

63893

H300-91C-B

Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral  
Laboratoire côtier de Concarneau

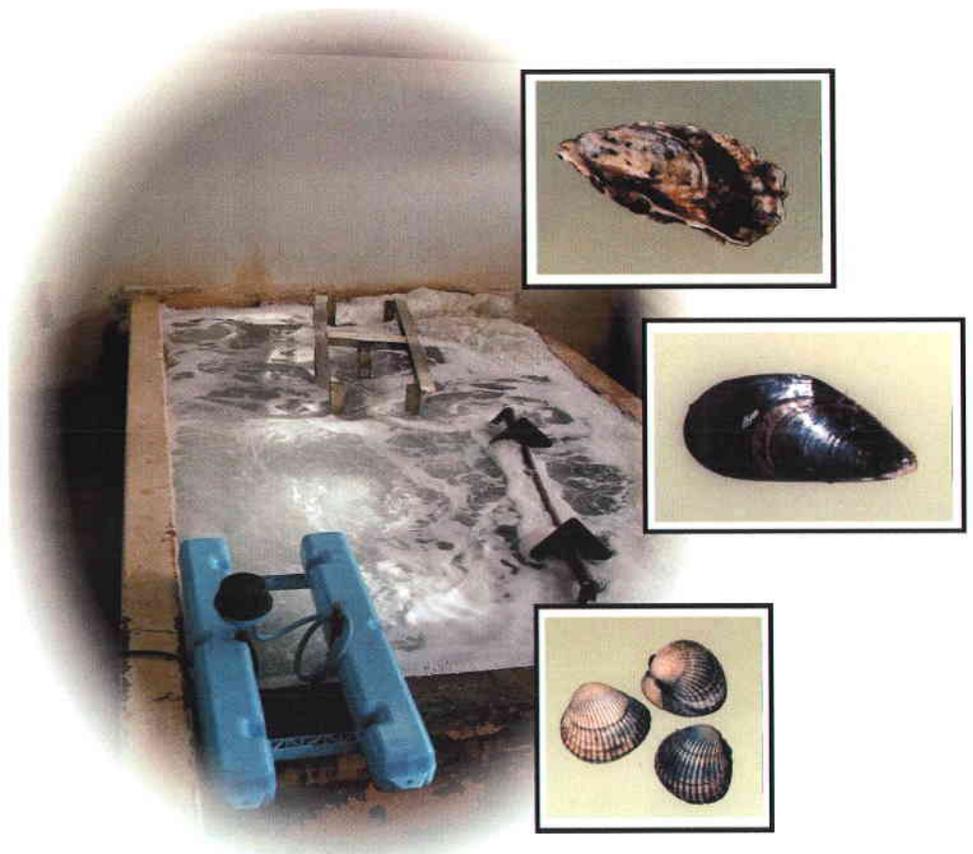
Piclet G. et Monfort P.

Février 2003 - R.INT.DEL/ 03.01/Concarneau

**IFREMER**

## Le Bassin Insubmersible aéré (BIA) : Outil de purification des coquillages ?

### Notion d'eau propre



IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL10102



## **REMERCIEMENTS**

Cette étude a bénéficié du soutien :

↳ de Bruno Thomas qui a bien voulu mettre à notre disposition un bassin insubmersible équipé d'un aérateur, le matériel nécessaire et les lots de coquillages.

↳ du Comité National de la Conchyliculture qui s'est engagé auprès de Mr. Thomas à couvrir les pertes de coquillages occasionnées par les nombreuses manipulations.

↳ de la Direction Départementale des Services Vétérinaires du Finistère qui nous a aimablement remis les données de leurs contrôles.

Ont également participé, les agents du laboratoire DEL de Concarneau :

↳ Pierre Raguènes et Arnaud Péron (stagiaire) pour la conduite du BIA et la réalisation des prélèvements.

↳ Sylviane Boulben , Gwénaél Bilien et Marie Claire Caudan pour les dénombrements colimétriques dans les coquillages.

Ce rapport a été soumis à l'analyse critique de :  
Daniel MASSON (DEL/LT).

---

# **Le Bassin Insubmersible aéré (BIA), outil de purification des coquillages ? Notion d'eau propre**

-----



<b>1. Introduction.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Généralités .....</b>	<b>6</b>
<i>2.1 - Rappels de la réglementation</i>	
2.1.1 - législation européenne - réglementation française	
2.1.2 - Législation américaine	
<i>2.2 - Paramètres influençant la purification</i>	
<b>3. Bilan de la qualité bactériologique des coquillages destinés à la consommation humaine (données des services vétérinaires du Finistère de 1999 à 2001 ).....</b>	<b>13</b>
<b>4. Matériels et méthodes .....</b>	<b>17</b>
<i>4.1 – Description du Bassin Insubmersible Aéré (BIA)</i>	
<i>4.2 -Protocole de contamination et de décontamination des coquillages</i>	
4.2.1 – <i>Elaboration du bouillon de culture à base d'Escherichia coli</i>	
4.2.2 – <i>Mode opératoire de la contamination</i>	
4.2.3 – <i>Phase de décontamination</i>	
<i>4.3 – Echantillonnage</i>	
4.3.1 – <i>Premier essai</i>	
4.3.2 – <i>Second essai</i>	
<i>4.4 – Méthodologies analytiques utilisées</i>	



4.4.1 – *Coquillages : Dénombrement des E. coli par la technique du nombre le plus probable en milieu liquide (méthode officielle NF V08.600).*

4.4.2 – *Coquillages : Dénombrement des E.coli en milieu gélosé – (méthode rapide norme NF V08.053).*

4.4.3 – *Eau : Filtration sur membrane – norme ISO 9308-1*

#### 4.5 – *Traitement statistique*

### 5. **Résultats – Discussion .....26**

#### 5.1 - *Essai de décontamination des huîtres et des moules*

5.1.1 - Analyse des résultats colimétriques de l'eau

5.1.2 - Analyse des résultats colimétriques des coquillages

#### 5.2 - *Essai de décontamination des coques*

### 6. **Conclusion.....35**

### 7. **Bibliographie.....37**

### 8. **Annexes.....43**

Annexe 1 – Evolution de la contamination colimétrique de l'eau au cours d'un cycle de marée sur deux sites conchylicoles du Finistère.

Annexe 2 – Protocole de dénombrement des Escherichia coli dans les coquillages en milieu liquide (technique du nombre le plus probable).Méthode officielle NF V08.600.

Annexe 3 – Protocole de dénombrement des Escherichia coli dans les coquillages en milieu gélosé. Norme NF V08.053.

Annexe 4 – Protocole de dénombrement des Escherichia coli dans l'eau par filtration sur membrane.en milieu gélosé. Norme ISO 9308.1.



## 1. Introduction

Les coquillages, de gisements naturels ou cultivés sur la frange littorale, sont soumis aux apports de microorganismes d'origine anthropique, tels que les effluents des eaux résiduaires urbaines (ALIBOU 1987, DUPRAY et al.1991) ou des déjections animales utilisées à des fins fertilisatrices (JONES 1992, DUPRAY et al. 1999) ce qui laisse pressentir que la maîtrise de la qualité des coquillages est liée à celle de l'environnement littoral. Ceci est essentiel dans la mise en place d'une politique sanitaire à long terme (aménagement), qui doit être complétée bien entendu par des actions préventives de surveillance tout au long de la filière conchylicole afin d'en atténuer les risques.

