

3.2 Dans les mêmes conditions, ensemencement de dilutions décimales de concentrations appropriées, obtenues à partir de l'échantillon pour essai.

3.3 Incubation de trois séries de tubes de dilutions appropriées à 37 °C pendant 48 h.

3.4 À partir de chaque cube de milieu sélectif où est observé un dégagement gazeux (tubes lactose +), ou douteux, subcultures dans un tube contenant un milieu sélectif liquide simple concentration et dans un tube contenant de l'eau peptonée, puis incubation à 44 °C pendant 24 h.

3.5 Calcul du nombre de coliformes fécaux dans 100 ml d'eau conchylicole ou de chair de coquillage par la méthode NPP, à partir du nombre de tubes (3.4) dont les repiquages ont donné à la fois une production de gaz dans le milieu sélectif et une production d'indole dans l'eau peptonée.

4 MILIEUX DE CULTURE, DILUANT ET RÉACTIFS

4.1 COMPOSANTS DE BASE

Pour améliorer la fidélité des résultats, il est recommandé d'utiliser, pour la préparation des milieux, des composants de base déshydratés ou des milieux complets déshydratés. Les prescriptions du fabricant doivent être suivies scrupuleusement.

Les produits chimiques utilisés doivent être de qualité analytique.

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée ou déminéralisée, exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Si les milieux et le diluant ne sont pas utilisés extemporanément, ils doivent être conservés à l'obscurité entre 0 et + 5 °C pendant 1 mois au maximum, dans des conditions évitant toute modification de leur composition.

(1) Les mollusques exigeant des conditions bien spécifiques, il convient d'être plus restrictif que pour d'autres produits, aussi le terme de Coliformes fécaux désigne dans la présente norme des micro-organismes dénommés dans d'autres documents « *Escherichia coli* présumés ».

(2) Pour les produits faiblement pollués et chaque fois qu'une plus grande précision des résultats est demandée, il est nécessaire d'ensemencer des séries de cinq tubes en utilisant le même mode opératoire.

4.2 DILUANT

Eau salée à 1 %

Composition

chlorure de sodium (NaCl)	10 g
eau	1 000 ml

Préparation

Répartir les quantités d'eau salée nécessaires pour l'analyse dans des flacons de capacités appropriées. Stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C pendant 15 min.

4.3 RÉACTIF POUR LA RECHERCHE DE L'INDOLE (réactif de Kovacs)

Composition

p-diméthylaminobenzaldéhyde	5,0 g
alcool amylique	75,0 ml
acide chlorhydrique (ρ_{20} 1,18 à 1,19 g/ml)	25,0 ml

Préparation

Dissoudre l'aldéhyde dans l'alcool en chauffant doucement au bain d'eau (environ 50 à 55 °C). Refroidir et ajouter l'acide goutte à goutte en remuant constamment. Mettre à l'abri de la lumière et conserver en flacon bouché émeri à 4 °C environ. Le réactif doit être jaune clair à brun clair.

4.4 BOUILLON LACTOSÉ BILIÉ AU VERT BRILLANT (milieu sélectif)

Composition

	a) Milieu simple concentration	b) Milieu triple concentration
peptone	10,0 g	30,0 g
lactose	10,0 g	30,0 g
bile de bœuf déshydratée	20,0 g	60,0 g
Vert brillant	0,0133 g	0,0399 g
eau	1 000 ml	1 000 ml

Préparation

Dissoudre dans l'eau les composants ou le milieu complet déshydraté en chauffant modérément, jusqu'à ébullition, le cas échéant.

Si nécessaire, ajuster le pH (en contrôlant au pH-mètre) de sorte qu'après stérilisation il soit de 7,3 ± 0,1 à 25 °C.

Répartir le milieu simple concentration par quantités de 10 ml et le milieu triple concentration par quantités de 5 ml, dans des tubes à essais à vis de 20 mm × 200 mm contenant des cloches de Durham.

Stériliser à l'autoclave à 121 °C ± 1 °C (1) pendant 15 min.

Les cloches de Durham ne doivent pas contenir de bulles d'air après stérilisation.

Note : Étant donné que le milieu complet ne donne pas toujours les résultats attendus, il est recommandé de contrôler ses propriétés avant utilisation.

(1) Cette température est celle habituellement utilisée. Toutefois, elle peut être abaissée lorsqu'il y a présence de sucres.

4.5 EAU PEPTONÉE

Composition

peptone	10,0 g
chlorure de sodium (NaCl)	5,0 g
eau	1 000 ml

Préparation

Dissoudre les composants dans l'eau en portant à ébullition, le cas échéant.

Si nécessaire, ajuster le pH (en contrôlant au pH-mètre) de telle sorte qu'après stérilisation il soit de $7,1 \pm 0,1$ à 25 °C.

Répartir les quantités d'eau peptonée nécessaires pour l'examen dans des tubes à essais à vis de 20 mm × 200 mm à raison de 10 ml par tube.

Stériliser à l'autoclave à $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ pendant 15 min.

5 APPAREILLAGE ET VERRERIE

Matériel courant de laboratoire de microbiologie, et notamment :

5.1 Appareils pour la stérilisation en chaleur sèche (four) ou en chaleur humide (autoclave)

Le matériel en contact avec les milieux, le diluant et l'échantillon, sauf s'il est livré stérile (particulièrement celui en matière plastique), doit être stérilisé :

- soit au four en le maintenant à une température comprise entre 170 et 175 °C pendant au moins 1 h.
- soit à l'autoclave en le maintenant à une température de $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$ pendant au moins 20 min.

5.2 Broyeur-homogénéisateur mécanique, dont la vitesse de rotation permet d'obtenir 15 000 tours par minute et équipé de bois stérilisables de 0,5 l de capacité (1).

5.3 Étuve réglée à $37 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$.

5.4 Bain d'eau (2) réglé à $44 \text{ °C} \pm 0,2 \text{ °C}$.

5.6 Anse bouclée en platine iridié ou en nickel-chrome, de diamètre environ 3 mm.

5.7 Tubes de culture (20 mm × 200 mm) à vis et fioles de capacités appropriées.

5.8 Éprouvette graduée de 100 ml ou plus.

5.8 Pipettes graduées étalonnées spécialement à l'usage bactériologique et de capacité nominale :

- 1 ml, graduées en 0,1 ml, à large ouverture
- 10 ml, graduées en 0,1 ml.

5.10 Flacons de 250 ml, bouchés émeri.

5.11 Flacons de dimensions appropriées, munis d'un fil lesté (par exemple flacons à vis de 250 ml).

5.12 Cloches de Durham de dimensions appropriées en vue de leur utilisation dans des tubes de 20 mm × 200 mm.

(1) Par exemple, un broyeur Waring Blendor LB₁ convient.

(2) Il est souhaitable que le bain d'eau soit muni d'un thermomètre à contact ou d'un système à circulation d'eau.

5.13 MATÉRIEL DIVERS :

- Petits sacs en plastique étanches et résistants.
- Coffret isotherme.
- Instruments permettant l'ouverture des coquillages.
- Ciseaux pour couper le byssus de certains coquillages.
- Petite brosse.

6 ÉCHANTILLONNAGE

La quantité d'échantillons pour laboratoire doit être suffisante pour les besoins de l'analyse.

6.1 PRÉLÈVEMENT

6.1.1 Eaux conchylicoles

Effectuer les prélèvements d'eau de mer dans des conditions d'asepsie maximale à l'aide de flacons appropriés (5.11).

6.1.2 Coquillages

La quantité de produit brut prélevé doit être au moins égale à 500 g et le nombre d'individus retenus jamais inférieur à cinq.

Placer les coquillages prélevés dans des petits sacs en plastique étanches et résistants. L'usage unique de ces sacs est recommandé.

6.2 ACHEMINEMENT DES ÉCHANTILLONS

Dans la mesure du possible, les échantillons doivent être transportés en coffret isotherme, dont la température ne doit pas dépasser 15 °C ; utiliser des accumulateurs de froid, si nécessaire.

À l'arrivée au laboratoire, entreposer les échantillons à une température voisine de 6 °C ± 2 °C.

Commencer l'analyse dans les délais les plus brefs ; le délai entre le prélèvement à l'analyse ne doit pas excéder 24 h pour les eaux conchylicoles.

7 PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR ESSAI

7.1 EAUX CONCHYLICOLES

7.1.1 Remettre en suspension, par agitation vigoureuse (10 fois) du flacon bouché et renversé.

7.1.2 Homogénéiser l'échantillon par aspirations et refoulements successifs à la pipette (5.9).

7.2 COQUILLAGES

7.2.1 L'analyse des coquillages doit porter sur un nombre d'individus tel que le volume minimal de chair, soumis à l'analyse, soit d'environ 25 à 50 ml.

Note : Il est bon de disposer de quelques individus en surnombre de façon à remplacer les coquillages endommagés.

7.2.2 Laver et brosser chaque coquillage sous courant d'eau du robinet, en insistant au niveau de la charnière ou du point d'ouverture.

7.2.3 Égoutter et aseptiser le point d'ouverture par exposition brève à la flamme.

7.2.4 Ouvrir la coquille à l'aide d'instruments stérilisés par flambage à l'éthanol (1). Pratiquer l'ouverture des coquillages de façon aseptique par des procédés simples et sans risque de blessure pour le manipulateur.

S'il y a présence d'un byssus, le couper aux ciseaux avant ouverture, mais ne pas l'arracher.

7.2.5 Au fur et à mesure des ouvertures successives, recueillir les eaux intervalvaires dans un récipient stérile. Les coquillages ayant perdu l'eau intervalvaire peuvent être utilisés s'ils sont encore vivants au moment de l'ouverture.

