
Etude sur les risques de contamination microbiologique des oursins

Etude sur les risques de contamination microbiologique des oursins

Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : - RST.ODE/LER-PAC/13-28		Date de publication : Déc. 13
Diffusion : libre : <input checked="" type="checkbox"/> restreinte : <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/>		Nombre de pages : 31
Validé par : Bruno Andral		Bibliographie : Oui
Adresse électronique : Bruno.Andral@ifremer.fr		Illustration(s) : Oui
Langue du rapport : FR		
Titre de l'article Etude sur les risques de contamination microbiologique des oursins		
Contrat n° Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> Rapport définitif <input checked="" type="checkbox"/>		
Auteurs principaux : Fabienne Chavanon Marc Bouchoucha	Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer/ODE/UL/LEPAC	
Collaborateurs : Romain Bricout Michelle Brochen Eric Emery Benoist de Vogüé Christophe Ravel		
Encadrement : Marc Bouchoucha		
Cadre de la recherche : Etude microbiologique		
Destinataire : Coordination REMI - DGAL		
Résumé :		
<p>L'objet principal de cette étude est d'évaluer et suivre les niveaux de contamination des oursins dans un secteur identifié comme exposé aux sources de contamination microbiologique, afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les oursins, organismes brouteurs et non filtreurs, sont peu ou pas sensibles à la contamination microbiologique par rapport à des coquillages du groupe III.</p> <p>Les résultats des analyses montrent que pour cette zone classée A par arrêté préfectoral, les oursins, sont susceptibles d'être fortement contaminés lors de pollutions bactériologiques.</p> <p>La contamination peut être plus importante que dans les moules, organismes filtreurs.</p>		
Mots-clés : Microbiologie, classement de zone, oursin		

Sommaire

1. Introduction	5
2. Les oursins	6
2.1. Les Echinodermes	6
2.2. Les Echinides	7
2.3. La réglementation de la Pêche sous-marine des oursins en PACA	7
2.4. Classement sanitaire	9
3. Matériel et méthodes	10
3.1. Site de l'étude	10
3.2. Estimation de stock d'oursins	12
3.3. Protocole d'échantillonnage	12
3.3.1. Les moules en station artificielle	12
3.3.2. Les oursins	14
3.3.3. Les prélèvements	14
3.4. Analyses	15
4. Résultats	16
4.1. Estimation des densités d'oursins	16
4.2. Résultats des analyses	16
5. Discussions et conclusions	20
6. Bibliographie	21
Annexe 1 : Calendrier prévisionnel des prélèvements	22
Annexe 2 : Méthode d'analyse	23
Annexe 3 : Résultats de la pluviométrie	29
Annexe 4 : Résultats microbiologiques	31



1. Introduction

Le règlement (CE) n°854/2004 relatif aux règles générales d'hygiène applicables à toutes les denrées alimentaires, prévoit le classement et la surveillance microbiologique des échinodermes (groupe I).

Il est traditionnellement admis que les oursins, organismes brouteurs, se contaminent peu lors de pollutions bactériologiques de l'eau de mer. Parmi les rares données disponibles dans la littérature, les résultats de dénombrement d'*Escherichia coli* dans les échinodermes de la rade de Marseille réalisées par J.J. Console (1997) n'ont pas mis en évidence de contamination significative. Sans être réellement une étude de classement de zone, ce travail a servi de base au classement en A de l'ensemble du littoral PACA pour le groupe I, en excluant par principe de précaution les zones directement soumises aux rejets urbains ou à des activités portuaires ou industrielles.


En Méditerranée, la zone de pêche des oursins est très étendue et très morcelée, il est particulièrement difficile à la fois de conduire une étude sanitaire avec identification des sources de contamination, de définir une stratégie d'échantillonnage pertinente et de mettre en oeuvre le suivi opérationnel des niveaux de contamination dans des coûts rationnels.

L'objet principal de cette étude est d'évaluer et suivre les niveaux de contamination des oursins dans un secteur identifié comme exposé aux sources de contamination microbiologique, afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les oursins, organismes brouteurs et non filtreurs, sont peu ou pas sensibles à la contamination microbiologique par rapport à des coquillages du groupe III.

2. Les oursins

2.1. Les Echinodermes

Les oursins appartiennent à l'embranchement des Echinodermes (environ 7 000 espèces), exclusivement marins. Cet embranchement se divise en cinq classes :

- Echinides (oursins, ~ 900 espèces),  © Ifremer - Olivier Barbaroux
- Astérides (étoiles des mers),  © Ifremer - Olivier Barbaroux
- Holothurides (concombres des mers),  © J. Ducruet
- Ophiurides (ophiures),  © Frédéric André
- Crinoïdes (lis des mers),  © Daniel Guip

Ils présentent trois caractères essentiels qui les distinguent des autres invertébrés marins :

- une symétrie rayonnée pentamère, à laquelle peut se superposer une symétrie bilatérale,
- un squelette externe formé de nombreuses plaques calcaires (articulées, soudées ou diffus,
- un appareil aquifère qui n'existe chez aucun autre animal et qui permet notamment, la turgescence ou la rétractation des tubes ambulacraires et des tentacules.

2.2. Les Echinides

Les Echinides se divisent en deux grands groupes :

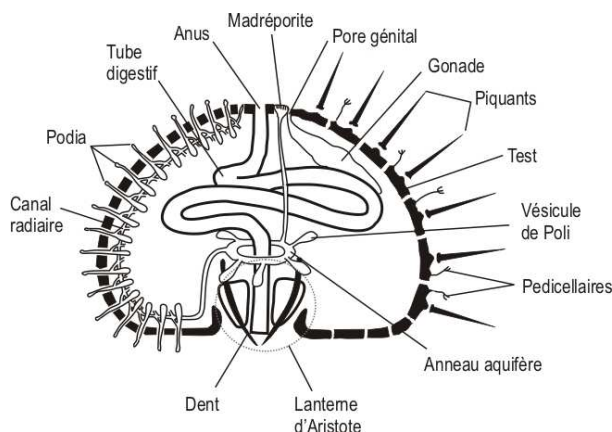
- les oursins réguliers,
- les oursins irréguliers.

Le long des côtes méditerranéennes, une espèce seulement d'Echinides réguliers est exploitée commercialement : l'oursin violet (*Paracentrotus lividus*).