En outre, les coquillages, pour leurs besoins physiologiques de nutrition et de respiration, filtrent des volumes d'eau importants, concentrant par là-même, les germes pathogènes présents dans l'eau, qu'il s'agisse de bactéries (CONVENANT 1991, MONFORT et al. 1998) ou de virus (LE GUYADER et al.1998). Ce constat, accentué par la tradition de les consommer crus ou peu cuits, fait de cet aliment un vecteur potentiel de toxi-infections alimentaires (MIOSSEC et VAILLANT 2001, HAEGHEBAERT S. et al. 2001). La politique sanitaire relève bien évidemment des prérogatives de l'Etat qui s'expriment dans le cadre du classement et du suivi ultérieur des zones conchylicoles de production (Direction Départementale des Affaires Maritimes), de la surveillance des zones de pêche récréative (Direction Départementale de l'Action sanitaire et sociale), de l'agrément des établissements conchylicoles et du contrôle relatif à la mise en marché des coquillages vivants (Direction Départementale des Services Vétérinaires). Ce rôle régalien de l'Etat et la mise en place de bonnes pratiques professionnelles, contribuent efficacement à limiter les cas de toxi-infections alimentaires et participent également à une meilleure image de marque de ce produit, trop souvent suspecté.

Parmi l'arsenal technico-administratif en vigueur, l'établissement conchylicole et notamment l'équipement de purification des coquillages en constitue le point fort. La purification est définie par le décret du 28 avril 1994 comme suit, « **opération consistant à immerger des coquillages vivants dans des bassins alimentés en eau de mer naturellement propre ou rendue propre par un traitement approprié, pendant le temps nécessaire pour leur permettre d'éliminer les contaminants microbiologiques et pour les rendre aptes à la consommation humaine directe** ». Cette définition crée



cependant plus d'interrogations qu'elle n'en résout, en particulier pour ce qui concerne le concept d'eau propre et les procédés technologiques susceptibles d'y satisfaire. Si les traitements préalables de l'eau (chlore, ultra-violets, ... ) avant l'immersion des coquillages s'inscrivent dans la philosophie de la purification, l'utilisation du bassin insubmersible aéré (BIA) fait l'objet, quant à lui, de quelques réserves.

Aussi, après un rappel des réglementations européennes et américaines relatives aux zones conchylicoles de production et un bilan de la qualité des mollusques bivalves du Finistère destinés à la consommation humaine, l'objectif de cette étude, à partir de deux essais, l'un mettant en œuvre des huîtres et des moules, l'autre des coques, sera d'évaluer l'efficacité envers la décontamination des coquillages et les performances d'un bassin insubmersible aéré (objectif de résultat), d'en comprendre la raison et de fournir des éléments techniques utiles à l'élaboration de bonnes pratiques professionnelles.



## 2. Généralités

### 2.1 Rappels de la réglementation

Notre pays dispose depuis bien longtemps, et notamment depuis le décret de 1939, d'un arsenal juridique spécifique à l'exploitation des coquillages et à la salubrité de ceux-ci. Aujourd'hui les textes réglementaires relèvent de la législation européenne (règlements, directives...) les pays membres de l'union se devant de les transcrire dans leur droit national.

#### *2.1.1 Législation européenne- réglementation française*

Ainsi la directive 91/492 de la communauté Economique Européenne du 15 juillet 1991, fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants considère que :

**« les mollusques bivalves vivants issus de zones de récolte qui ne permettent pas une consommation directe et sans danger peuvent être rendus salubres si on les soumet à un procédé de purification ou par reparcage en eau propre pour une assez longue période ; qu'il est donc nécessaire de recenser les zones de production en provenance desquelles les mollusques peuvent être collectés pour la consommation humaine directe ainsi que celles en provenance desquelles ils doivent être purifiés ou reparqués. »**

Pour ce faire cette directive définit le classement de salubrité et le suivi ultérieur des zones de production. Elle a été transcrite en droit français dans deux textes réglementaires : décret n°94-340 du 28 avril 1994 et arrêté du 21 mai 1999.

Le classement des zones de production en différentes classes de salubrité (tableaux 1) est établi après une étude sanitaire dite étude de zone. Cette dernière permet une évaluation des niveaux de la contamination microbiologique (nombre d'*E.coli*/100g de chair et de liquide intervalvaire) et chimique (mg/kg de matière humide) :



### ↳ Par groupe de coquillages :

-Groupe 1 : les gastéropodes (bulot, bigorneau, patelle ou bernique ou encore arapède), les échinodermes (oursin) , les tuniciens (violet).

-groupe 2 : les bivalves fouisseurs, c'est à dire les mollusques bivalves filtreurs dont l'habitat permanent est constitué par les sédiments (coques, palourdes...),

-groupe 3 : les bivalves non fouisseurs, c'est à dire les autres mollusques bivalves filtreurs (moules, huîtres...).

↳ Sur la base du dénombrement des germes indicateurs de contamination fécale (*E.coli*) pratiqué sur au moins 26 prélèvements, réalisés régulièrement sur une période minimale d'un an et de la concentration en métaux tels que le plomb, le cadmium et le mercure sur un prélèvement annuel au moins (tableaux 1 et 2)

#### 2.1.1.1 Critères microbiologiques

E. coli pour 100g de chair et de liquide intervalvaire	Zones	Exploitation	
	classement	élevage	pêche en gisement naturel
au moins 90 % des résultats < à 230 E. coli * aucun résultat > 1000 E. coli	<b>A</b>	<b>Autorisé</b> (consommation directe)	<b>Autorisée</b> (consommation directe)
au moins 90 % des résultats < à 4600 E. coli aucun résultat > 46000 E. coli	<b>B</b>	<b>Autorisé</b> (reparcage ou purification)	<b>Autorisée</b> (reparcage ou purification)
au moins 90 % des résultats < à 46000 E. coli	<b>C</b>	<b>Interdit</b> (sauf dérogation préfectorale)	<b>Autorisée</b> (reparcage de 2 mois minimum)
Non A, non B, non C	<b>D</b>	<b>Interdit</b>	<b>Interdite</b>

**Tableau 1** : Critères microbiologiques de classement des zones conchylicoles

\* E. coli : bactérie, appartenant à la famille des entérobactéries et considérée comme germe témoin de contamination fécale.



- Ainsi, on peut identifier 4 zones différentes, A, B, C, D (**chapitre I de l'annexe de la directive 91/492/CEE du 15 juillet 1991**) :
- Les zones salubres (A). Les coquillages qui proviennent de ces zones peuvent être mis directement sur le marché car ils satisfont les critères sanitaires des coquillages vivants destinés à la consommation humaine immédiate – **arrêté du 02/07/1996** moins de 230 *E. coli* dans 100 g de chair de coquillage et de liquide intervalvaire (CLI) ; absence de salmonelles dans 25 g de chair et de liquide intervalvaire.
- Les zones insalubres (B, C et D). Les coquillages qui en sont issus présentent une contamination supérieure à 230 *E. coli* pour 100 g de CLI
  - o Zones B. les coquillages provenant des zones B peuvent être récoltés, mais ne peuvent être mis sur le marché pour la consommation humaine qu'après avoir subi un traitement dans un centre de purification.
  - o Zones C. Les coquillages provenant des zones C peuvent être récoltés mais ne peuvent être mis sur le marché qu'après un reparcage portant sur une longue période (minimum 2 mois).
  - o Zones D. Les coquillages des zones D ne peuvent être récoltés pour la consommation humaine, le reparcage et la purification sont interdits.