7.2.6 Introduire la chair des coquillages dans une éprouvette graduée stérile de 100 ml ou plus (5.8), dans laquelle on aura placé au préalable 20 ml de diluant (4.2), afin de déterminer le volume de la chair par déplacement d'eau.

7.2.7 Ajouter dans l'éprouvette l'eau intervalvaire préalablement recueillie et compléter le mélange avec le diluant (4.2) jusqu'à un volume total triple du volume de chair mesuré en 7.2.6.

7.2.8 Verser le contenu de l'éprouvette dans un bol stérile du broyeur-homogénéisateur (5.2) où sera effectué le broyage.

7.2.9 Procéder au broyage pendant 30 s, en réglant la vitesse de rotation de l'appareil de façon à obtenir environ 15 000 tours par minute.

On obtient ainsi une suspension au 1/3.

8 MODE OPÉRATOIRE

8.1 PRISE D'ESSAI

Prélever l'échantillon pour essai immédiatement après agitation-homogénéisation (voir 7.1.2), ou broyage (7.2.9) selon le cas. La pipette servant à homogénéiser l'échantillon peut être utilisée pour ensemercer directement la première série de tubes et pour préparer la première dilution.

8.2 DILUTION AU 1/10, soit 10^{-1} (2)

Prendre 5 ml de l'échantillon pour essai (voir 7.1.2 ou 7.2.9) et les introduire dans 45 ml de diluant (4.2).

Homogénéiser avec une nouvelle pipette stérile.

8.3 DILUTION AU 1/100, soit 10^{-2}

Prendre, à l'aide de la pipette ayant servi à homogénéiser la dilution précédente, 5 ml de cette solution et l'introduire dans 45 ml de diluant (4.2).

Après homogénéisation, on obtient 50 ml d'une solution au 1/100.

8.4 DILUTIONS SUIVANTES

Si nécessaire, préparer de même les dilutions 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , ...

Effectuer un nombre de dilutions suffisant pour que les tubes de la dernière dilution aient toute chance d'être tous négatifs.

(1) L'alcool à brûler du commerce convient très bien.

(2) Pour les coquillages, il s'agit de dilutions au 1/10, d'une suspension au 1/3 (voir 7.2.9), même remarque pour les dilutions suivantes.

8.5 ENSEMENCEMENT

8.5.1 Prendre trois tubes de milieu sélectif à triple concentration (4.4.b). Transférer dans chacun des tubes 10 ml de l'échantillon pour essai (7.1 ou 7.2 selon le cas).

8.5.2 Prendre ensuite trois autres tubes de milieu sélectif à triple concentration (4.4.b) et transférer dans chacun des tubes 10 ml de la dilution suivante.

8.5.3 Opérer de même pour les dilutions suivantes.

8.5.4 Choisir trois dilutions successives en fonction de la richesse présumée en micro-organismes, par exemple : $1 - 10^{-1} - 10^{-2}$ ou $10^{-3} - 10^{-4} - 10^{-5}$.

Note : On envisage ici la combinaison : 3 tubes pour chacune des trois séries. Pour les produits faiblement pollués et à chaque fois qu'une plus grande précision des résultats est demandée, il est nécessaire d'ensemencer des séries de cinq tubes en utilisant le même mode opératoire.

8.6 INCUBATION

Faire incuber les trois séries de tubes ensemencés (8.5.4) à l'étuve (5.3), à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant $48\text{ h} \pm 2\text{ h}$.

Noter pour chaque série, le nombre de tubes lactose positif, c'est-à-dire présentant un dégagement gazeux très net (1/10 du volume total de la cloche de Durham).

8.7 REPIQUAGE

8.7.1 À partir de chaque tube (8.6) ensemencer avec une anse bouclée (5.6) dans un tube de milieu sélectif simple concentration (4.4.a) et dans un tube d'eau peptonée (4.5).

8.7.2 Faire incuber les tubes (8.7.1) pendant 24 h dans un bain d'eau (5.4) réglé à $44\text{ °C} \pm 0,2\text{ °C}$.

8.8 EXAMEN DES TUBES

8.8.1 Production de gaz

Examiner les tubes incubés contenant le milieu sélectif à simple concentration (8.7.1).

Compter comme positif les tubes présentant un dégagement gazeux (1/10 du volume total de la cloche de Durham).

8.8.2 Production d'indole

Ajouter, dans chaque tube incubé contenant l'eau peptonée (8.7.1), 0,5 ml de réactif pour la recherche de l'indole (4.3). Mélanger et examiner. Une couleur rouge cerise indique la présence d'indole.

8.9 INTERPRÉTATION

On admet qu'il y a présence de coliformes fécaux lorsqu'il y a simultanément production de gaz (8.8.1) et présence d'indole (8.8.2).

9 EXPRESSION DES RÉSULTATS

Pour chaque échantillon, exprimer le résultat par le nombre le plus probable (NPP) de coliformes fécaux contenus dans 100 ml d'eau conchylicole ou de chair de coquillage.

- Si tous les tubes sont négatifs, le nombre NPP minimal sera précédé du signe : <
- Si tous les tubes sont positifs, le nombre NPP maximal sera précédé du signe : >

9.1 DÉTERMINATION DU COEFFICIENT NPP

Noter le nombre de tubes positifs dans chacune des trois séries consécutives de dilutions retenues (8.5.4), afin d'obtenir un nombre caractéristique à trois chiffres, dont :

- le chiffre des centaines correspond au nombre de tubes positifs de la dilution la plus faible ;
- celui des dizaines à la dilution intermédiaire ;
- celui des unités à la dilution la plus grande.

Se reporter à la table dressée en Annexe 1 pour déterminer l'indice NPP de la culture, c'est-à-dire la quantité moyenne de micro-organismes contenue dans chaque tube de la série la plus concentrée.

9.2 MODE DE CALCUL

Par exemple, pour 3 dilutions successives retenues :

	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Si le nombre de tubes positifs pour chacune des trois séries est :	2	0	0
Indice NPP (voir table, annexe 1) :		0,9	

L'indice 0,9 signifie que dans chaque tube contenant 10 ml de dilution 10^{-3} , on a introduit en moyenne 0,9 micro-organisme.

9.2.1 Cas des eaux conchylicoles

Dans 100 ml d'eau, il y a donc en moyenne :

$$\frac{0,9 \times 100}{10 \cdot 10^{-3}} = 9 \times 10^3 \text{ germes (1)}$$

9.2.2 Cas des coquillages

Multiplier par 3 le résultat obtenu pour tenir compte de la dilution effectuée en 7.2.7.

Dans 100 ml de chair de coquillage, il y a donc : $9 \times 10^3 \times 3$ germes (1).

9.2.3 Tables

Afin d'éviter les calculs, des tables ont été dressées permettant de lire directement le nombre moyen de micro-organismes contenus dans 100 ml de liquide analysé pour desensemencements de 3 séries de 3 tubes avec la principale combinaison utilisée (10 ml, 1 ml, 0,1 ml — voir annexe 2).

9.2.4 Cas particuliers

Pour desensemencements de 3 séries de 5 tubes (voir note en 8.5), se reporter à la table de l'annexe 3.

10 FIDÉLITÉ DE LA MÉTHODE

Il est rappelé que le nombre calculé est seulement le nombre le plus probable, aussi les résultats obtenus selon cette méthode doivent être utilisés avec prudence.

11 PROCÈS-VERBAL D'ESSAI

Le procès-verbal d'essai doit indiquer la méthode utilisée et les résultats obtenus. Il doit, en outre, mentionner tous les détails opératoires non prévus dans la présente norme, ou facultatifs, ainsi que les incidents éventuels susceptibles d'avoir agi sur les résultats.

Le procès-verbal d'essai doit donner tous les renseignements nécessaires à l'identification complète de l'échantillon.

(1) Exprimer le résultat par un chiffre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^n , n étant la puissance appropriée de 10.

ANNEXE 1

TABLE POUR LA DÉTERMINATION DE L'INDICE NPP
À PARTIR DU NOMBRE CARACTÉRISTIQUE

Nombre caractéristique			Indice NPP	Nombre caractéristique			Indice NPP
1 ^{ere}	2 ^{eme}	3 ^{eme}		1 ^{ere}	2 ^{eme}	3 ^{eme}	
0	0	0	—	2	0	0	0,9
0	0	1	0,3	2	0	1	1,4
0	0	2	0,6	2	0	2	2,0
0	0	3	0,9	2	0	3	2,6
0	1	0	0,3	2	1	0	1,5
0	1	1	0,6	2	1	1	2,0
0	1	2	0,9	2	1	2	2,7
0	1	3	1,2	2	1	3	3,4
0	2	0	0,6	2	2	0	2,1
0	2	1	0,9	2	2	1	2,6
0	2	2	1,2	2	2	2	3,5
0	2	3	1,6	2	2	3	4,4
0	3	0	0,9	2	3	0	2,9
0	3	1	1,3	2	3	1	3,6
0	3	2	1,6	2	3	2	4,4
0	3	3	1,9	2	3	3	5,3
1	0	0	0,4	3	0	0	2,3
1	0	1	0,7	3	0	1	3,9
1	0	2	1,1	3	0	2	6,4
1	0	3	1,5	3	0	3	9,5
1	1	0	0,7	3	1	0	4,3
1	1	1	1,1	3	1	1	7,5
1	1	2	1,5	3	1	2	12
1	1	3	1,9	3	1	3	16
1	2	0	1,1	3	2	0	9,3
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	2	2	2,0	3	2	2	21
1	2	3	2,4	3	2	3	29
1	3	0	1,6	3	3	0	24
1	3	1	2,0	3	3	1	46
1	3	2	2,4	3	3	2	110
1	3	3	2,9	3	3	3	> 110