Les principales caractéristiques sont :

- Forme du corps : globuleux (en général),
- Particularités : bouche et anus occupent respectivement chacun des pôles,
- Les Podias sont présents sur la presque totalité du corps,
- Epines et piquants (longs ou courts) doivent être considérés comme des annexes du squelette.

Le Squelette s'appelle le test (ensemble rigide subsphérique).



Section transversale d'un oursin régulier, © Jean Maurice Poutiers

Il vit sur les côtes provençales dans les eaux à faible profondeur, jusqu'à une trentaine de mètres, dans les rochers et prairies sous-marines.

2.3. La réglementation de la Pêche sous-marine des oursins en PACA

La pêche des oursins sur les gisements naturels est répartie de façon diffuse sur l'ensemble du littoral régional.

L'arrêté du 27 octobre 2008 fixe la période autorisée pour la pêche des oursins dans le ressort des Comités Locaux des Pêches Maritimes et des Élevages Marins de Martigues, de Marseille, du Var et des Alpes Maritimes, soit du 1er novembre au 15 avril. En dehors de cette période tout prélèvement d'oursins est interdit.

La pêche est autorisée, en apnée ou à pied, dans les Alpes maritimes, le Var et les Bouches du Rhône. Seuls les professionnels pêchent en scaphandre autonome dans la région de Marseille. Avec leur licence, les professionnels ont aussi un numéro d'agrément sanitaire, qui assure la traçabilité des produits.

Dans le Var et les Alpes Maritimes, les pêcheurs professionnels qui désirent pêcher les oursins doivent posséder un navire répondant à certaines normes sanitaires et faire une demande auprès de la DDTM.

Dans les Bouches du Rhône, seuls les professionnels titulaires de la licence oursins (21) sont autorisés à pêcher.

La taille minimale de capture est de 5 cm (piquants exclus).

2.4. Classement sanitaire

Le classement de salubrité et de surveillance des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants est établi par arrêté préfectoral pour chaque département :

- dans le Var (arrêté du 30 décembre 2009),
- dans les Bouches du Rhône (arrêté du 16 novembre 2010),
- dans les Alpes Maritimes (arrêté du 27/06/1996).

La pêche des oursins en région PACA, à titre de loisirs ou professionnelle, n'est pratiquée qu'en zone A, zone dans laquelle les « coquillages » peuvent être récoltés pour la consommation humaine directe. Ce « coquillage » n'étant pas un filtreur, il ne peut faire l'objet d'une purification.

Compte tenu du caractère très diffus des gisements d'oursins répartis sur l'ensemble du littoral PACA, d'une longueur d'environ 800 km, seules certaines zones de production sont autorisées pour la pêche professionnelle. Il s'agit principalement, de la zone 13.07 de la Côte Bleue à la Baie de La Ciotat, des zones 83-01, 83-02 et 83-03 à l'exception des zones portuaires et d'émissaires et la baie du Lazaret. Pour toutes ces zones, ce groupe ne fait pas l'objet d'un suivi REMI mais d'autocontrôles par les professionnels sous l'égide de l'Administration [Directions Départementales des Territoires et de la Mer (DDTM) et Directions Départementales de la Protection des Populations (DDPP)].

3. Matériel et méthodes

3.1. Site de l'étude

Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer et suivre les niveaux de contamination des oursins dans un secteur identifié comme exposé aux sources de contamination microbiologique. Le site d'étude a donc été positionné dans une zone sous influence d'un rejet urbain. Afin de s'assurer de la contamination effective du site, les moules placées en station artificielle ont également été suivies.

Pour des raisons logistiques et économiques, ce site devait être situé à proximité de l'Ifremer, de façon à ce que les prélèvements soient réalisés lors d'une tournée effectuée dans le cadre des réseaux de surveillance institutionnels.

La deuxième exigence nécessitait qu'un gisement naturel d'oursins soit présent en quantité suffisante pour réaliser des prélèvements pendant une année.

Le site d'étude a été sélectionné sur la base des résultats du projet Girac (Gestion Intégrée des Rejets d'Assainissement Côtiers). Dans le cadre de ce projet mené en partenariat avec VEOLIA, des simulations de panaches de pollutions bactériennes, causés par des rejets urbains suites à de fortes pluies ont été réalisés, dans la rade de Toulon (Dufresne, 2013). Les résultats montrent que lors d'épisodes pluvieux, un maximum de contaminations bactériennes était présent aux rejets de La Clue, avec des contaminations dans l'eau, de l'ordre de 7 000 000 d'*E. coli*/100ml.

La Clue est l'embouchure artificielle d'un petit fleuve de l'Est toulonnais, L'Eygoutier, qui s'écoule sur 15,2 km. Ses sept affluents couvrent neuf communes et son bassin versant s'étend sur 70 km². Il n'a pas d'embouchure naturelle. Il emprunte un tunnel pour rejoindre la Grande Rade. Afin d'éviter l'inondation du centre ville toulonnais, un second canal, exutoire de crues, peut être emprunté. Un batardeau situé au Pas-de-la-Clue est relevé lorsque le niveau d'eau de l'Eygoutier augmente.