#### 2.1.1.2 – Critères chimiques

Ces critères et leurs seuils (tableau 2) concernent trois contaminants, plomb, cadmium et mercure (arrêté du 21/05/1999 et règlements de la commission des communautés européenne du 8 mars 2001 et du 6 février 2002).

Seuils de contamination chimique (mg / kg de chair humide)			Zones	Exploitation
Plomb (Pb)	Cadmium (Cd)	Mercure (Hg)	Classement	Pêche et Elevage
< ou = 1.5 mg	< ou = 1 mg	< ou = 0.5 mg	<b>A</b>	Autorisée
> 1.5 mg	> 1 mg	> 0.5 mg	<b>D</b>	Interdite

**Tableau 2** : Critères chimiques de classement des zones conchylicoles



Bien entendu, le classement d'une zone prend en considération tout à la fois les critères microbiologiques et chimiques, la valeur la plus élevée décidant de sa salubrité ou de son niveau d'insalubrité. Celui-ci est officialisé par des arrêtés préfectoraux après proposition du directeur départemental des affaires maritimes (pour exemple, l'arrêté préfectoral du Finistère N° 2000-0806 du 25/05/2000) et ne peut excéder 10 ans

### 2.1.2 - Législation américaine

D'après la norme américaine de la Food and Drug Administration (National Shellfish Sanitation Program Model Ordinance du 3 novembre 2000), les zones conchylicoles sont classées à partir de la contamination de l'eau et non des coquillages. Les critères retenus sont présentés dans le tableau 3.

Seuils de contamination microbiologique (coliformes fécaux(CF)/100 ml d'eau)	Zones	Correspondance européenne	Traitement
MG* : 14 CF** dont 90% < 43 CF	Salubre	A	Aucun
MG : 88 CF dont 90% < 260 CF	Insalubre	B	Purification ou reparcage autorisé
	Insalubre	C	Seul le reparcage > à 2 mois est autorisé

**Tableau 3** : Classement des zones d'après la législation américaine

\*MG : moyenne géométrique (ex : a, b, c...n) ;  $MG = \sqrt[n]{a \times b \times c \dots n}$

\*\*CF : coliformes fécaux

Dans une première approche, on peut considérer que la zone salubre correspond aux zones A, que la zone insalubre avec purification et reparcage autorisés correspond quant à elle aux zones B, tandis que la zone insalubre impliquant le seul reparcage répond aux zones C. Toutefois, on peut se poser la question de savoir si il y a juxtaposition effective de la qualité sanitaire des zones conchylicoles classées selon les législations européenne et américaine. Une étude comparative a été menée à cet effet, et il apparaît que les critères de salubrité d'une zone



salubre « européenne » (A) sont plus sévères que ceux d'une zone salubre américaine (LEES et al. 1994).

#### OBSERVATION

L'analyse des critères microbiologiques relatifs aux coquillages, fixés par les textes européens et français, laisse à penser que l'eau des zones salubres ne peut être stérile ou plus précisément exempte de contamination colimétrique car les coquillages qui en sont issus peuvent présenter une certaine contamination, bien entendu faible mais légalement reconnue. La réglementation des Etats-Unis et de bien d'autres pays en confirme le bien fondé. Pourtant, l'eau de mer propre telle que définie dans la directive du 15/07/1991 précise qu'elle doit être exempte de contamination microbiologique.

Devant une telle dualité d'où paraît une certaine discordance, y a-t-il nécessité de mieux définir « l'eau propre » en lui attribuant un critère microbiologique de salubrité, accompagné d'un seuil de contamination à ne pas excéder, déduit de celui qui a conduit à définir les zones salubres (classée A) sur la base d'une contamination des coquillages inférieure à 230 *E.colii*/100 g de chair et de liquide intervalvaire ? N'est ce pas la démarche suivie par l'OMS/PNUE qui préconise une contamination inférieure à 10 coliformes fécaux dans 80% des cas avec un seuil de tolérance ne pouvant excéder 100 coliformes fécaux/100ml ?

## 2.2 Paramètres influençant la purification

Comme nous l'avons souligné précédemment, l'activité de filtration des bivalves entraîne l'accumulation de microorganismes dans leurs tissus lorsqu'ils sont immergés dans une eau souillée. A l'inverse, placés dans une « eau propre », ces mêmes coquillages peuvent s'en débarrasser. Ce phénomène est utilisé et favorisé au sein des établissements conchylicoles par l'utilisation de bassins insubmersibles (FAURY et al. 1992), le plus souvent équipés d'aérateur, éventuellement de filtre voire d'un système de stérilisation de l'eau (Chlore, Ozone, Ultra-violets,...). Des recherches ont permis de dégager les paramètres favorables à l'élimination des microorganismes (CABELLI et HEFFERNAN 1970, HEFFERNAN et CABELLI 1970), cette dernière étant plus lente que la contamination (FLEET 1978, RICHARDS 1988, TIMONEY et ABSTON 1984). En outre, une contamination élevée, le plus souvent hétérogène, d'un lot de



coquillages exige une durée de traitement proportionnellement plus longue de par la grande variabilité du comportement individuel.

### 2.2.1 – Etat des coquillages

D'une manière générale, les coquillages affaiblis ou stressés par des causes diverses, qu'elles soient de nature mécanique ou biologique, se prêtent plus difficilement à une décontamination efficace et rapide. On retiendra, par ailleurs, qu'un choc thermique en période de fraie, entraînant la libération de la laitance dans les bassins, s'avère une source de mortalités importantes par anoxie du milieu.

### 2.2.2 – Paramètres du milieu

Une purification optimale des coquillages est dépendante de la qualité et des caractéristiques de l'eau pompée. Ainsi, un pompage en profondeur aux alentours de la pleine mer est un atout essentiel pour l'obtention d'une eau de la meilleure qualité bactériologique possible (annexe 1).

Parmi les paramètres physico-chimiques, la température, la salinité, l'oxygène dissous et la turbidité interviennent prioritairement sur l'activité physiologique des mollusques et corrélativement sur l'efficacité de la décontamination.

**La température.** Le champ favorable à une purification continue et rapide se situe le plus souvent entre 18 et 22 °C. Hors de celui-ci, elle se ralentit, tandis qu'en dessous de 10°C et au dessus de 27°C, elle est fortement perturbée (ROWSE et FLEET 1984).

L'optimum de **salinité** est variable selon les espèces considérées mais elles supportent en général un large gradient (espèces euryhalines) . La réaction des bivalves au facteur salinité demande toutefois d'éviter des variations brutales de salinité (<20%) entre le lieu d'élevage et l'eau du bassin insubmersible. La purification sera lente pour les faibles salinités (16 à 20 ‰), à l'opposé des salinités excessives (+ de 43 ‰) ont des effets secondaires (ROWSE et FLEET 1984, HEFFERNAN et CABELLI 1970).

Les bivalves utilisent l'**oxygène dissous** de l'eau de mer . En dessous de valeurs situées entre 2.8 et 3.5 mg/l (HIS et CANTIN 1995),



on observe une perturbation de l'activité physiologique, ce qui induit inévitablement une médiocre décontamination. L'aération contribue à maintenir un niveau approprié de concentration en oxygène dissous, estimé à 5mg/l (HIS et CANTIN 1995). Un autre critère considère qu'en dessous de 70% d'oxygène dissous dans l'eau, les bivalves sont en état de stress (BOUGRIER et al. 1995).