ANNEXE 2

SYSTÈME D'ENSEMENCEMENT À 3 TUBES

Nombre le plus probable de micro-organismes dans 100 ml d'eau conchylicole
(Combinaison : 10 ml — 1 ml — 0,1 ml)

Nombre de tubes +			NPP	Nombre de tubes +			NPP	Nombre de tubes +			NPP	Nombre de tubes +			NPP
10 ml	1 ml	0,1 ml		10 ml	1 ml	0,1 ml		10 ml	1 ml	0,1 ml		10 ml	1 ml	0,1 ml	
0	0	0		1	0	0	3,6	2	0	0	9,1	3	0	0	23
0	0	1	3	1	0	1	7,2	2	0	1	14	3	0	1	39
0	0	2	6	1	0	2	11	2	0	2	20	3	0	2	64
0	0	3	9	1	0	3	15	2	0	3	26	3	0	3	95
0	1	0	3	1	1	0	7,3	2	1	0	15	3	1	0	43
0	1	1	6,1	1	1	1	11	2	1	1	20	3	1	1	75
0	1	2	9,2	1	1	2	15	2	1	2	27	3	1	2	120
0	1	3	12	1	1	3	19	2	1	3	34	3	1	3	160
0	2	0	6,2	1	2	0	11	2	2	0	21	3	2	0	93
0	2	1	9,3	1	2	1	15	2	2	1	28	3	2	1	150
0	2	2	12	1	2	2	20	2	2	2	35	3	2	2	210
0	2	3	16	1	2	3	24	2	2	3	42	3	2	3	290
0	3	0	9,4	1	3	0	16	2	3	0	29	3	3	0	240
0	3	1	13	1	3	1	20	2	3	1	36	3	3	1	460
0	3	2	16	1	3	2	24	2	3	2	44	3	3	2	1100
0	3	3	19	1	3	3	29	2	3	3	53	3	3	3	> 1100

Nombre le plus probable de micro-organismes dans 100 ml de chair de coquillages
(Combinaison choisie : 10 ml — 1 ml — 0,1 ml)

0	0	0		1	0	0	10,8	2	0	0	27,3	3	0	0	69
0	0	1	9,0	1	0	1	21,6	2	0	1	42	3	0	1	117
0	0	2	18,0	1	0	2	33	2	0	2	60	3	0	2	192
0	0	3	27,0	1	0	3	45	2	0	3	78	3	0	3	285
0	1	0	9,0	1	1	0	21,9	2	1	0	45	3	1	0	129
0	1	1	18,3	1	1	1	33	2	1	1	60	3	1	1	225
0	1	2	27,6	1	1	2	45	2	1	2	81	3	1	2	360
0	1	3	36	1	1	3	57	2	1	3	102	3	1	3	480
0	2	0	18,6	1	2	0	33	2	2	0	63	3	2	0	279
0	2	1	27,9	1	2	1	45	2	2	1	84	3	2	1	450
0	2	2	36	1	2	2	60	2	2	2	105	3	2	2	630
0	2	3	48	1	2	3	72	2	2	3	126	3	2	3	870
0	3	0	28,2	1	3	0	48	2	3	0	87	3	3	0	720
0	3	1	39	1	3	1	60	2	3	1	108	3	3	1	1380
0	3	2	48	1	3	2	72	2	3	2	132	3	3	2	3300
0	3	3	57	1	3	3	87	2	3	3	159	3	3	3	> 3300

ANNEXE 3

SYSTÈME D'ENSEMENCEMENT À 5 TUBES

Nombre le plus probable de micro-organismes dans 100 ml d'eau conchylicole et intervalle de confiance

Nombre de tubes donnant une réaction positive sur			NPP	Limites de confiance à 95 %	
5 tubes de 10 ml	5 tubes de 1 ml	5 tubes de 0,1 ml		Limite inférieure	Limite supérieure
0	0	1	2	< 0,5	7
0	1	0	2	< 0,5	7
0	2	0	4	< 0,5	11
1	0	0	2	< 0,5	7
1	0	1	4	< 0,5	11
1	1	0	4	< 0,5	11
1	1	1	6	< 0,5	15
1	2	0	6	< 0,5	15
2	0	0	5	< 0,5	13
2	0	1	7	0,5	17
2	1	0	7	1	17
2	1	1	9	2	21
2	2	0	9	2	21
2	3	0	12	3	28
3	0	0	8	1	19
3	0	1	11	2	25
3	1	0	11	2	25
3	1	1	14	4	34
3	2	0	14	4	34
3	2	1	17	5	46
3	3	0	17	5	46
4	0	0	13	3	31
4	0	1	17	5	46
4	1	0	17	5	46
4	1	1	21	7	63
4	1	2	26	9	78
4	2	0	22	7	67
4	2	1	26	9	78
4	3	0	27	9	80
4	3	1	33	11	93
4	4	0	34	12	96
5	0	0	23	7	70
5	0	1	31	11	89
5	0	2	43	15	114
5	1	0	33	11	93
5	1	1	46	16	120
5	1	2	63	21	154
5	2	0	49	17	126
5	2	1	70	23	168
5	2	2	94	28	219
5	3	0	79	25	187
5	3	1	109	31	253
5	3	2	141	37	343
5	3	3	175	44	503
5	4	0	130	35	302
5	4	1	172	43	486
5	4	2	221	57	698
5	4	3	278	90	849
5	4	4	345	117	999
5	5	0	240	66	754
5	5	1	348	118	1 005
5	5	2	542	180	1 045
5	5	3	918	303	3 222
5	5	4	1 609	635	5 805

Station n°	Avril 82	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier 83	Février	Mars	Moyenne
1	7 200	-	2 790	+72 000	273	690	7 200	+72 000	1 290	273	219	108	14 913
2	690	450	13 800	4 500	690	273	1 290	2 790	7 200	1 070	600	630	2 832
3	1 070	7 200	+72 000	2 790	+72 000	33 000	-	-	-	-	450	6 300	24 351
4	13 800	273	+72 000	1 290	7 200	219	690	33 000	2 790	13 800	450	-	13 228
5	-	-	108	-	273	2 790	-	1 290	-	-	-	-	1 115
6	-	-	450,273	-	108	450	-	2 790	33 000	-	108	-	5 311
7	6 300	690	90	-	690	108	1 290	33 000	+72 000	13 800	450	-	12 842
8	2 250	-	7 200	2 250	2 790	1 070	7 200	2 790	4 500	2 790	450	2 790	3 280
9	-	-	2 790	273	450	108	4 500	7 200	+72 000	4 500	273	2 790	9 488
10	4 500	1 290	690	2 790	1 290	690	+72 000	2 250	33 000	6 300	450	4 500	10 812
11	1 290	2 790	+72 000	630	7 200	690	+72 000	13 800	2 790	2 250	690	2 790	14 910
12	4 500	1 290	1 290	108	1 290	450	33 000	+72 000	+72 000	2 250	273	13 800	16 854
13	+72 000	2 790	+72 000	0	1 290	2 250	33 000	+72 000	2 790	690	13 800	7 200	23 317
14	1 290	4 500	-	690	690	+72 000	13 800	4 500	2 250	2 790	450	2 790	9 613
15	1 290	4 500	216	108	1 290	+72 000	1 290	1 290	+72 000	2 790	-	33 000	17 252
16	2 790	2 790	273	7 200	13 800	690	33 000	690	2 790	2 790	-	+72 000	12 619
17	2 790	6 300	219	13 800	+72 000	4 500	13 800	1 290	-	33 000	-	33 000	18 069
18	690	1 290	1 290	+72 000	1 080	1 290	13 800	7 200	13 800	7 200	-	13 800	12 130
19	690	13 800	+72 000	13 800	6 300	0	+72 000	13 800	13 800	2 790	273	+72 000	23 437
20	7 200	+72 000	90	690	13 800	273	33 000	7 200	7 200	7 200	1 290	33 000	15 245

Station n°	Avril 82	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier 83	Février	Mars	Moyenne
21	690	13 800	273,108	273	273,690	273	+72 000	1 290	2 790	6 300	1 290	4 500	7 467
22	690	33 000	108	2 250	1 290	6 300	2 790	7 200	-	4 500	2 790	13 800	6 792
23	13 800	1 290	2 790	1 290	2 790	33 000	33 000	+72 000	13 800	1 290	-	13 800	17 168
24	13 800	2 790	+72 000	33 000	33 000	+72 000	+72 000	+72 000	33 000	7 200	-	+72 000	43 890
25	13 800	108	13 800	13 800	7 200	13 800	+72 000	+72 000	7 200	2 790	-	+72 000	26 227
26	7 200	2 790	4 500	13 800	13 800	4 500	+72 000	13 800	-	-	-	+72 000	22 710
27	420	-	+72 000	4 500	33 000	+72 000	13 800	72 000	-	2 250	-	-	33 746
28	33 000	+33 000	+33 000	+33 000	+33 000	+72 000	+72 000	72 000	+72 000	72 000	+72 000	+72 000	55 750
29	7 200	33 000	33 000	13 800	33 000	33 000	33 000	33 000	+72 000	4 500	7 200	+72 000	31 225
30	273	2 790	4 500	273	690	273	1 290	4 500	2 250	690	1 290	33 000	4 318
31	13 800	7 200	7 200	1 290	273	4 500	13 800	33 000	4 800	2 790	4 500	4 500	8 138
32	2 790	13 800	840	2 790	1 290	33 000	2 250	2 790	7 200	72 000	2 790	2 790	12 027
33	273	3 600	1 290	1 290	690	630	690	273	273	690	273	7 200	1 431
Moyenne	7 936	9 968	18 735	10 543	11 055	16 328	29 116	25 211	23 353	9 769	4 886	26 432	16 137