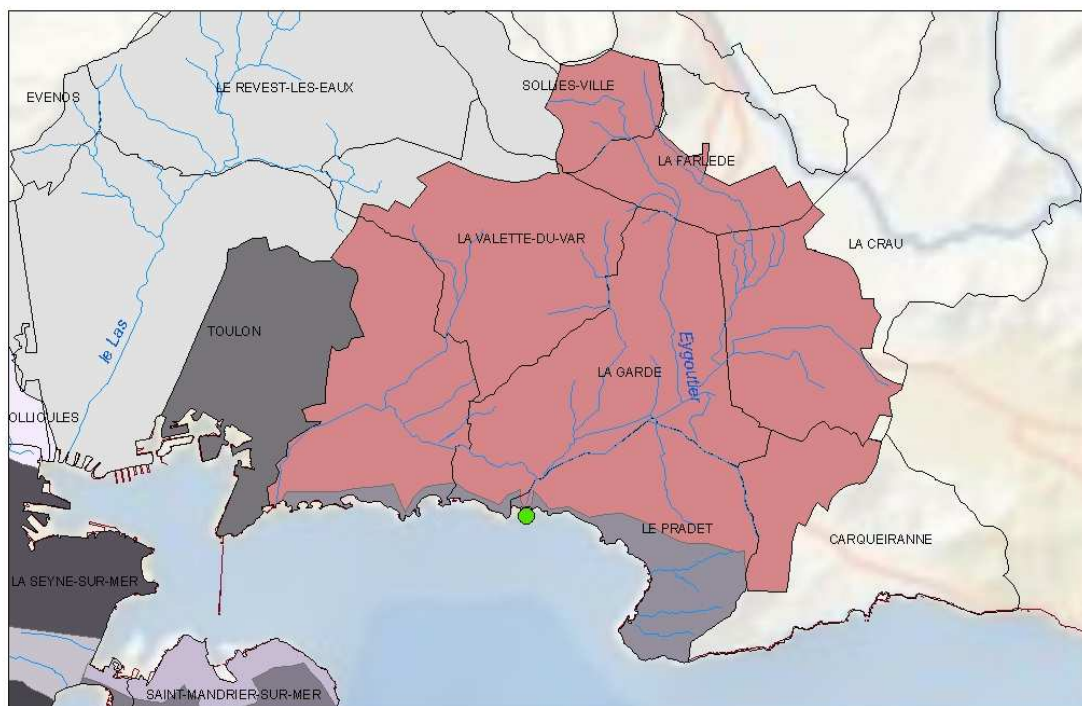
© Ifremer/E.Emery

Le Pas de La Clue

Un examen terrain a été effectué le 06 septembre 2012, à proximité de La Clue. L'objectif était de vérifier la présence d'oursins en quantité suffisante pour permettre des prélèvements durant une année. Aucun site ne présentant à la fois à un gisement d'oursins et une production ou un gisement de moules, nous avons fait le choix de stabuler les moules dans des poches de type RINBIO (Andral 2009).

Tenant compte de l'examen terrain et des résultats du projet Girac, le point, appelé « Marguerite » (lat : 43°6,268, long : 5°59,837), a été positionné devant l'embouchure artificielle de L'Eygoutier.

Bassins versants de l'aire toulonnaise



© IRSN/C.Dufresne

Localisation du point MARGUERITE

3.2. Estimation de stock d'oursins

Afin d'estimer les densités d'oursins sur les zones de prélèvements, des comptages d'oursins ont été réalisés le 23/04/2013.

4 Transects de 20 m de longueur sur une largeur d'1m ont été réalisés en plongée sur le substrat rocheux. L'ensemble des oursins comestibles et non comestibles accessibles (pas de retournement des pierres) a été compté. Pour l'espèce *Paracentrotus lividus*, les individus commercialisables et non commercialisables ont été distingués.

3.3. Protocole d'échantillonnage

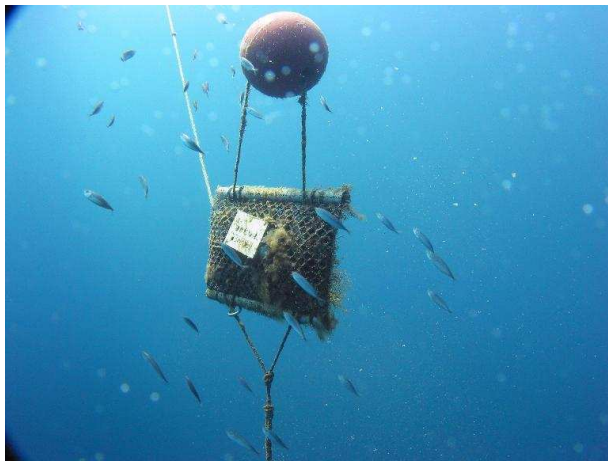
L'étude a été conduite entre octobre 2012 et octobre 2013.

3.3.1. Les moules en station artificielle

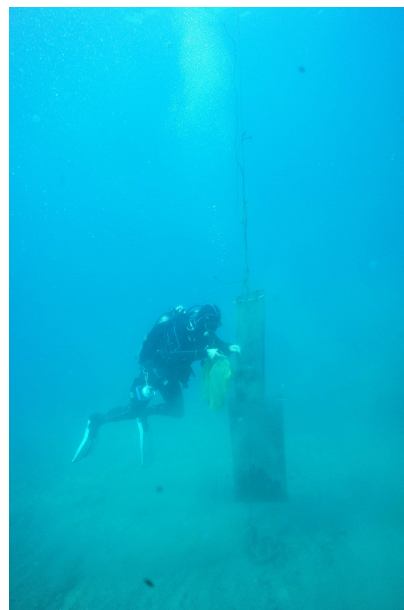
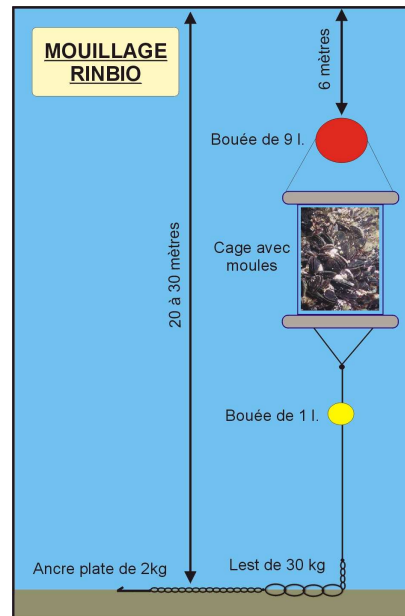
La moule de Méditerranée *Mytilus galloprovincialis* est le modèle biologique utilisé, en raison des facilités d'approvisionnement, de sa robustesse et de la bonne connaissance de cette espèce.

Le lot de moule est originaire des parcs de la Baie du Lazaret. Pour garantir l'homogénéité des lots, une taille de 50 mm, correspondant à des jeunes adultes d'environ 18 mois, est respectée à plus ou moins 5 millimètres. Chaque échantillon est composé d'un lot de 2,5 kg de moules calibrées, stocké dans une poche ostréicole.

Un mouillage de subsurface constitué d'une poche conchylicole reliée à un lest de 30 kg, maintenue en pleine eau à une profondeur de 5 m grâce à un flotteur (schéma et photo 1). La bathymétrie du site avoisine les 10 mètres.