La **turbidité** est le reflet de la présence de particules en suspension dans l'eau. Une faible turbidité favorise le taux de pompage chez les mollusques bivalves. Elle intervient également sur l'efficacité du traitement de purification proprement dit (effet des ultra-violets solaires et industriels, moindre colmatage des filtres). L'apport de phytoplancton ou de bactéries marines au cours de la purification activerait quant à lui le processus de relargage des microorganismes indésirables (HEFFERNAN et CABELLI 1970, AUBERT et ZHENG 1989).

### 2.2.3 – Conditions techniques

Sur le plan opérationnel, il est de règle pour qu'une décontamination soit optimale de prendre en compte également :

\* **la charge du bassin** (Kg de coquillages/m<sup>3</sup> d'eau). Variable selon les espèces de coquillages, la saison et la performance de l'équipement des établissements ; 100 Kg et plus pour les huîtres et les moules moindre pour les palourdes et les coques pour lesquelles il est indispensable d'éviter des couches épaisses de coquillages. Il faut plutôt procéder par lits de quelques centimètres

\* **Une hauteur d'eau dans le bassin** de 1 à 1.20 m pour éviter des fluctuations rapides de températures mais aussi pour faciliter l'agencement des mannes, permettant de la sorte, une bonne circulation de l'eau autour de chacune d'entre elles et en définitive une meilleure décontamination des coquillages. Ces brefs rappels relatifs à la contamination et à la décontamination sont développés dans diverses études ( FLEET 1978, CABELLI et HEFFERNAN 1970, HEFFERNAN et CABELLI 1970, HEFFERNAN et CABELLI 1971, RICHARDS 1988).



### 3. Bilan de la qualité bactériologique des coquillages destinés à la consommation humaine (données des services vétérinaires du Finistère de 1999 à 2001 )

L'exploitation des données analytiques fournies par les services vétérinaires du Finistère, relatives à la qualité bactériologique des coquillages destinés à la consommation humaine, fait apparaître que 93% des résultats sont inférieurs à 230 *E.coli*/100 g, avec toutefois des disparités marquées. En effet, les coquillages provenant de gisements naturels en eau profonde satisfont ce critère à 98.1%, les bivalves non fousseurs à 95.3% contre 82.8 % pour les bivalves fousseurs élevés ou pêchés sur l'estran (tableau 4).

Classe d'E.coli	pal. grise	pal rose	coque	amande	vernis	clan	Coq st jacques	Praire	pétoncle	Olive**	huître plate	Huître creuse	Moule	total
<230	215*	29	77	98	15	30	71	67	8	2	137	452	224	1425
	89.2*	90.6	70	99	100	100	100	97.1	100	50	97.9	96.8	91.1	93
230-1000	18	3	23	1				2			3	12	19	81
	7.5	9.4	20.9	1				2.9			2.1	2.6	7.7	5.3
1000-2000	8		5							1		1	1	16
	3.3		4.6							25		0.2	0.4	1
2000-3000													1	1
													0.4	0.07
3000-4000			1							1		1		3
			0.90							25		0.2		0.21
4000-5000														
>5000			4									1	1	6
			3.6									0.2	0.4	0.39
total	241	32	110	99	15	30	71	69	8	4	140	467	246	1532

**Tableau 4 :** Bilan brut des résultats bactériologiques (*E.coli*/100g) par espèce de coquillages établi à partir des données des contrôles de la Direction Départementale des Services Vétérinaires du Finistère (1999 – 2001)

\* nombre de données      \* Pourcentage

\*\* *Donax trunculus* : improprement dénommé Olive ou telline, fion ou haricot de mer.

Pour élément de comparaison, les zones conchylicoles du Finistère et de Bretagne sont pour une grande part, classées en B(au moins 90% des résultats < à 4600 *E.coli*/100g).

La différence de qualité bactériologique entre coquillages du milieu et coquillages destinés à la consommation directe provient de



l'effet « purificateur » des quelques 80 établissements agréés qui sont tous, à quelques unités près, exclusivement équipés en B.I.A.

Ces données brutes méritent cependant une analyse plus fine, l'objet de cette étude étant d'apprécier l'efficacité des BIA (tableau 5), ce qui conduit à supprimer les valeurs relatives aux coquillages prélevés en bassin car encore en cours de purification et aux coquillages manifestement non purifiés. En complément, et compte-tenu de l'incertitude attachée à toute méthode d'analyse, les résultats compris dans l'intervalle de confiance à 95 % (70 – 660 *E. coli* / 100g), correspondant à une contamination moyenne de 230 *E.coli*, ont été considérés comme satisfaisants.

Classes de Contamination (E.coli/100g)	*			**		
	<i>Tout coquillage</i>			<i>Tout coquillage</i>		
	Fouisseur	Non fouisseur	Total	Fouisseur	Non fouisseur	Total
<230	612 (92.1%)	813 (97.0%)	1425 (94.9%)			
<600				633 (95.3%)	823 (98.2%)	1456 (96.9%)
230 - 1000	39 (5.9%)	22 (2.6%)	61 (4.0%)			
600 - 1000				18 (2.7%)	12 (1.4%)	30 (2.0%)
1000 - 2000	11 (1.7%)	2 (0.3%)	13 (0.9%)	11 (1.7%)	2 (0.3%)	13 (0.9%)
2000 – 3000		1 (0.15%)	1 (0.07%)		1 (0.1%)	1 (0.07%)
3000 – 4000	2 (0.3%)		2 (0.14%)	2 (0.3%)		2 (0.14%)
4000 - 5000						
>5000						
Total	<b>664 (100)</b>	<b>838 (100)</b>	<b>1502 (100)</b>	<b>664 (100)</b>	<b>838 (100)</b>	<b>1502 (100)</b>

**Tableau 5 :** Bilan raisonné des résultats bactériologiques (*E.coli*/100g) par espèce de coquillages établi à partir des données des contrôles de la Direction Départementale des Services Vétérinaires du Finistère (1999-2001)

- \* suppression des résultats pour les coquillages prélevés dans le BIA
- \*\* suppression des résultats pour les coquillages manifestement non purifiés
- \*\*\* prise en compte de l'intervalle de confiance pour la classe <230

Ce bilan est à rapprocher d'une synthèse réalisée à partir des données analytiques obtenues entre 1985 et 1990 sur les coquillages après passage de 48 heures en BIA dans l'ensemble des établissements bretons (PICLET et LE MAO 1992). L'observation majeure reste la même, c'est à dire que les résultats non satisfaisants, autour des 3%, résultent du non respect de certaines bonnes pratiques.



A ce titre sont concernés, quelques espèces, coques et olives, de brèves périodes de l'année où les volumes de vente dépassent les capacités de traitement des coquillages et certains établissements, toujours les mêmes il est vrai.

Si de ce bilan finistérien on retire les coques et les olives dont la purification se révèle trop souvent partielle, le risque de fortes mortalités étant en cause selon les professionnels, il y a lieu de noter que 98% des résultats sont satisfaisants et 99.3% sont inférieurs à 1000 *E. coli* (tableau 6).