DENOMBREMENT DES COLIFORMES TOTAUX

Station n°	Avril 82	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier 83	Février	Mars	Moyenne
1	1 290	-	273	840	108	690	450	7 200	273	108	90	0	1 029
2	690	273	7 200	4 500	108	108	273	1 290	2 790	690	450	219	1 549
3	273	1 290	+72 000	1 290	13 800	1 290	-	-	-	-	108	1 290	11 418
4	7 200	0	273	690	1 290	108	273	2 790	0	7 200	450	-	1 843
5	-	-	0	-	108	273	-	690	-	-	-	-	268
6	-	-	90,108	-	108	450	-	690	690	-	0	-	305
7	1 290	108	90	-	690	0	273	7 200	90	4 500	450	-	1 469
8	273	-	7 200	600	690	273	7 200	690	273	1 290	108	1 290	1 808
9	-	-	690	108	219	0	4 500	1 290	273	1 290	108	690	917
10	2 250	90	273	2 790	108	0	+72 000	1 290	273	4 500	90	690	7 029
11	1 290	1 290	183	90	630	108	600	4 500	273	1 070	273	1 290	966
12	2 250	450	108	108	1 290	273	33 000	4 500	273	2 250	273	13 800	4 881
13	108	2 790	2 790	0	0	2 250	3 600	7 200	690	690	450	870	1 786
14	1 290	4 500	-	690	690	33 000	2 790	2 790	690	2 790	450	690	4 579
15	108	4 500	0	108	0	108	1 290	1 290	2 250	2 790	-	33 000	4 131
16	273	450	108	273	450	0	7 200	690	690	2 790	-	33 000	4 175
17	1 290	2 790	0	273	3 600	0	7 200	1 290	-	1 290	-	33 000	5 073
18	273	690	108	1 290	108	219	2 790	7 200	13 800	1 290	-	13 800	3 779
19	273	13 800	+72 000	690	690	0	33 000	4 500	7 200	1 290	273	+72 000	17 143
20	1 290	33 000	0	108	2 790	108	1 290	630	2 790	2 790	1 290	4 500	4 215

Station n°	Avril 82	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier 83	Février	Mars	Moyenne
21	108	2 790	0,108	273	0,273	0	13 800	690	1 290	273	1 290	1 290	1 585
22	108	33 000	108	1 070	90	1 290	1 290	1 290	-	4 500	690	7 200	4 603
23	1 290	1 290	630	690	1 290	2 790	13 800	33 000	1 290	1 290	-	13 800	6 469
24	4 500	2 790	13 800	1 290	1 290	13 800	33 000	1 290	33 000	7 200	-	+72 000	16 724
25	13 800	108	2 790	690	273	1 290	6 300	690	1 290	1 290	-	+72 000	9 138
26	1 290	690	219	1 290	4 500	690	+72 000	2 250	-	-	-	33 000	12 881
27	420	-	33 000	1 290	13 800	13 800	2 790	33 000	-	690	-	-	12 349
28	3 600	33 000	+33 000	+33 000	+33 000	+33 000	+72 000	33 000	33 000	13 800	+72 000	+72 000	38 700
29	450	2 250	4 500	2 790	273	2 790	2 790	2 790	2 250	690	2 790	+72 000	8 030
30	0	2 790	1 290	273	690	0	420	90	1 290	690	108	2 250	824
31	2 790	1 290	1 290	690	108	1 290	1 290	4 500	2 250	108	2 790	1 290	1 640
32	690	690	108	1 290	1 290	2 790	1 170	1 290	690	3 600	1 290	1 290	1 349
33	108	273	1 290	1 290	108	108	273	0	273	273	108	630	394
Moyenne	1 695	5 443	7 518	2 012	2 484	3 421	13 288	5 362	4 071	2 518	3 736	19 957	5 850

DENOMBREMENT DES COLIFORMES FECAUX

Station n°	Avril 82	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier 83	Février	Mars	Moyenne
1	2 250	-	630	108	108	450	690	600	1 290	2 790	1 290	630	985
2	273	450	7 200	7 200	2 790	0	1 290	13 800	1 320	7 200	186	2 790	3 708
3	0	108	13 800	330	330	690	-	-	-	-	450	219	1 991
4	690	108	108	273	1 290	273	450	420	450	2 790	273	-	648
5	-	-	108	-	690	273	-	2 790	-	-	-	-	965
6	-	-	0,108	-	33 000	690	-	13 800	330	-	2 790	-	7 245
7	273	108	90	-	690	0	690	870	450	4 500	1 290	-	896
8	1 290	-	13 800	450	108	0	108	330	330	690	7 200	4 500	2 637
9	-	-	7 200	219	450	108	273	279	282	2 790	2 790	7 200	2 159
10	1 290	273	450	0	1 070	690	219	33 000	450	7 200	2 790	7 200	4 553
11	273	1 290	1 290	108	219	690	273	7 200	2 790	1 290	7 200	7 200	2 485
12	273	690	690	2 790	1 290	219	1 290	7 200	183	+72 000	219	2 790	7 469
13	273	630	108	0	36	2 790	+72 000	4 500	1 080	1 290	450	4 500	7 305
14	450	1 290	-	1 290	186	13 800	2 790	13 800	840	2 790	108	2 790	3 649
15	0	273	0	0	108	108	7 200	690	273	7 200	-	13 800	2 696
16	0	273	0	0	216	0	7 200	330	219	7 200	-	13 800	2 658
17	0	273	0	108	450	0	33 000	219	-	13 800	-	13 800	6 165
18	0	690	108	108	273	0	6 300	273	360	+72 000	-	13 800	8 537
19	273	1 290	0	1 290	2 790	0	13 800	1 080	7 200	7 200	1 290	33 000	5 768
20	273	690	273	108	2 250	108	330	1 290	13 800	1 320	13 800	7 200	3 453

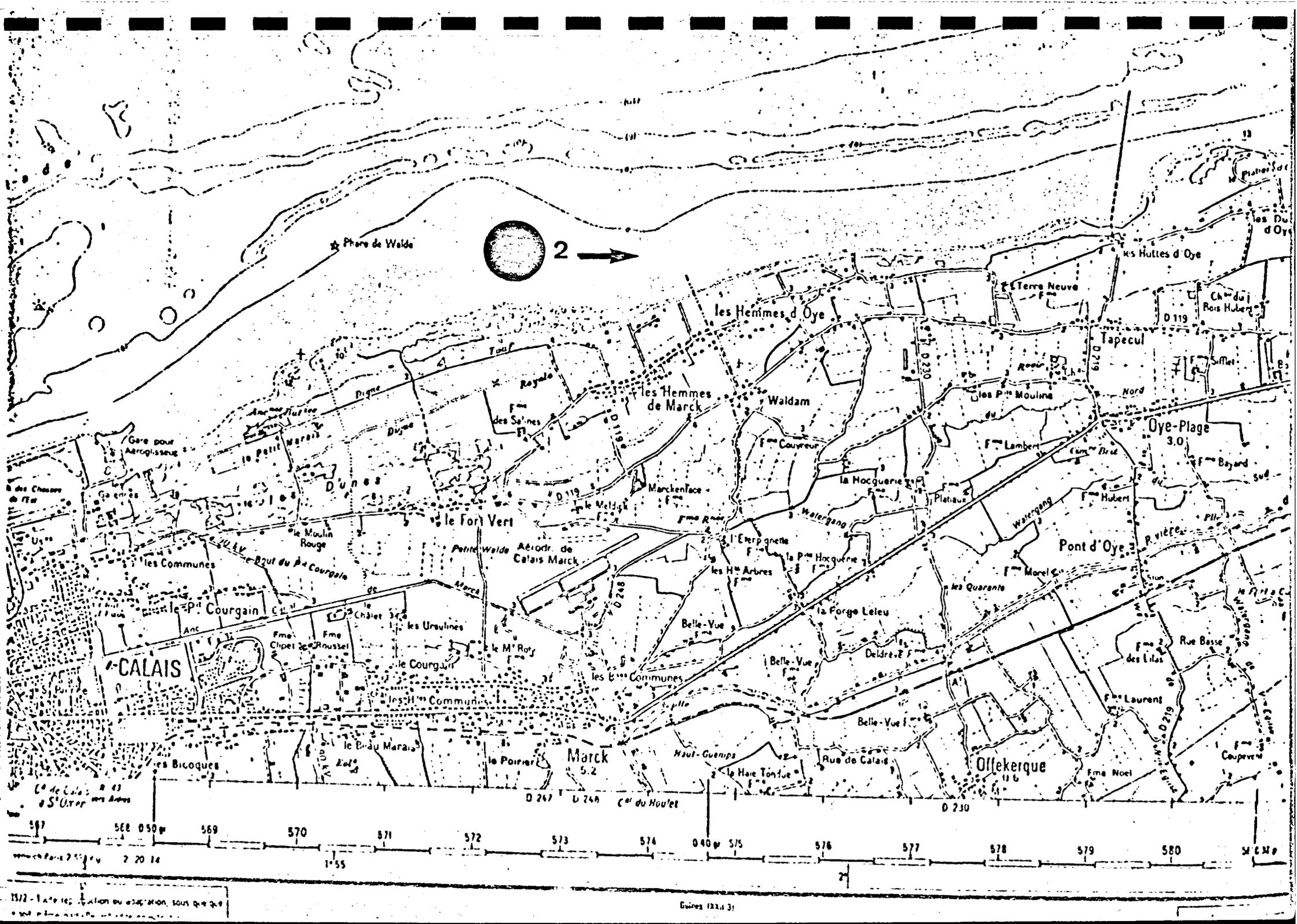
Station n°	Avril 82	Mai	Juin	Juillet	Août	Septembre	Octobre	Novembre	Décembre	Janvier 83	Février	Mars	Moyenne
21	108	840	690,0	0	1 070,0	108	630	108	690	33 000	13 800	7 200	4 160
22	1 290	108	0	0	273	0	690	690	-	4 500	2 790	33 000	3 940
23	273	108	630	450	1 290	1 290	7 200	+72 000	+72 000	7 200	-	33 000	17 767
24	3 600	273	7 200	1 290	690	1 290	33 000	1 290	+72 000	870	-	7 200	11 700
25	+72 000	273	2 790	273	0	450	7 200	+72 000	13 800	7 200	-	7 200	16 653
26	+72 000	330	1 290	90	108	7 200	186	7 200	-	-	-	6 300	10 523
27	273	-	2 250	0	0	2 790	273	13 800	-	33 000	-	-	6 548
28	13 800	7 200	33 000	+33 000	+33 000	+33 000	+72 000	72 000	+72 000	33 000	+72 000	33 000	42 250
29	630	2 790	33 000	7 200	690	7 200	+72 000	13 800	+72 000	2 250	690	7 200	18 287
30	108	1 290	2 250	480	7 200	870	6 300	1 170	4 500	7 200	690	4 500	3 046
31	33 000	7 200	7 200	7 200	0	7 200	+72 000	13 800	+72 000	2 790	4 500	1 290	19 015
32	690	7 200	2 790	7 200	13 800	2 790	8 700	13 800	33 000	6 300	7 200	2 790	8 855
33	1 290	7 200	2 790	8 700	870	840	1 170	108	2 790	690	690	4 500	2 636
Moyenne	6 988	1 601	4 171	2 675	3 156	2 603	14 308	12 007	16 541	12 140	6 282	10 086	7 314