© Ifremer poche de moules immergée



© Ifremer/C.Ravel Prélèvement de moules

Schéma et photo 1 : structure du mouillage RINBIO.

L'immersion de 5 poches a été effectuée mi septembre (2012), afin que les moules soient sur site depuis plus de 15 jours au début des prélèvements. Par la suite, les poches sont approvisionnées régulièrement en respectant un turn-over afin que la durée d'immersion minimale soit respectée.

3.3.2. Les oursins

Une autorisation de prélever les oursins a été accordée par la Délégation Inter-Régionale à la Mer Méditerranée afin que les oursins puissent être prélevés toute l'année et à moins de 50 m des côtes.



© Ifremer/C.Ravel

Prélèvement d'oursins

3.3.3. Les prélèvements

Les prélèvements (moules et oursins) ont commencé le 8 octobre 2012, en plongée avec une fréquence bi-mensuelle (cf : annexe 1 : calendrier prévisionnel des prélèvements).

Les plongées sont réalisées par les plongeurs du LER/PAC, dans le respect des procédures de sécurité de l'Ifremer, à l'aide d'une embarcation légère du laboratoire. Des prélèvements supplémentaires ont été réalisés suite à de fortes pluies (pluviométrie > 25 mm / 24 h), l'alerte pluviométrique étant fournie par Météofrance sur la station de Toulon – La Mitre.

Afin de garantir une comparabilité maximale, l'ensemble des prélèvements sont effectués, en fin de matinée.

Conformément au document de prescription REMI, l'échantillonnage est effectué dans un périmètre inférieur à 250 mètres autour de la station « Marguerite ».

Une vingtaine d'oursins est prélevée afin de garantir une quantité nécessaire pour la préparation de l'échantillon pour essai et de permettre d'éliminer les coquillages

éventuellement morts ou endommagés. Afin d'être représentatif, l'échantillon est constitué en collectant au hasard des individus de taille commerciale en différents endroits.

Les moules sont prélevées, à la même fréquence que les oursins, indifféremment, dans l'une des 5 poches positionnées sur le site, à une distance inférieure à 50 m du point. Une trentaine d'individus est prélevée.

Les moules sont rincées à l'eau de mer, directement sur site, puis placées dans un sachet en matière plastique. Le sachet est conservé dans une glacière à bord du zodiac, puis placées au réfrigérateur jusqu'au moment de l'expédition (le jour même). Les oursins sont conservés dans le filet de prélèvement puis placés dans la glacière jusqu'au retour au laboratoire. Ils sont ensuite débarrassés des débris d'algues puis placés dans une barquette aluminium au réfrigérateur jusqu'au moment de l'expédition. Les prélèvements sont identifiés par une étiquette (date, heure, espèce de coquillages, numéro d'enregistrement) qui sera placée dans le colis. Les échantillons sont expédiés dans un coffret isotherme comportant des blocs de froid.

Le colis est transporté par Chronopost et livré le lendemain avant 10 h pour garantir un délai entre le prélèvement et l'analyse de moins de 24 h.

3.4. Analyses

Escherichia coli est retenu comme indicateur de contamination fécale pour le classement sanitaire des zones de production. Ce paramètre a donc été retenu pour l'étude.

Le choix du laboratoire a été effectué dans la liste des laboratoires agréés pour le dénombrement d'*E. coli* dans les coquillages. Les analyses sont effectuées par l'IDAC (Nantes).

La méthode NF V 08-106 ne pouvant pas encore être utilisée pour les coquillages du groupe I, l'analyse est donc basée sur la méthode de référence XP ISO/TS 16649-3. C'est une méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* beta-glucuronidase-positives (technique du nombre le plus probable utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3 beta-D-glucuronate). Le protocole de la méthode d'analyse est joint en annexe 2.

Le contenu total des oursins a été analysé.

Des analyses supplémentaires ont été réalisées dans les gonades, lors de fortes pluviométries.

4. Résultats

4.1. Estimation des densités d'oursins

La densité totale d'oursins comestibles (taille inférieure et supérieure à 5cm confondues) est de 5,91 individus par m² (écart-type : 3.57). Pour les individus comestibles, la densité est de 1,91 individus par m² (écart-type : 1.42).

4.2. Résultats des analyses

L'ensemble des 24 résultats attendus dans le cadre de l'étude a été obtenu. Les résultats supplémentaires sont issus des alertes pluviométriques.

Deux problèmes de transport (23 avril et 11 juin) n'ont pas permis d'analyser les échantillons d'oursins et de moules.

Les résultats obtenus dans le cadre de l'étude (cf annexes 3 et 4 : résultats de la pluviométrie et résultats microbiologiques) sont présentés dans le graphique ci-dessous. Ce dernier représente les résultats des concentrations bactériologiques obtenus dans les moules et dans les oursins. La courbe de pluviométrie (cumul sur les 4 jours précédents le prélèvement) permet de visualiser les dates pour lesquelles la concentration en *E. coli* est concomitante à de fortes précipitations.

Les oursins étant classés en zone A, les résultats microbiologiques sont considérés comme positifs, au dessus du seuil de 230 *E. coli*/ 100 g C.L.I.

Les résultats obtenus (figure 1) mettent nettement en évidence la contamination des oursins, contrairement à ce que nous envisagions au début de cette étude et ce qui avait été observé par J.J. Console en 1997.