Classes de Contamination ( <i>E.coli</i> /100g)	*			**			***					
	<i>Tout coquillage hors coques &amp; olives</i>						<i>Tout coquillage hors coques &amp; olives</i>					
	Fouisseur		Non fouisseur		Total		Fouisseur		Non fouisseur		Total	
<230	533	(96.0%)	813	(97.0%)	1346	(96.6%)	542	(97.6%)	823	(98.2%)	1365	(98.0%)
<600												
230 - 1000	16	(2.9%)	22	(2.6%)	38	(2.7%)						
600 - 1000							7	(1.3%)	12	(1.4%)	19	(1.3%)
1000 - 2000	6	(1.1%)	2	(0.3%)	8	(0.6%)	6	(1.1%)	2	(0.3%)	8	(0.6%)
2000 - 3000			1	(0.1%)	1	(0.07%)			1	(0.1%)	1	(0.1%)
3000 - 4000												
4000 - 5000												
>5000												
Total	555 (100)		838 (100)		1393 (100)		555 (100)		838 (100)		1393 (100)	

**Tableau 6 :** Bilan raisonné tout coquillage, hors coques et olives, des résultats bactériologiques (*E.coli*/100g) établi à partir des données des contrôles de la Direction Départementale des Services Vétérinaires du Finistère (1999-2001)

Ainsi, la synthèse 1985-1990 considérant tous les établissements bretons (PICLET et LE MAO 1992) et le bilan 1999-2001 ci-dessus relatif aux établissements finistériens, démontrent les réelles performances des B.I.A. à satisfaire les critères bactériologiques en cours, *E. coli* et salmonelles, fixés par l'arrêté du 02/07/1996. Quelles en sont les raisons ? C'est l'objet de cette étude qui ne prendra pas en compte les salmonelles pourtant présentes dans les eaux et les coquillages de zones de production bien identifiées (MONFORT et al.1997, DUPRAY et al. 1999, DDSV Finistère 2003), des contrôles réguliers, sur de longues périodes, en toute saison, sur diverses espèces de toute origine et dans un grand nombre d'établissements (PICLET et LE MAO 1992) ayant déjà démontré l'absence ou la très



faible fréquence d'isolement de cette bactérie pathogène dans les coquillages purifiés. Sur ce dernier point, une récente statistique signale que sur 117 recherches effectuées ces dernières années dans le Finistère, 2 d'entre elles se révélèrent positives et se rapportaient au même établissement (DDSV Finistère 2003). Le traitement BIA, identique pour tous, ne peut être ainsi mis en cause, l'enquête en cours se chargera de démontrer une éventuelle inadaptation dans la conduite du procédé ou de mettre en évidence une pollution conjoncturelle ou chronique, de proximité ou non. Il paraît opportun de rappeler que la reconquête de la qualité des eaux littorales implique une politique d'aménagements (stations d'épuration et réseaux de collecte des eaux usées,...) qui conditionne pour beaucoup le maintien ou le développement des productions conchylicoles. Leur surveillance continue est un excellent outil à la disposition des décideurs nationaux et locaux, acteurs essentiels de la qualité sanitaire des coquillages.



## 4. Matériels et méthodes

### 4.1 - Description du Bassin Insubmersible aéré (BIA)

Les moyens mis à notre disposition pour mener cette étude sont ceux d'un établissement professionnel situé dans la baie de la Forêt-Fouesnant au lieu dit de « Kerist » (Finistère) :

- **Un bassin insubmersible** couvert et bien exposé à la lumière naturelle, de 4 m de longueur, de 2 m de largeur et de 1.40 m de profondeur, aux parois lisses. Le volume d'eau utile de ce bassin est proche des 10 m<sup>3</sup>.

- **Une pompe** : celle ci permet le pompage de l'eau de mer directement du milieu pour remplir le bassin. Il n'y a donc pas de réserve d'eau préalable.

- **Un aérateur (force 7)** : souvent qualifié de soufflante (débit d'air de 27 à 35 m<sup>3</sup>/h). Il permet, une abondante production de microbulles (système Venturi) qui contribue à l'oxygénation de l'eau de mer, la création d'un courant (apport constant et bien réparti de l'air injecté ; non stratification thermique), et un dégazage (transfert des gaz dissous de l'eau à l'état gazeux dans l'air).

- **Des coquillages** : disposés dans des mannes selon les usages professionnels.

1 <sup>er</sup> essai	Huîtres Moules	480 Kg 400 Kg
2 <sup>ème</sup> essai	Coques Moules	300 Kg 10 Kg

### 4.2 – Protocole de contamination et de décontamination des coquillages

#### 4.2.1 – *Elaboration du bouillon de culture à base d'Escherichia coli*

La contamination des coquillages est effectuée à partir d'une souche *d'Escherichia coli*, isolée du milieu naturel, estuaire de l'Aven (Finistère) et identifiée grâce à des tests biochimiques (galerie API 20 E). Une colonie de cette souche estensemencée dans un tube d'eau



peptonée exempte d'indole (10ml) pendant une trentaine d'heures à température ambiante. Ensuite, 4 ml de cette culture sont transférés dans un litre d'eau peptonée exempte d'indole, préparé avec de l'eau de mer stérile et incubé à température ambiante pendant 40 heures (conditions proches de la réalité opérationnelle), ceci pour minimiser les risques éventuels de mortalité de la souche contaminante.

#### 4.2.2 – Mode opératoire de la contamination

Sur la base d'essais préliminaires qui indiquaient une concentration d'environ  $10^8$  cellules/ml de culture après la phase d'enrichissement et une concentration dans les coquillages sensiblement identique (*E.coli/g*) à celle de l'eau (*E.coli/ml*), nous avons estimé à 100 ml la quantité de culture susceptible de contaminer fortement les coquillages. Pour ce faire, nous l'avons mélangé dans un premier temps à 10 litres d'eau de mer qui, par la suite, ont été déversés dans le bassin au fur et à mesure de son remplissage. Cette opération menée à bien, l'eau du bassin a été homogénéisée à l'aide d'une pompe de circulation d'eau (circuit fermé) pendant 5 minutes.

Après une période d'assec de 18 heures, les coquillages sont immergés dans le bassin pendant 6 heures. Ils sont alors exondés et subissent une seconde phase d'assec de 18 heures avant une deuxième contamination, identique à la précédente. A l'issue de celle-ci, ils sont retirés du bassin pour un assec de 12 heures et l'eau contaminée est évacuée après un traitement au chlore. Une fois le bassin nettoyé, il est alors rempli en eau de mer par pompage, 1 à 2 heures avant la pleine mer. Cette période de la marée est la plus propice à l'obtention d'une eau de bonne qualité (PICLET G. et LE MAO P. 1992, CALVEZ N. 1999, HALNA du FRETAY 2001),

#### 4.2.3 – Phase de décontamination

Les coquillages contaminés sont introduits dans le bassin où l'eau, non renouvelée, est aérée périodiquement par la soufflante (20mn/heure). L'eau de mer pompée au cours de ces deux essais (tableau 7) présentait des caractéristiques habituelles à ce secteur, les températures n'étant pas des plus favorables à la décontamination des coquillages.



Le premier essai (huîtres et moules) fut d'une durée de 3 jours, le second (coques) de 2 jours et demi.

<b>N° essai</b>	<b>Espèces</b>	<b>Température(°C)</b>	<b>Salinité(g/l)</b>	<b>Turbidité(ntu)</b>
1	Huîtres et Moules	17.2 °C	33.3 g/litre	3.2 ntu
2	Coques	15.5 °C	34.8 g/litre	1.3 ntu

**Tableau 7 :** Caractéristiques physicochimiques de l'eau de mer pompée

### **4.3 - Echantillonnage**

Lors de ces deux essais, les prélèvements ont privilégié tantôt le suivi de la décontamination concomitante de l'eau et des coquillages, tantôt celui des coquillages exclusivement.