DENOMBREMENT DES STREPTOCOQUES FECAUX

	Ambleteuse (Le Platier)	Le Portel (Fort de l'Heurt)
Avril 82	Absence	Absence
Mai	Absence	Absence
Juin	Absence (Enterobacter cloacae)	Absence
Juillet	Absence	Absence (Enterobacter cloacae)
Août	Absence	Absence (Klebsiella pneumoniae oxytoca)
Septembre	Absence	Absence
Octobre	Absence	Absence
	Ambleteuse (Les Fascines)	Le Portel (Rieu de Cat)
Novembre	Absence (Enterobacter cloacae)	Absence
Décembre	Absence	Absence
Janvier 83	Absence (Shigella Dysenteria)	Absence
Février	Absence	-
Mars	Absence	Absence

RECHERCHE DES SALMONELLES

(Entre parenthèses : identification par galerie API)



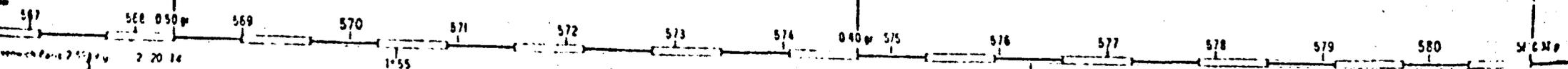
Gare pour
Aéropostes

CALAIS

Marck
5.2

Offekerque
11.6

Calais
S'Uster

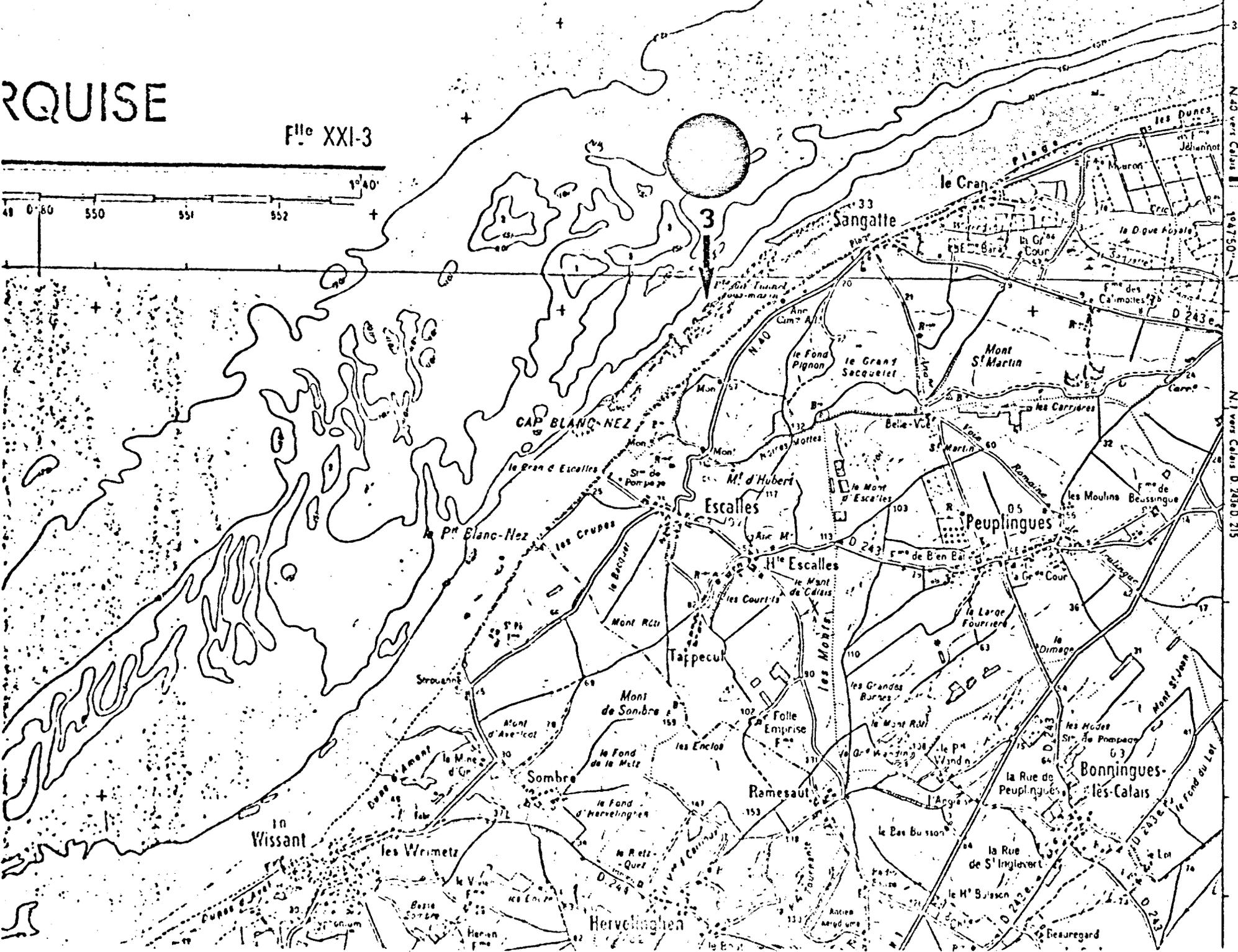
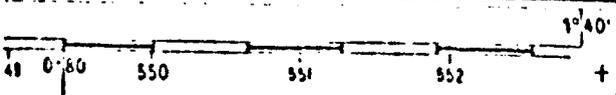


1372 - 1ère réimpression de l'édition sous le régime
de la loi n° 259 du 18 juillet 1953

Guines (22.1.3)

RQUISE

F.º XXI-3



N.40 vers Calais

Calais (A.M.17)

104750

50° 56' 24"

56 60

360

N.1 vers Calais D.243 D.215

50° 55'