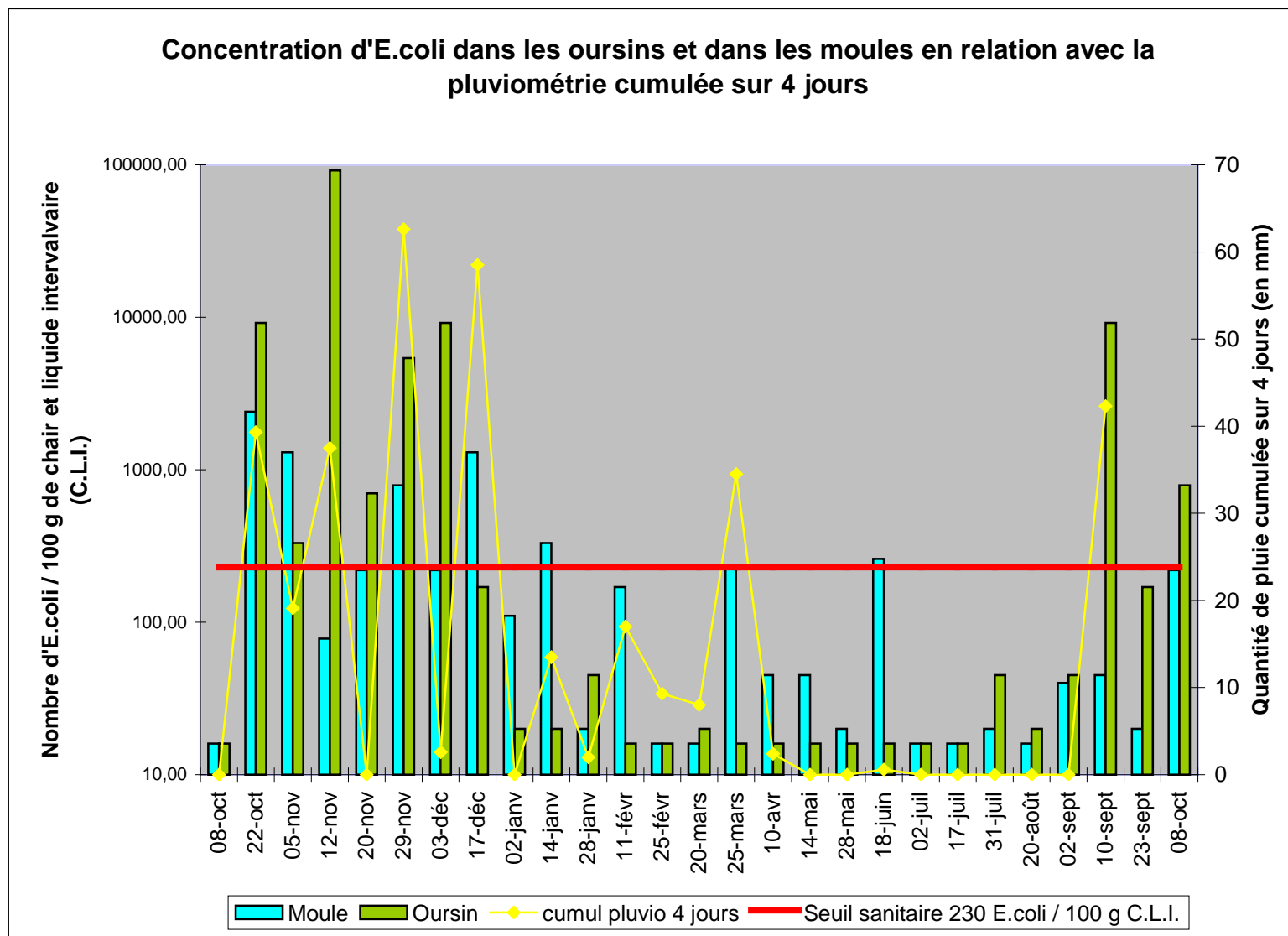


Figure 1 : Concentration d'E. coli dans les oursins et dans les moules en relation avec la pluviométrie cumulée sur 4 jours.

Les analyses supplémentaires réalisées sur les gonades permettent de constater également une contamination importante (cf. figure 2) supérieure au seuil sanitaire de 230 *E. coli*/ 100 g C.L.I.

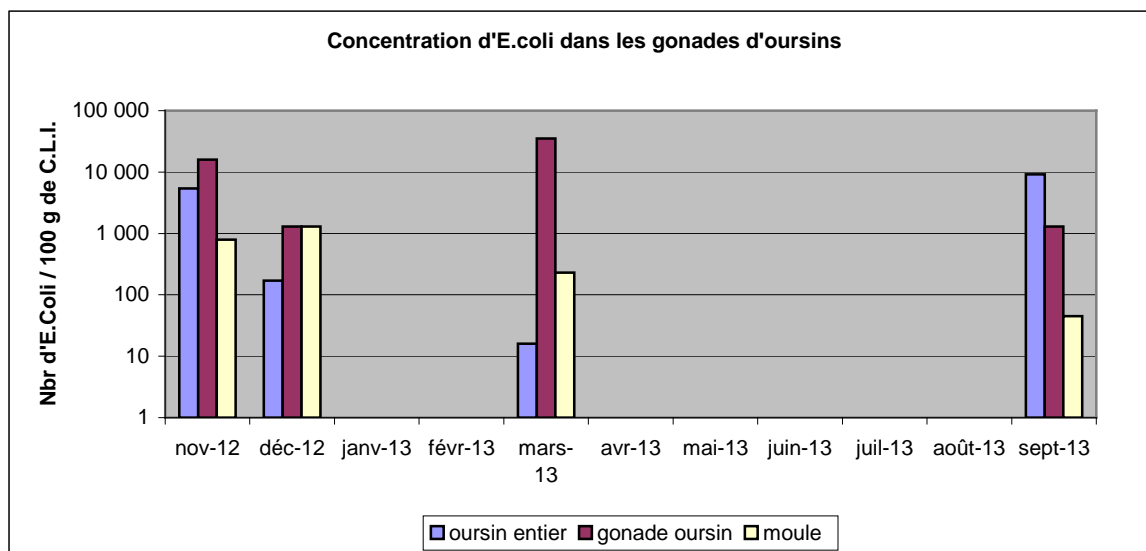


Figure 2 : Concentration d'*E. coli* dans les gonades d'oursins

Pour l'ensemble des résultats obtenus dans les gonades, la contamination est égale ou supérieure à celle obtenue dans la chair des oursins.

La bibliographie étant pauvre en ce qui concerne la contamination microbiologique des oursins, aucune donnée ne permet d'expliquer ces résultats.

Dans le cadre de cette étude, nous ne nous sommes pas intéressés à la question de la décontamination des oursins. On peut cependant observer sur la figure 3 que dans le cas de deux prélèvements proches suite à un épisode pluvieux, la décontamination est lente. En effet, lors de cette observation, les oursins restent fortement contaminés pendant au moins 4 jours suite à l'événement pluvieux. Mais cela ne nous donne pas d'information générale sur les cinétiques de décontamination des oursins.