#### *4.3.1 – Premier essai*

- Tout au long du remplissage du bassin (pompage) : 6 échantillons d'eau.
- Dans les lots de coquillages initialement contaminés : 4 échantillons pour les huîtres et autant pour les moules

Cette étape permettant de faire le point de référence fut complétée par un contrôle de l'ensemble du bassin pour apprécier l'éventuelle homogénéité de la décontamination selon les modalités suivantes :

\*sur la base d'une diagonale en trois points, **a**, **b** et **c** et de trois couches d'eau, **1**, **2** et **3** (figure1).

\*à une fréquence variable, plus élevée au début de l'essai : 3, 6, 12, 24, 48 et 60 heures (coques) ou 72 heures (huîtres et moules).

Ainsi, chaque série de prélèvements comporte :



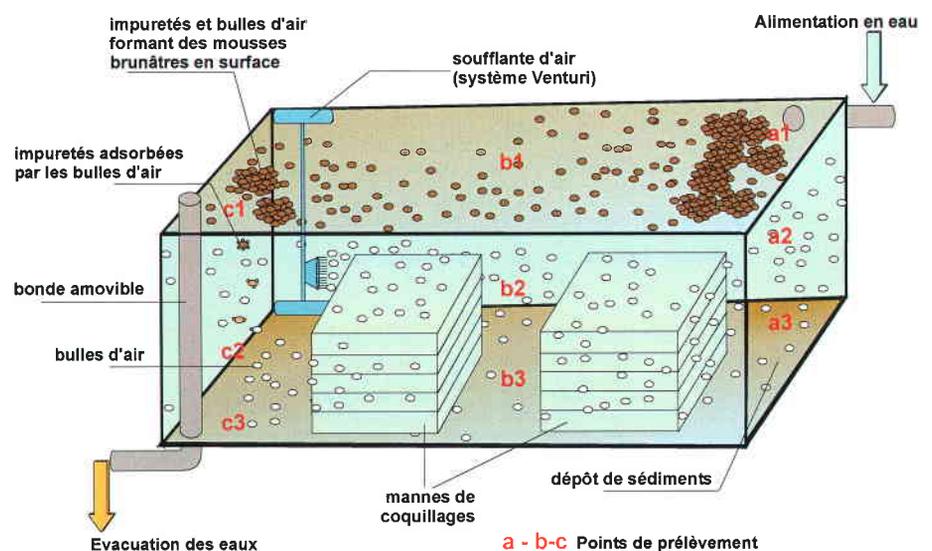
- 9 eaux, également réparties en eaux de surface (**a1, b1, c1**), eau intermédiaire (**a2, b2, c2**) et eau de fond (**a3, b3, c3**).
- 4 moules dont 2 au niveau de l'eau intermédiaire (**a2, b2**) et 2 au niveau de l'eau de fond (**a3, b3**).
- 4 huîtres, 2 au niveau de l'eau intermédiaire (**b2, c2**) et 2 au niveau de l'eau de fond (**b3, c3**).

#### 4.3.21 – Second essai

Il porte seulement sur les coquillages et plus spécifiquement sur les coques :

- \* Contamination initiale : 6 échantillons de coques  
1 échantillon de moules

\* Le suivi dans le BIA se fait selon la même fréquence qu'au premier essai, hormis, qu'il cesse à 60 heures au lieu des 72 heures et que chaque série de prélèvements comporte 6 échantillons de coques (3 points aux niveaux 2 et 3) et un échantillon de moules (1 point au niveau 3).



**Figure 1 :** Schéma du Bassin Insubmersible Aéré (BIA) et localisation des points de prélèvement

## **4.4 – Méthodologies analytiques utilisées**

*4.4.1 – Coquillages : Dénombrement des E.coli par la technique du nombre le plus probable en milieu liquide – méthode officielle NF V08.600 – annexe 2*

### **4.4.1.1 - Préparation de l'échantillon**

Les échantillons de coquillages prélevés sont stockés en glacière et acheminés au laboratoire pour analyse. Les échantillons ne pouvant être traités immédiatement sont conservés au réfrigérateur ( $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) pendant une durée maximale de 12 heures. L'échantillon pour essai comprend 8 individus pour les huîtres et une trentaine pour les moules et les coques, permettant d'obtenir au moins 75 g de chair et de liquide intervalvaire.

Le nettoyage des coquillages s'opère sous courant d'eau froide potable avec une brosse afin d'éliminer les souillures externes. Le byssus des moules est sectionné au moyen d'un scalpel ou d'un couteau stérilisé.

Les coquillages sont ouverts à l'aide d'un couteau ou d'un scalpel stérilisé à la flamme et à la totalité de la chair et du liquide intervalvaire recueillie ( $\approx 75\text{g}$ ) dans un bol stérile, préalablement taré, on ajoute une masse de diluant (tryptone sel) deux fois supérieure pour l'obtention d'une dilution au tiers.

### **4.4.1.2 - Broyage de la prise d'essai**

La solution mère au 1/3 ainsi obtenue est homogénéisée à l'aide d'un broyeur rotatif de type waring blendor pendant 1 minute à 15000 t/mn. Elle repose 15 à 30 minutes à température ambiante ( $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), avant le transfert de 30 ml dans 70 ml de diluant pour l'obtention d'une suspension mère au 1/10.

### **4.4.1.3 - Ensemencement et incubation**

Les diverses étapes consistent à :



Prendre cinq tubes de milieu d'enrichissement sélectif (bouillon au lauryl sulfate tryptose-LST) double concentration et transférer dans chacun de ces tubes, à l'aide d'une pipette stérile, 10 ml de la suspension mère au 1/10.

Prendre ensuite cinq tubes de milieu d'enrichissement sélectif (LST) simple concentration et transférer dans chacun de ces tubes, à l'aide d'une pipette stérile, 1 ml de la suspension mère au 1/10.

Opérer de la même manière pour les dilutions suivantes ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...) et incuber l'ensemble des tubes dans une étuve réglée à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant  $48\text{h} \pm 2\text{h}$ .

#### 4.4.1.4 – Repiquage

A partir de chaque tube incubé présentant un trouble, une opacité ou un dégagement gazeux, on ensemence à l'aide d'une anse bouclée, un tube de milieu sélectif simple concentration (milieu EC) et un tube d'eau peptonée exempte d'indole mis à incuber dans un bain marie réglé à  $44^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  pendant  $24\text{h} \pm 1\text{h}$ .

#### 4.4.1.5 - Expression des résultats

Sont considérés comme positifs (présence d'*Escherichia coli* présumé) les tubes qui révèlent simultanément la présence d'un dégagement gazeux sur milieu EC et la production d'indole dans le tube d'eau peptonée, après adjonction du réactif d'Erlich Kovacs.

A partir du nombre de tubes par dilution, on obtient un nombre caractéristique. Le nombre d'*Escherichia coli* présumés dans 100 g de chair et de liquide intervalvaire est obtenu en multipliant le coefficient NPP (table de mac Grady) par 100 et par l'inverse de la masse d'échantillon (en g) inoculée pour la dilution retenue la moins élevée.

#### 4.4.2 – Coquillages : Dénombrement des *E.coli* en milieu gélosé – norme NF V08.053 – annexe 3.

La seconde méthode de dénombrement des *E. coli* dans les coquillages fait référence à la norme V08-053, méthode rapide par comptage des colonies à  $44^{\circ}\text{C}$  en milieu gélosé. Celle-ci a fait l'objet d'études comparatives qui n'ont pas permis de mettre en évidence de



différences significatives avec la méthode de référence basée sur la technique du Nombre le Plus Probable en milieu liquide (OGDEN I.D. 1998, CALVEZ N. 1999).