359

358

357

356

355

354

353

352

351

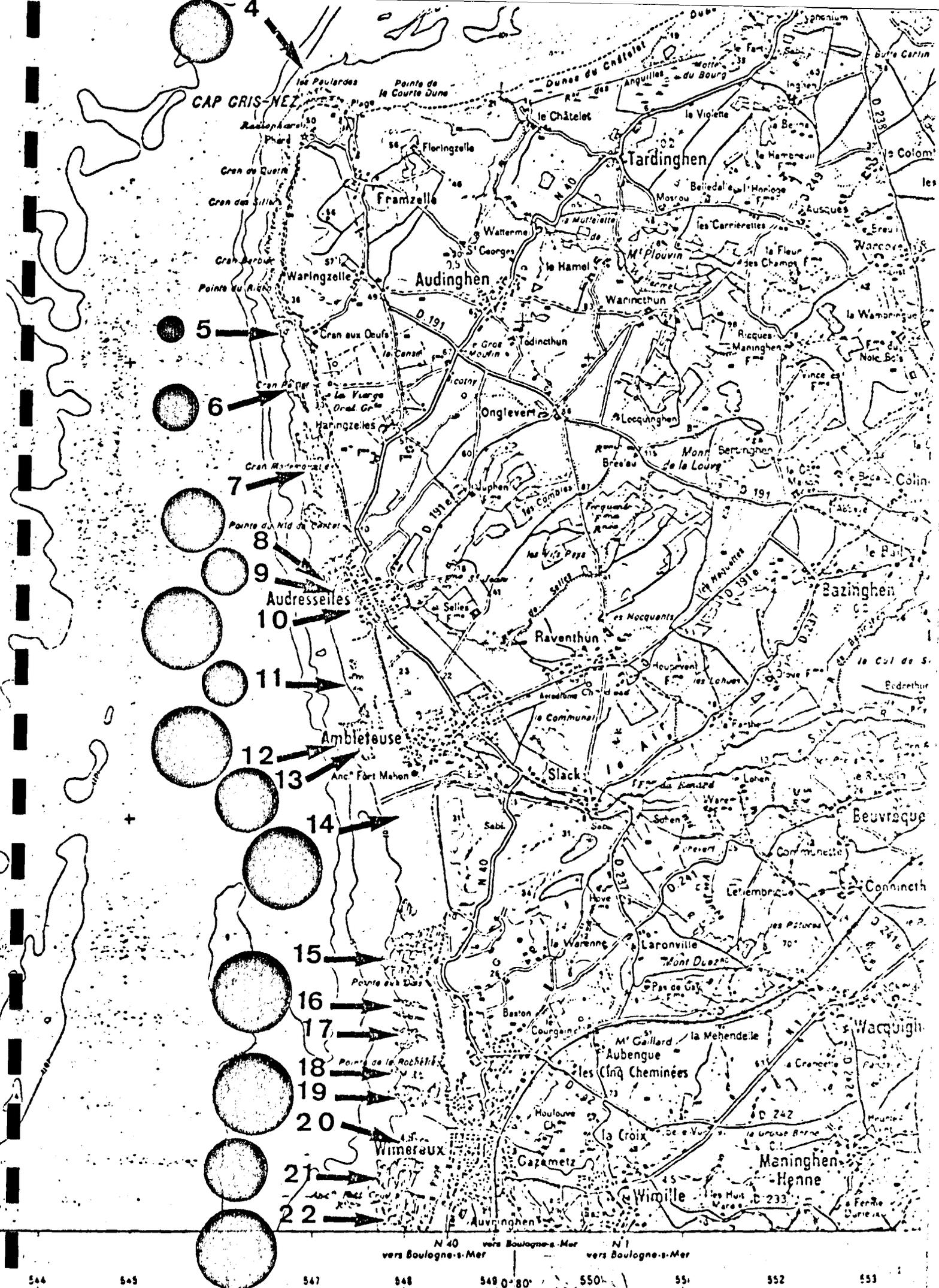
350

349

348

347

346



CAP GRIS-NEZ

Audinghen

Tardinghen

Audresseilles

Ambletouse

Raventhun

Bazinghen

Wimereux

Maninghen

Wimille

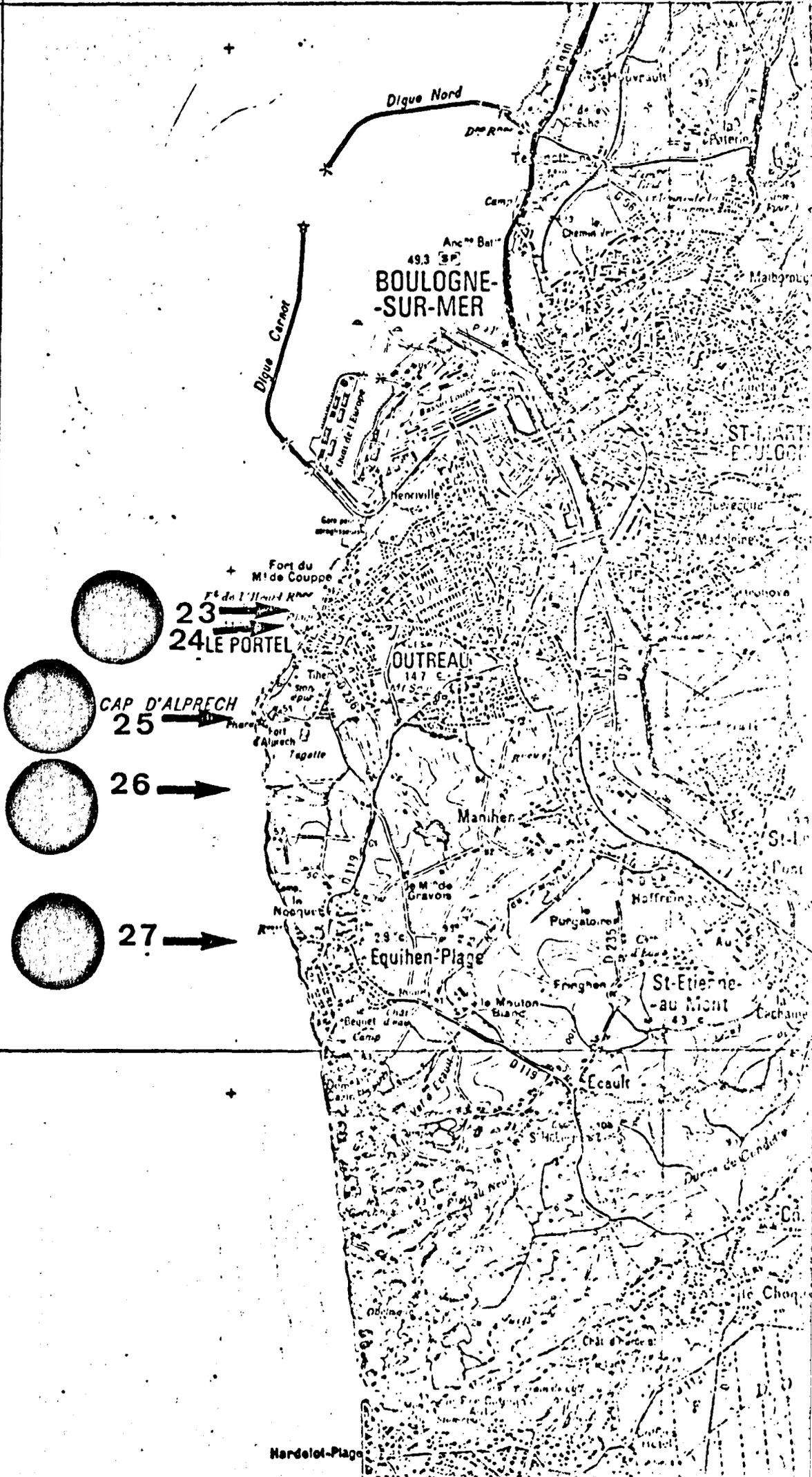
N 40 vers Boulogne-s-Mer N 1 vers Boulogne-s-Mer

544 545 547 548 549 0' 80" 550' 551 552 553

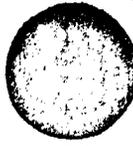
1°35'

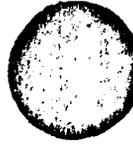
1°40'

Boulogne-sur-Mer (281 4)