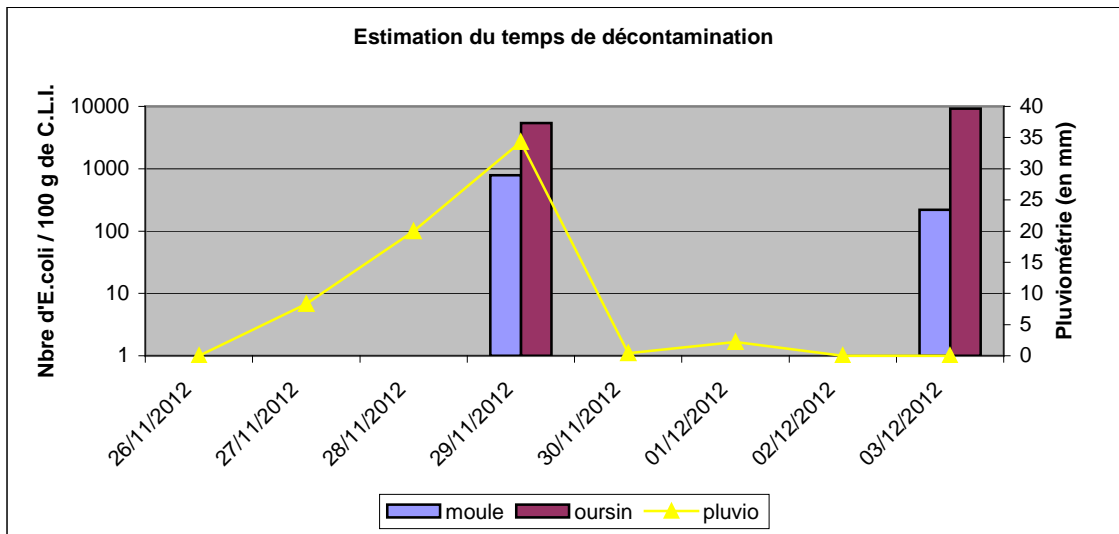


Figure 3 : Exemple d'estimation du temps de décontamination

5. Discussions et conclusions

Les résultats des analyses montrent que pour cette zone classée A par arrêté préfectoral, les oursins, organismes brouteurs, sont susceptibles d'être fortement contaminés lors de pollutions bactériologiques.

La contamination peut être plus importante que dans les moules, organismes filtreurs. Ce résultat est également vrai lorsqu'on s'intéresse aux gonades, partie généralement consommée de l'animal.

La différence de position dans la colonne d'eau peut être une piste pour expliquer ces résultats.

Au vu de ces résultats, il nous semble nécessaire d'approfondir trois axes :

- ✓ L'évolution de l'étendue spatiale de la contamination : quel est le gradient de décontamination à la sortie d'un rejet potentiel ?
- ✓ L'étude de la cinétique de contamination et de décontamination des oursins : les oursins retiennent-ils ou concentrent-ils les bactéries et en combien de temps se décontaminent ils ?
- ✓ L'étude de la contamination potentielle des oursins dans une zone légèrement moins impactée.

6. Bibliographie

Dufresne C. (2013). Simulations de rejets urbains dans la Rade de Toulon.

Andral B. (2010). RINBIO 2009 : Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée : résultats de la campagne 2009. RST.DOPLER/PAC/10-15, novembre 2010.

Console J.J. (1997). Contribution à la connaissance de la qualité des oursins comestibles en rade sud de Marseille.

Poutiers J.M. (1993). Les oursins et les ascidies. Les coquillages comestibles de France

.

Annexe 1 : Calendrier prévisionnel des prélèvements

Semaine	Date
45	5 au 9 novembre 2012
47	19 au 23 novembre 2012
49	3 au 7 décembre 2012
51	17 au 21 décembre 2012
1	2 au 4 janvier 2013
3	14 janvier au 18 janvier 2013
5	28 janvier au 1 février 2013
7	11 au 15 février 2013
9	25 février au 1 mars 2013
11	11 au 15 mars 2013
13	25 au 29 mars 2013
15	8 au 12 avril 2013
17	22 au 26 avril 2013
19	6 au 7 mai 2013
21	21 au 24 mai 2013
23	3 au 7 juin 2013
25	17 au 21 juin 2013
27	1 au 5 juillet 2013
29	15 au 19 juillet 2013
31	29 au 2 août 2013
33	12 au 14 août 2013
35	26 au 30 août 2013
37	9 au 13 septembre 2013
39	23 au 27 septembre 2013
41	7 au 11 octobre 2013

Annexe 2 : Méthode d'analyse

Code du texte
de référence
XP ISO/TS
16649-3
ISO 6887-1-3
NF ISO 7218

Rédigé par : Myriam RENAUD

SOMMAIRE

- 1 - OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION
- 2 - REFERENCES
- 3 - DEFINITION
- 4 - PRINCIPE
- 5 - MILIEUX DE CULTURE, DILUANTS ET REACTIFS
- 6 - MATERIEL ET CONSOMMABLE
- 7 - ECHANTILLONNAGE
- 8 - PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR L'ANALYSE
- 9 - MODE OPERATOIRE
- 10 - EXPRESSION DES RESULTATS
- 11 - CONDITIONS DE CONSERVATION ET D'ELIMINATION DE L'ECHANTILLON
- 12 - ANNEXES

1 – OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

Dénombrement des *Escherichia coli* beta-glucuronidase positive dans 100 g de chair et liquide intervalvaire (bivalves) ou de chair seule (gastéropodes), ou de chair et eau (oursins).

2 – REFERENCES

XP ISO/TS 16649-3 (12/05)

(Code COFRAC : P30)

ISO 6887-1-3 (préparation des échantillons) ; ISO7218 ; NF V 08-600 ; Avis LNR (Ifremer Nantes)

Lettre d'Ifremer notifiant l'utilisation de la table de Man, table de la NF V08-600

3 – DEFINITIONS

Escherichia coli beta-glucuronidase positive: Bactéries qui à 44 °C, forment des colonies bleues ou bleues vertes sur le milieu tryptone-bile-glucuronate (TBX).