#### 4.4.2.1 - Broyage et filtration

Le broyat de la suspension mère au 1/3 obtenu comme mentionné ci-dessus est ensuite transféré dans un sac stomacher muni d'un filtre afin d'éliminer les particules de matière organique susceptibles de gêner la lecture ultérieure des boîtes de pétri.

#### 4.4.2.2 - Ensemencement et incubation

Pour prendre en compte l'évolution de la contamination des coquillages d'une part et le niveau de la contamination des différentes espèces d'autre part, la quantité (1 ou 3 ml), le nombre de boîtes (2, 3 ou 5) et le nombre de dilutions ont été adaptés aux essais menés.

L'inoculum prélevé est déposé dans une boîte de pétri que l'on recouvre de 18 ml d'une gélose chromogène (Rose-gal BCIG – BLOKAR diagnostics), maintenue en surfusion (47°C) au bain marie. Après solidification, ces boîtes sont incubées retournées dans une étuve réglée à 44°C ± 1°C pendant une durée de 24h ± 1h.

#### 4.4.2.3 - Expression des résultats

Retenir pour lecture, dans la mesure du possible, les boîtes contenant de 15 à 150 colonies caractéristiques d'*Escherichia coli* (colonies bleues à violettes) et exprimer les résultats en nombre d'*Escherichia coli* pour 100g de chair et de liquide intervalvaire.

#### 4.4.3 – Eau : Filtration sur membrane – norme ISO 9308-1 annexe 4.

Le dénombrement des *E. coli* dans l'eau s'effectue sur la base de la norme ISO 9308-1 qui fait appel à la méthode par filtration sur membrane. Cette méthode a été retenue essentiellement pour des raisons d'homogénéité analytique avec celle des coquillages développée précédemment (même milieu de culture).



La méthode consiste à filtrer un volume d'eau déterminé sur une membrane stérile qui est déposée à la surface d'un milieu gélosé sélectif. L'utilisation dans notre cas d'un milieu chromogène (Rose-Gal BCIG – BLOKAR) présente l'avantage d'identifier de visu les colonies d'*Escherichia coli* grâce à la dégradation des composés chromogènes par des enzymes spécifiques.

Les échantillons d'eau (flacon de 500 ml) sont prélevés, stockés en glacière puis acheminés au laboratoire pour analyse. Les échantillons ne pouvant être traités immédiatement sont conservés au réfrigérateur ( $6^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) pendant une durée maximale de 12 heures.

Après homogénéisation de l'échantillon par retournement du flacon à plusieurs reprises, on filtre 100 ml d'eau sur une membrane filtrante stérile de  $0.22 \mu$ , que l'on dépose sur le milieu sélectif Rose gal BCIG, préalablement coulé en boîte de pétri. Pour faire face aux fortes concentrations éventuelles, un second échantillon de 10 ml voire un troisième de 1 ml auxquels on ajoute une quantité d'eau stérile peuvent être également analysés.

Ces boîtes de pétri ( $\varnothing 50$  mm) sont ensuite incubées dans une étuve réglée à  $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  pendant 18 à 24 heures. Après ce laps de temps, on procède au comptage des colonies caractéristiques d'*Escherichia coli*, de préférence sur les boîtes comptabilisant entre 15 et 150 colonies. Les résultats sont exprimés en nombre d'*Escherichia coli* pour 100 ml.

#### **4.5 – Traitement statistique**

Le traitement statistique des données permet :

- d'évaluer l'éventuelle homogénéité bactériologique de la masse d'eau du bassin insubmersible (homogénéité des couches et des colonnes d'eau). Pour ce faire, on applique les tests non paramétriques de Friedman et de Wilcoxon (SIEGEL 1954), basés sur les rangs et non sur les valeurs elles-mêmes.



- de mettre en relation la charge bactérienne des coquillages (huîtres, moules, coques) et la durée de décontamination en BIA. A cet effet, on met en œuvre une régression linéaire après transformation des variables (SCHWARTZ 1995).



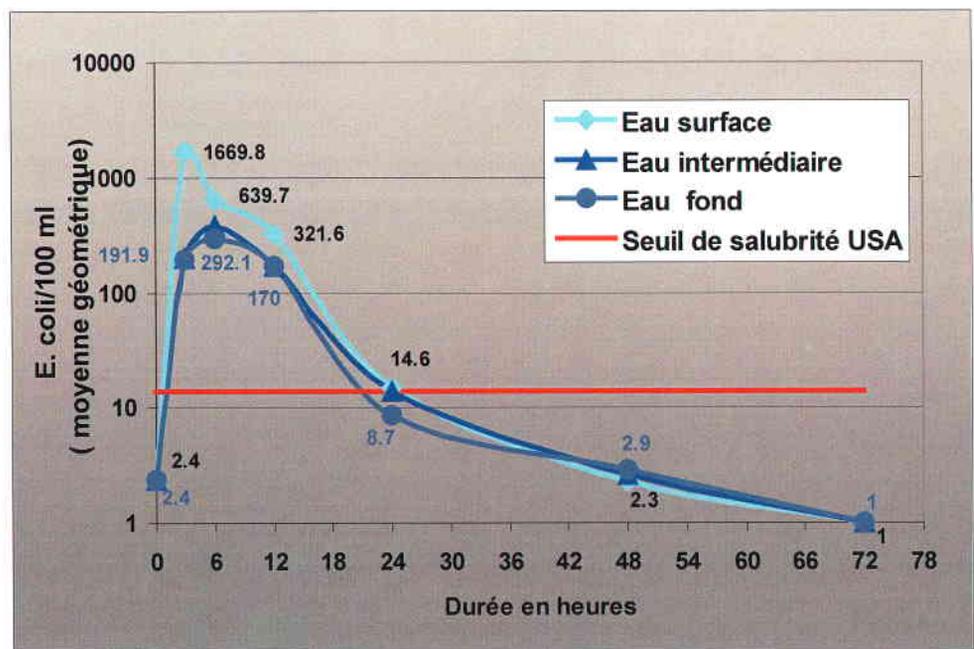
## 5. Résultats – Discussion

### 5.1 – Essai de décontamination des huîtres et des moules

#### 5.1.1 - Analyse des résultats colimétriques de l'eau

Le BIA, d'une capacité utile de 10 m<sup>3</sup>, a été alimenté en eau de mer par pompage à marée haute. La moyenne géométrique de 2.4 *E. coli* / 100ml d'eau indique une faible contamination de la couche d'eau profonde du milieu naturel, confirmant ainsi les observations réalisées par le laboratoire sur l'évolution de la charge bactérienne colimétrique au cours d'un cycle de marée (CALVEZ N. 1999, HALNA du FRETAY B. 2001). Cette qualité d'eau pompée satisfait à la définition d'une « eau propre » si l'on se réfère à la législation américaine. En effet, celle-ci permet la commercialisation directe des mollusques bivalves provenant d'une zone conchylicole dont la contamination moyenne (moyenne géométrique) demeure inférieure à 14 *E. coli*/100 ml d'eau avec 90% au moins des résultats inférieurs à 43 *E. coli*/100 ml.