- 

 23 →
 24 LE PORTEL
- 

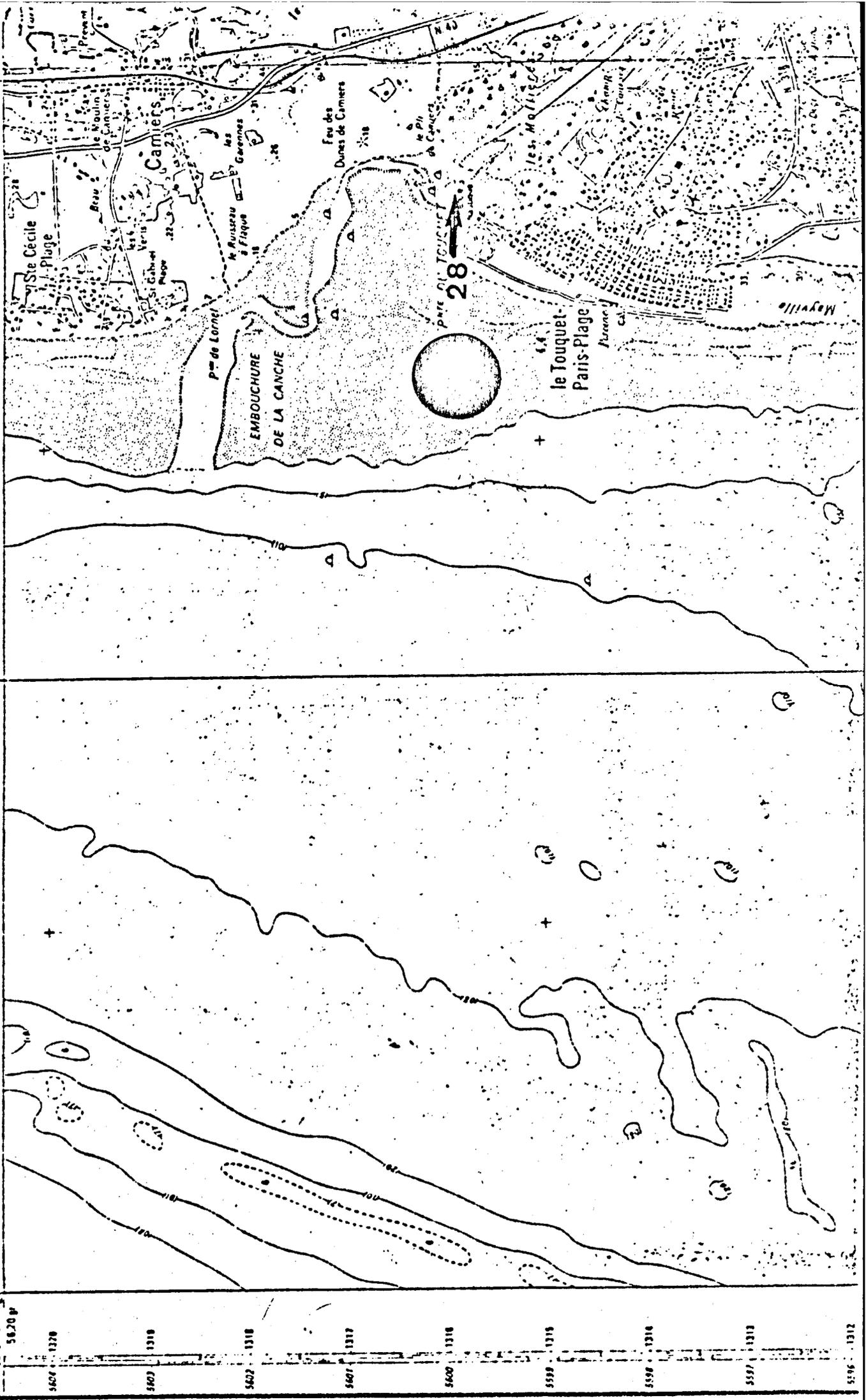
 CAP D'ALPRECH
 25 →
- 

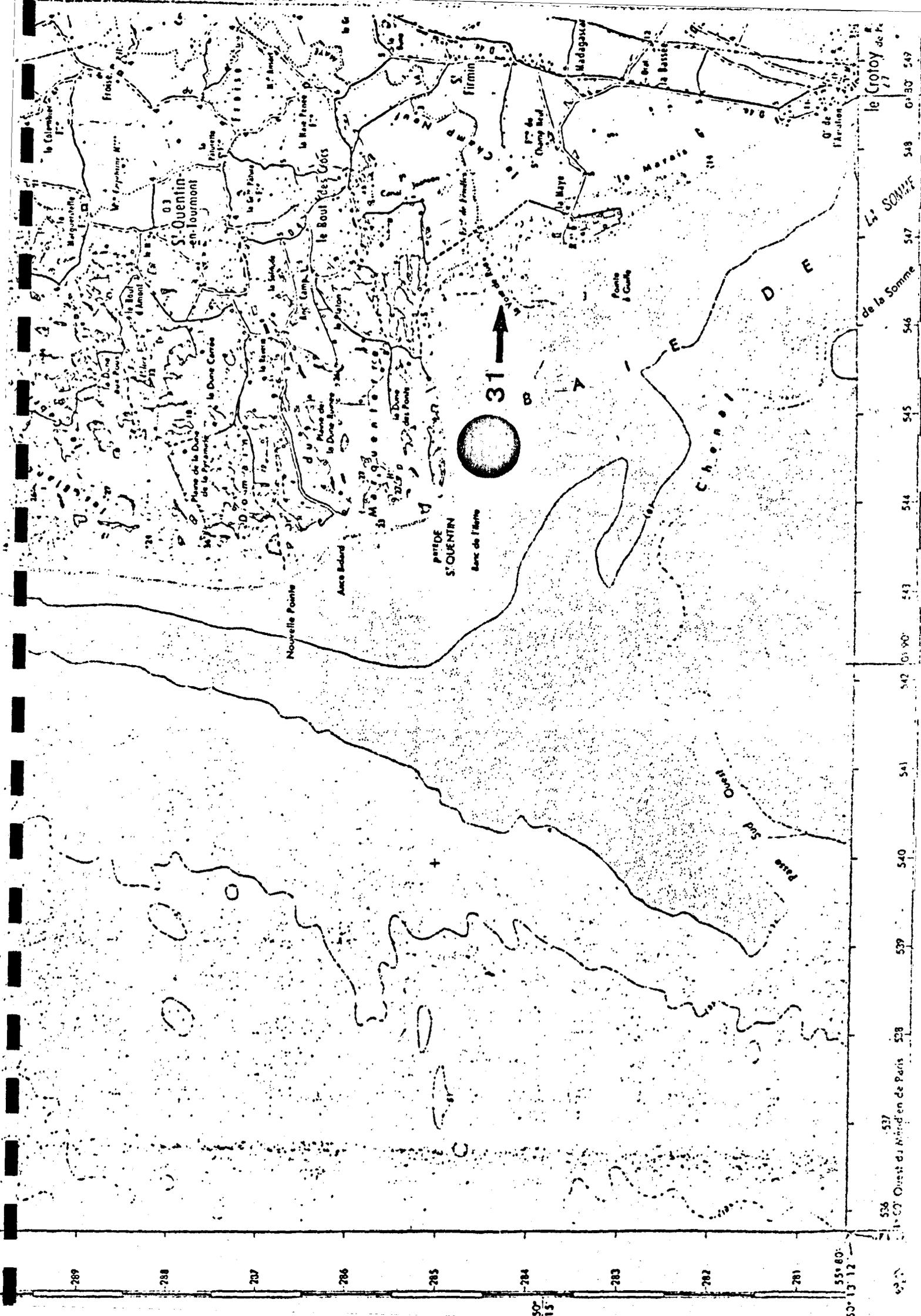
 26 →
- 

 27 →

CARTE DE FRANCE - 1:50 000

390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402
 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550
 5620 5622 5624 5626 5628 5630 5632 5634 5636 5638 5640 5642 5644 5646 5648 5650
 5600 5602 5604 5606 5608 5610 5612 5614 5616 5618 5620 5622 5624 5626 5628 5630 5632 5634 5636 5638 5640 5642 5644 5646 5648 5650





536 537
Ouest du Nordien de Paris 538 539 540 541 542 543 544 545 546
de la Somme 547 548 549 550
le Crotoy de Pe 551

289 288 287 286 285 284 283 282 281
55° 60' 13' 12"



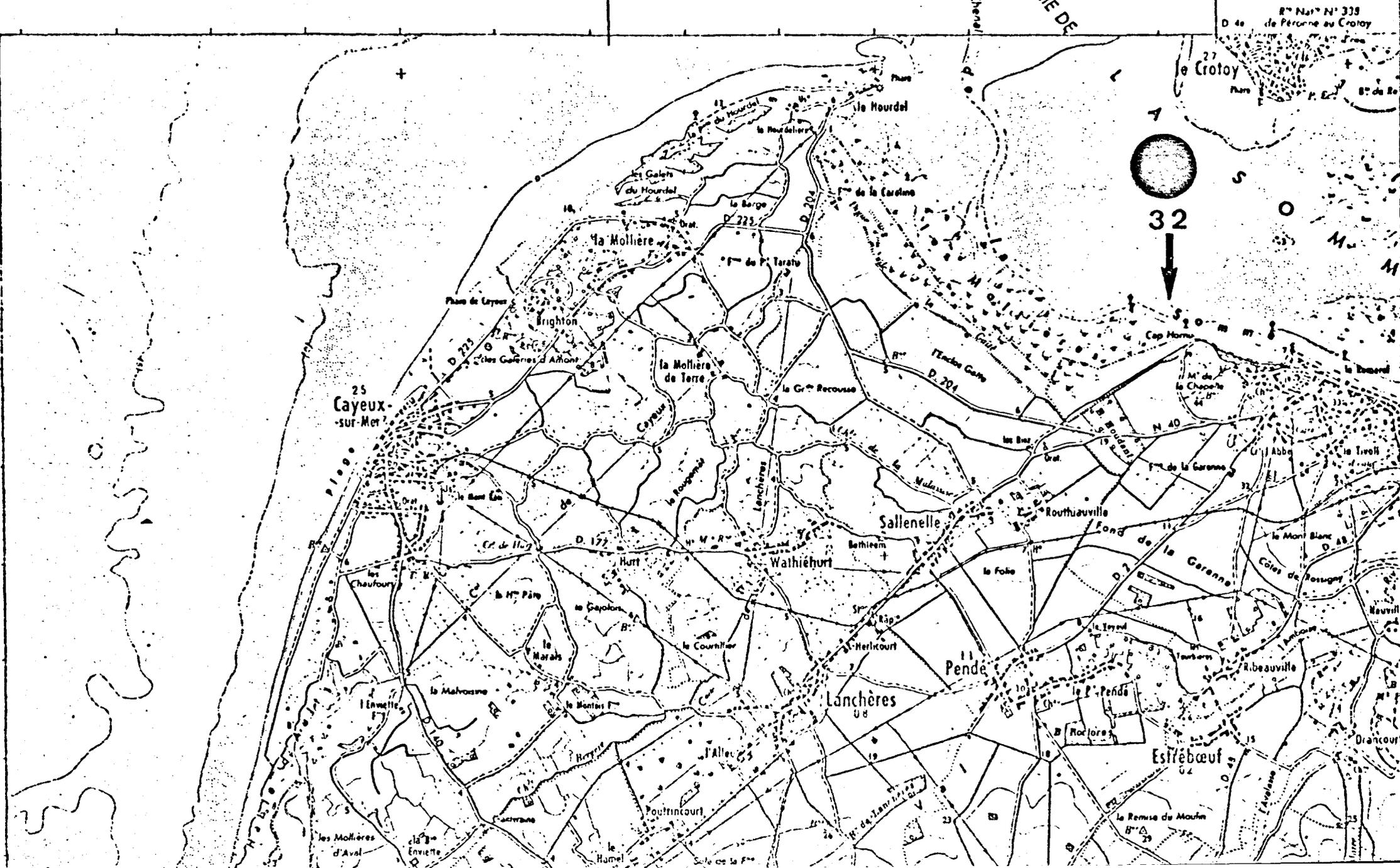
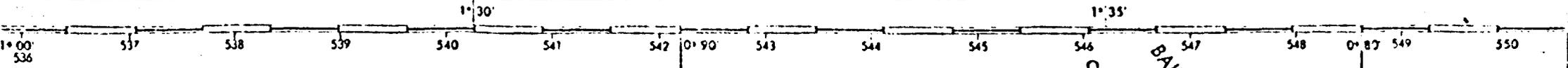
PETITE S'QUENTIN
Banc de l'ierre