4 – PRINCIPE D'ANALYSE

Le dénombrement se fait en milieu liquide par la technique du nombre le plus probable (NPP) en ensemençant une série de 5 tubes de milieu liquide d'enrichissement sélectif double concentration (avec la suspension mère au 1/10) et au moins 3 ou 4 séries de 5 tubes de milieu liquide d'enrichissement sélectif simple concentration (avec la suspension mère au 1/10^e et des dilutions° décimales). Après incubation de 24h à 37°C, les tubes Lactose + sont mis en subculture sur gélose sélective 24h à 44°C. Déterminer le nombre le plus probable d'*Escherichia coli* à partir des subcultures qui produisent des colonies bleues ou bleu-vertes sur gélose Tryptone-bile-glucuronate.

5 – MILIEUX DE CULTURE, DILUANTS ET REACTIFS

Voir méthode préparation des milieux.

5.1 – MILIEUX DE CULTURE

5.1.1 – Milieu d'enrichissement sélectif

Sigles milieux de culture

-BGLUTdc (double concentration)	Bouillon au glutamate modifié
- BGLUT (Simple concentration)	(milieu d'enrichissement sélectif)

5.1.2 – Milieu sélectif

TBX	Gélose Tryptone-Bile-Glucuronate
-----	----------------------------------

5.2 – DILUANTS

Tryptone

non transmis

5.3 – REACTIFS

Néant

6 – MATERIEL ET CONSOMMABLES

6.1 – MATERIEL

Hotte à flux laminaire.

Diluteur automatique Dilumat (appareil de pesée).

Mixeur Blender + bols.

Agitateur type Vortex.

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

Étuve à $44\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$.

6.2 – CONSOMMABLES

Brosse.

Scalpel stérile, couteaux stériles, ou couteaux à huîtres nettoyés et désinfectés avec de l'alcool à 70°.

Pipettes stériles.

Flacon de 250 ml ou sacs stériles.

Anse Ciseaux désinfectés

7 – ECHANTILLONNAGE

L'échantillon doit être représentatif et en quantité suffisante pour les besoins de l'analyse (voir paragraphe 8).

A l'arrivée au laboratoire, entreposer les échantillons à une température de $4 \pm 2\text{ °C}$.

8 – PREPARATION DE L'ECHANTILLON POUR L'ANALYSE

8.1

8.1.1 – ANIMAUX DE GRANDE TAILLE : MOULES, COQUILLES ST JACQUES, COQUES : $\varnothing > 30\text{ MM}$, HUÎTRES.

L'échantillon pour essai doit comprendre un nombre entier d'individus (au moins six) permettant d'obtenir environ 75 à 100 g de produit, constitué de chair ou d'eau et de chair (oursins par exemple) ou de chair et de liquide intervalvaire (bivalves).

8.1.2 – ANIMAUX DE PETITE TAILLE non transmis

8.2 – S'assurer que les coquillages sont encore vivants (coquille bien fermée pour les bivalves) et non endommagés.

Oursins, holothuries et tuniciers : reprendre la norme ISO 6887-3

8.3 – non transmis

8.4 – Egoutter les coquillages nettoyés et les poser sur un plateau recouvert de papier absorbant.

8.5 – Ouvrir les coquillages à l'aide d'un instrument stérile approprié (couteau à huîtres ou scalpel pour les bivalves, paire de ciseaux pour les oursins).
non transmis

8.6 – Au fur et à mesure des ouvertures successives, recueillir la totalité de la chair, et le cas échéant, l'eau (oursins par exemple) ou le liquide intervalvaire (bivalves), dans un bol stérile préalablement taré. non transmis

8.7 – Ajouter ensuite une masse de diluant égale à deux fois la masse de chair, d'eau ou de chair (oursins) ou de chair et de liquide intervalvaire (bivalves).

8.8

8.8.1 – Animaux de grande taille :

Homogénéiser le mélange au moyen d'un homogénéisateur rotatif pendant 30s à 2 min selon l'appareil utilisé.
non transmis

8.8.2 – Animaux de petite taille

Homogénéiser le mélange au moyen d'un homogénéisateur rotatif pendant 30s à 2 min selon l'appareil utilisé. On obtient ainsi une suspension-mère au 1/3.

8.9 – Si nécessaire, laisser les grosses particules se déposer durant 15 minutes au maximum. La température du diluant pendant les opérations de dilutions suivantes doit être proche de la température ambiante. Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la Suspension Mère et le moment où l'inoculum entre en contact avec le milieu de culture ne doit pas dépasser 45 mn. non transmis

8.10 – Ne pas agiter et transférer à l'aide d'une pipette stérile 30 ml de la phase liquide du broyant au 1/3 obtenue dans 70 ml de diluant. Mélanger soigneusement. On obtient ainsi la suspension mère au 1/10.

9 – MODE OPERATOIRE

9.1. – Ensemencement

Préparer 5 tubes de BGLUT dc et 15 ou 20 tubes de BGLUT

La dernière série n'est ensemencée que (non transmis) dans le cas d'une présomption d'une forte contamination

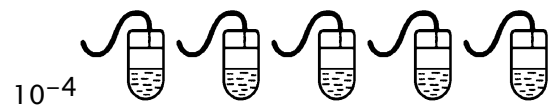
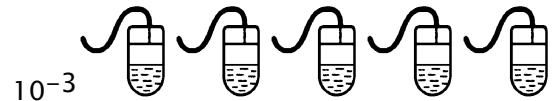
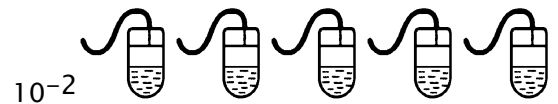
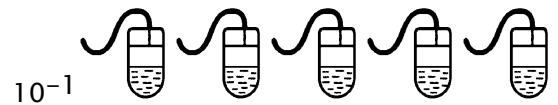
10 ml de la suspension mère dans chaque tube **1 ml** de la suspension mère dans chaque tube

1 série de **5 tubes** de 10 ml de **BGLUT dc**



Non transmis

3 ou 4 séries de **5 tubes** de 10 ml de **BGLUT**



9.2 - INCUBATION

Incuber à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant $24\text{ h} \pm 2\text{ h}$

9.3 - *Repiquage (Mise en subculture)*

A partir de chaque tube ayant une coloration jaune (production d'acide), faire un isolement en stries sur le milieu **TBX**

Incuber les boites à 44°C pendant $22\text{ h} \pm 2\text{ h}$

Ne pas empiler plus de 3 boites

10 - EXPRESSION DES RESULTATS

La présence de colonies bleutées ou bleu-vert indique la présence de d'*Escherichia coli* β glucuronidase positive

Pour le choix des combinaisons voir : ANNEXE N°1 : MODE DE CALCUL : EXPRESSION DES RESULTATS

Noter le nombre de tubes positifs dans chacune des 4 ou 5 séries consécutives de dilutions afin d'obtenir une combinaison de 3 chiffres de catégorie 1. Ramener le résultat dans 100g (la table donne les résultats dans 1g).