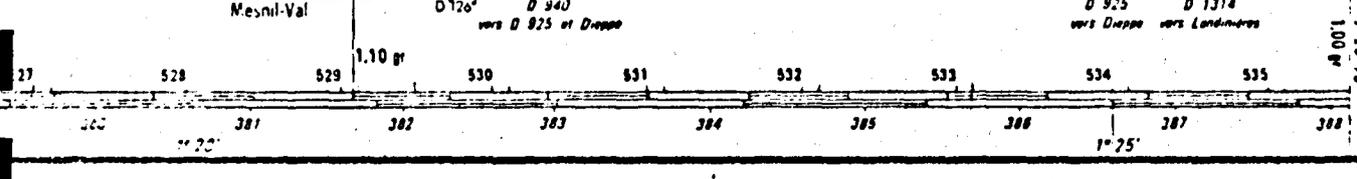
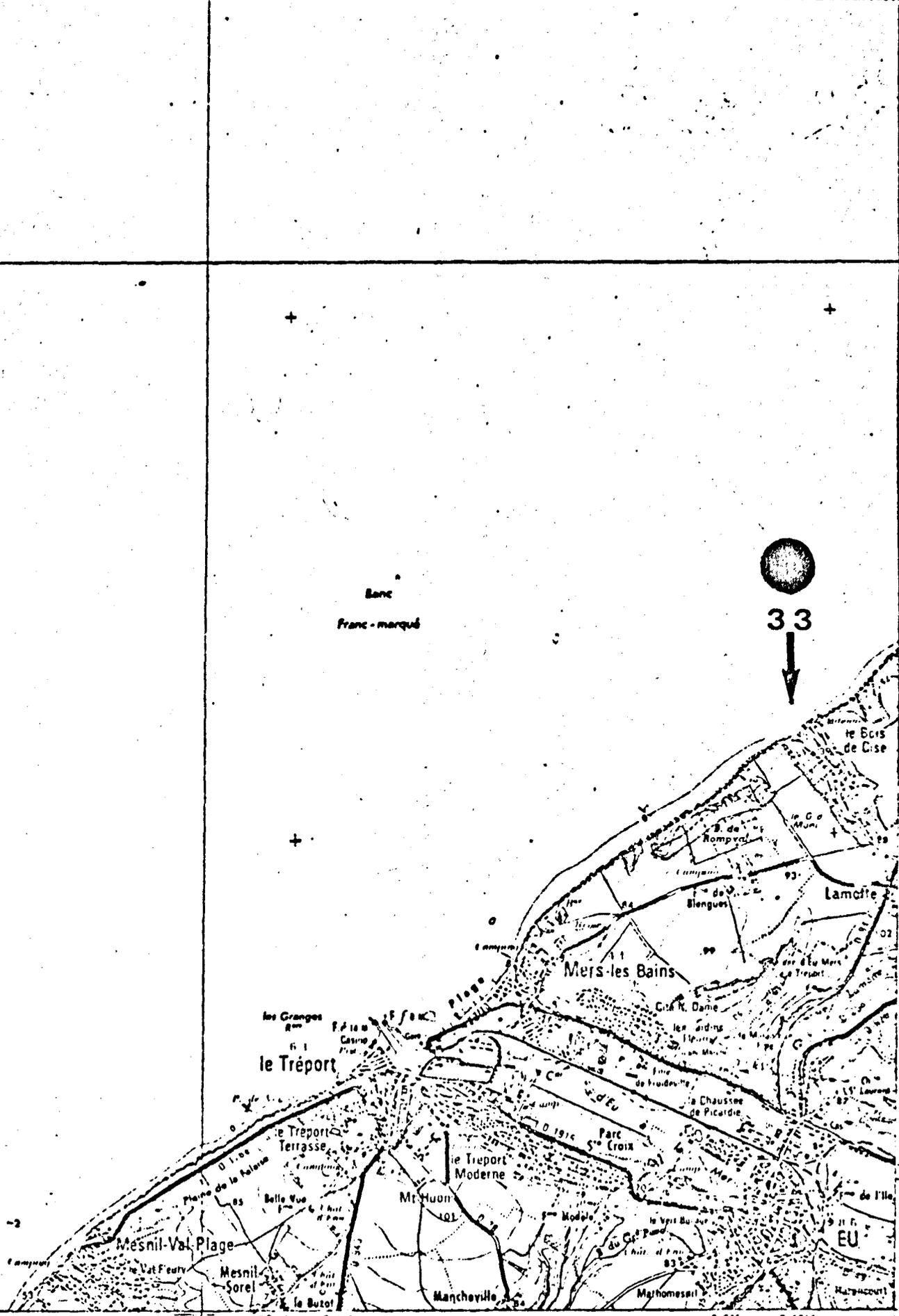
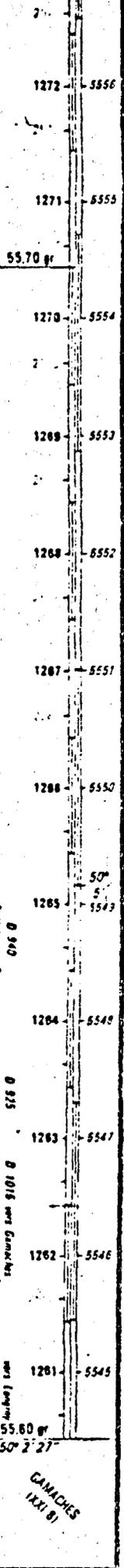
S'QUENTIN-en-tourmont

le Somme

le Boul des Cross

le Crotoy de Pe





D 940
D 925
D 1016 vers Gamaches
D 925
D 1314 vers Dieppe vers Landeville
50' 2' 27"

- | | | | | | | |
|---|----|---|---|-----|------|---|
| Population en milliers d'habitants | ▲ | ● | ◀ | 0.1 | 0.08 | Pont. Passerelle. Gué. Bac |
| Calvaire, tombe, statue religieuse, Cimetière | ○ | ⊗ | ⊙ | ⊙ | ⊙ | Lac, étang permanent. Étang à niveau variable. Étang périodique. Marais |
| Autre | Tr | ⊙ | ⊙ | ⊙ | ⊙ | Source, fontaine, Puits, citernes, Châteaux d'eau, Réservoir |
| | | | | | | Chem. |

ARRÊTÉ INTERMINISTÉRIEL
DU 12 OCTOBRE 1976

fixant les normes de salubrité
des zones conchyliques

PM. f. 3

76-10-12/1

A insérer après
76-06-24/3

Pièce jointe : Une annexe technique.

LE MINISTRE DE LA SANTÉ,

LE SECRÉTAIRE D'ÉTAT AUPRÈS DU MINISTRE DE L'ÉQUIPEMENT (TRANSPORTS),

Vu le décret du 20 août 1939 (1), modifié par les décrets n° 48-1324 du 25 août 1948 (2) et n° 69-578 du 12 juin 1969 (3);

Vu l'avis émis par le conseil supérieur d'hygiène publique de France au cours de sa séance du 26 avril 1976,

ARRÊTENT :

ARTICLE PREMIER. — La salubrité des eaux conchyliques est déterminée sur la base d'isolement de germes tests de contamination fécale présents dans les coquillages vivant au lieu considéré.

ART. 2. — L'évaluation de la contamination est exprimée par les nombres les plus probables de coliformes fécaux trouvés dans 100 ml de chair de coquillages broyée et diluée dans les conditions fixées à l'annexe technique au présent arrêté.

(1) *BM*, 1939, p. 424.

(2) *A.A.M.M.*, p. 703.

(3) *BM*, 1969, p. 899.

Pour tenir compte des fluctuations naturelles dans la charge microbienne des eaux marines, l'évaluation s'effectue sur 26 prélèvements échelonnés sur 12 mois consécutifs.

ART. 3. — Remplissent les conditions nécessaires pour être classées salubres les zones dans lesquelles le nombre de coliformes fécaux par 100 ml de chair de coquillages ainsi déterminé est inférieur ou égal à 300.

Les normes sont considérées comme respectées si le nombre des résultats en dépassement n'exécède pas 5 en 12 mois consécutifs, les teneurs en coliformes fécaux pour 100 ml de chair restant dans ce cas inférieures à 1 000 pour trois des prélèvements et à 3 000 pour les deux autres.

ART. 4. — Les zones ne répondant pas aux conditions fixées dans l'article 3 font l'objet de la procédure de classement en zone insalubre. La récolte des coquillages y est interdite, sauf autorisations données dans les conditions fixées à l'article 5.

ART. 5. — Dans les zones classées insalubres, seule la récolte des coquillages qui doivent faire ensuite l'objet d'une épuration ou d'un reparage, peut être autorisée par le directeur des Affaires maritimes, après avis conforme du Directeur de l'Institut scientifique et technique des pêches maritimes.

Toutefois, lorsque la teneur en coliformes fécaux dépasse 10 000 par 100 ml de chair de coquillages dans 25 % des échantillons, l'autorisation requiert en outre l'avis conforme du Directeur départemental de l'action sanitaire et sociale.

ART. 6. — Le directeur général de la Santé, le directeur des pêches maritimes et le directeur de l'Institut scientifique et technique des pêches maritimes sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'application du présent arrêté, qui sera publié au *Journal officiel* de la République française et au Bulletin officiel de la Marine marchande.

Fait à Paris, le 12 octobre 1976.

Pour le secrétaire d'État
auprès du ministre de l'Équipement (Transports) :
Le secrétaire général de la Marine marchande,
Jean CHAPON.

Le ministre de la Santé,

Pour le ministre et par délégation :

Le Directeur général de la Santé,
Professeur Pierre DENOIX.