11 - CONDITIONS DE CONSERVATION ET D'ELIMINATION DE L'ECHANTILLON

Se reporter à la méthode de traitement et d'élimination des déchets (M3/MED).

12 - DOCUMENTS ASSOCIES

Annexe n°1 : mode de calcul

Annexe n°2 : coquillages, table du N.P.P. à 5 tubes par dilution

M3/TOP/15I-A

Lettre d'Ifremer du 19 mars 2010

ANNEXE N°1 : MODE DE CALCUL

1. EXPRESSION DES RESULTATS

Choix des combinaisons :

Conformément aux recommandations du LNR, pour le choix des combinaisons nous nous référons à la NF EN ISO 7218 mais nous prendrons la table NPP de la norme NF V 08-600 qui se trouve en annexe A.

En effet, la table NPP à 5 tubes de la NF EN ISO 7218 ne présente pas les catégories.

non transmis

Dans l'annexe 2, la catégorie de chaque combinaison est fonction du « nombre d'échantillons testés par lot » (de 1 à 10), nous prendrons la colonne « 1 échantillon testé ».

non transmis

2. CONCLUSION

Penser à tenir compte des dilutions pour l'expression finale des résultats

Le résultat final obtenu est le nombre d'*Escherichia coli* présumés/ 100g d'échantillon.

ANNEXE N°2 : TABLE NPP POUR 5 TUBES (TABLEAU A.1 DE L'ANNEXE DE LA NORME NF V08-600

non transmis

Annexe 3 : Résultats de la pluviométrie

Date	Pluviométrie (J ¹ à J) en mm
5-oct-12	0
6-oct-12	0
7-oct-12	0
8-oct-12	0
total	0

19-oct-12	1,2
20-oct-12	0
21-oct-12	0
22-oct-12	38,1
total	39,3

2-nov-12	0
3-nov-12	0
4-nov-12	5,4
5-nov-12	13,7
total	19,1

9-nov-12	0
10-nov-12	0,4
11-nov-12	34,3
12-nov-12	2,8
total	37,5

17-nov-12	0
18-nov-12	0
19-nov-12	0
20-nov-12	0
total	0

26-nov-12	0
27-nov-12	8,3
28-nov-12	20
29-nov-12	34,3
total	62,6

30-nov-12	0,4
1-déc-12	2,2
2-déc-12	0
3-déc-12	0
total	2,6

14-déc-12	45,4
15-déc-12	13,1
16-déc-12	0
17-déc-12	0
total	58,5

Date	Pluviométrie (J ¹ à J) en mm
30-déc-12	0
31-déc-12	0
1-janv-13	0
2-janv-13	0
total	0

11-janv-13	0
12-janv-13	0
13-janv-13	0,2
14-janv-13	13,3
total	13,5

25-janv-13	0
26-janv-13	0
27-janv-13	0
28-janv-13	2
total	2

8-févr-13	0
9-févr-13	0
10-févr-13	0
11-févr-13	10,3
12-févr-13	6,7
13-févr-13	0
total	17

22-févr-13	0
23-févr-13	6,7
24-févr-13	2,6
25-févr-13	0
total	9,3

17-mars-13	0
18-mars-13	5,4
19-mars-13	0
20-mars-13	2,6
total	8

22-mars-13	0
23-mars-13	0
24-mars-13	7,8
25-mars-13	26,7
total	34,5

7-avr-13	2,4
8-avr-13	0
9-avr-13	0
10-avr-13	0
total	2,4

Date	Pluviométrie (J ⁻¹ à J) en mm
20-avr-13	0,4
21-avr-13	4,4
22-avr-13	0
23-avr-13	0
total	4,8

Date	Pluviométrie (J ⁻¹ à J) en mm
28-juil-13	0
29-juil-13	0
30-juil-13	0
31-juil-13	0
total	0

11-mai-13	0
12-mai-13	0
13-mai-13	0
14-mai-13	0
total	0

17-août-13	0
18-août-13	0
19-août-13	0
20-août-13	0
total	0

25-mai-13	0
26-mai-13	0
27-mai-13	0
28-mai-13	0
total	0

30-août-13	0
31 août 13	0
1-sept-13	0
2-sept-13	0
total	0

15-juin-13	0
16-juin-13	0,6
17-juin-13	0
18-juin-13	0
total	0,6

7-sept-13	0
8-sept-13	4,4
9-sept-13	37,9
10-sept-13	0
total	42,3

29-juin-13	0
30-juin-13	0
1-juil-13	0
2-juil-13	0
total	0

20-sept-13	0
21-sept-13	0
22-sept-13	0
23-sept-13	0
total	0

14-juil-13	0
15-juil-13	0
16-juil-13	0
17-juil-13	0
total	0

5-oct-13	0,2
6-oct-13	0
7-oct-13	0
8-oct-13	0
total	0.2

Annexe 4 : Résultats microbiologiques

Date	E,coli (Moule) / 100 g C.L.I	E,coli (Oursin) / 100 g C.L.I
8-oct-12	<18	<18
22-oct-12	2 400	9 200
5-nov-12	1 300	330
12-nov-12	78	92 000
20-nov-12	220	700
29-nov-12	790	5 400
3-déc-12	220	9 200
17-déc-12	1 300	170
2-janv-13	110	20
14-janv-13	330	20
28-janv-13	20	45
11-févr-13	170	
13-févr-13		< 18
25-févr-13	< 18	< 18
20-mars-13	< 18	20
25-mars-13	230	< 18
10-avr-13	45	<18
23-avr-13		
14-mai-13	45	< 18
28-mai-13	20	18
18-juin-13	260	< 18
2-juil-13	<18	<18
17-juil-13	<18	<18
31-juil-13	20	45
20-août-13	< 18	20
2-sept-13	40	45
10-sept-13	45	9 200
23-sept-13	20	170
8-oct-13	220	790