Cette eau (figure 2) subit au cours des toutes premières



**Figure 2:** Evolution de la contamination colimétrique de l'eau en bassin insubmersible aéré (méthode analytique par filtration ISO 9308-1). Chaque valeur est la moyenne géométrique de 3 résultats analytiques

heures une contamination par le relargage des bactéries présentes dans les coquillages, constat habituel, rappelons le, à tout système de purification, suivie d'une décroissance microbienne continue, dès 3 à 6 heures, permettant à l'eau de retrouver la qualité d'une « eau propre » autour des 24 heures dans l'ensemble du bassin et tout particulièrement dans la couche au contact des coquillages. Cette évolution est au moins aussi avantageuse que celle observée par le procédé de traitement de l'eau par U.V par exemple (CAILLERES 1992). A l'évidence la salubrité des coquillages qu'ils proviennent directement du milieu marin (zone A), ou d'un établissement agréé mettant en œuvre un traitement approprié, n'est et ne peut qu'être le reflet de la qualité de l'eau.

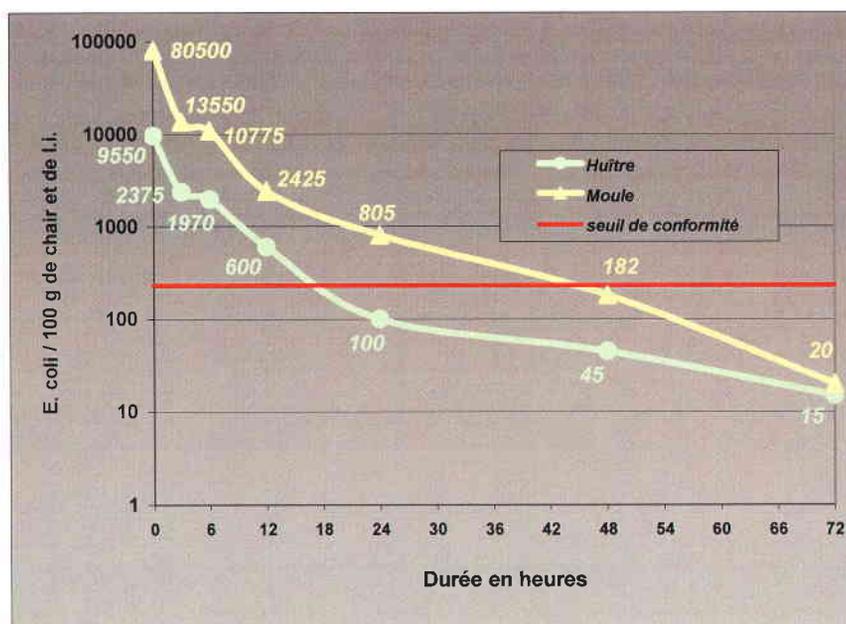
L'évaluation de l'homogénéité de la contamination de l'eau au sein du BIA a été appréciée statistiquement à l'aide du test de Friedman. Ce test a mis en évidence une différence significative entre la couche d'eau de surface, la plus contaminée, les couches intermédiaire et de fond ( $p < 0.01$ ). L'emploi du test de Wilcoxon sur les données des couches intermédiaire et de fond ne permet pas, en revanche, de souligner de différence significative entre elles. On peut donc les assimiler et en moyenner les valeurs. Ce constat relatif à la différenciation bactérienne de la couche d'eau superficielle s'explique par la nature même de l'équipement mis en œuvre. En effet, l'aérateur produit une multitude de microbulles d'air qui, migrant du fond vers la surface, adsorbent les particules en suspension dans l'eau et notamment les bactéries. Ces dernières se retrouvent ainsi piégées à la surface du bassin au sein d'une mousse plus ou moins brunâtre et de la sorte, exposées aux ultra-violets de la lumière naturelle (POMMEPUY 1995) dont les effets bactéricides ont été mis en évidence dès la fin du XIXème siècle. L'application du test de Friedman aux données des colonnes d'eau ne les différencie pas significativement, attestant par là même l'homogénéité de la qualité de l'eau dans l'ensemble du bassin insubmersible .

Ces observations permettent de formuler quelques préconisations à l'usage des professionnels (bonnes pratiques) visant à satisfaire la norme sanitaire en vigueur des coquillages destinés à la consommation humaine. C'est ainsi qu'il convient de pomper l'eau de mer à la période la plus propice, d'évacuer dans toute la mesure du possible la mousse formée en surface du bassin, riche en microorganismes, d'éviter de placer les coquillages dans la couche superficielle plus chargée en bactéries, d'adapter le régime d'aération à la charge de coquillages dans le bassin et à l'espèce, de faciliter la circulation de l'eau,....



### 5.1.2 – Analyse des résultats colimétriques des coquillages

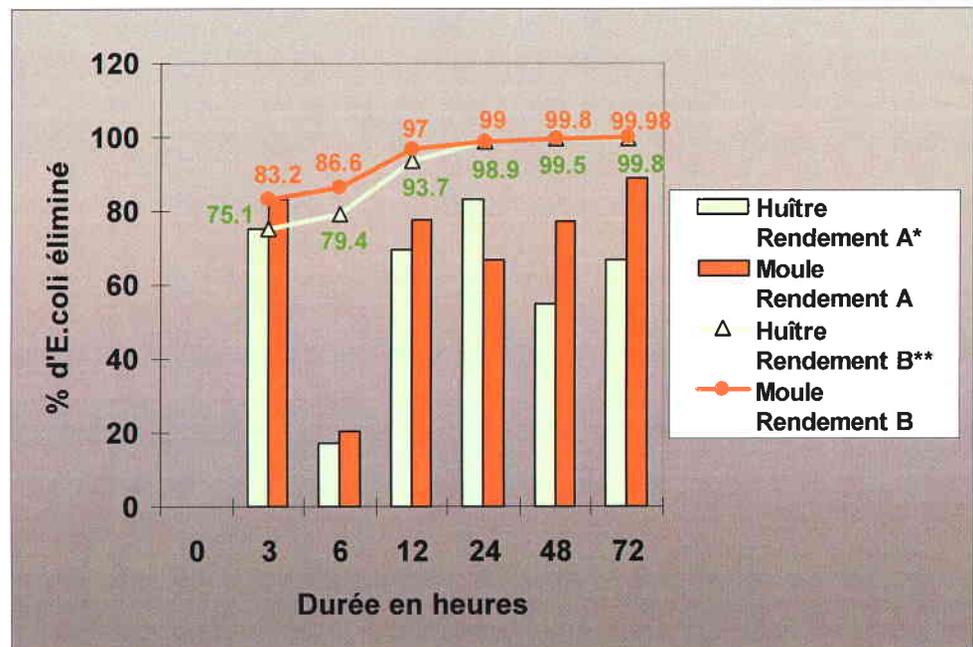
L'interprétation des courbes concernant les coquillages (figure 3) indique une disparité marquée dans l'accumulation des bactéries entériques chez les deux espèces étudiées, la moule concentrant près de 10 fois plus que l'huître creuse. Ce phénomène, déjà étudié (BEUCHER 1993), peut s'expliquer par un pouvoir de rétention supérieur de la moule qui serait dû à une sécrétion plus abondante et une viscosité différente du mucus (MARTEIL 1976, HIS et CANTIN 1995). Par ailleurs, les cinétiques de décontamination de ces deux espèces, sensiblement identiques, laissent apparaître une première phase rapide de décontamination au cours des 12 premières heures, suivie d'une seconde phase plus lente. Ce constat déjà souligné lors des premiers essais de décontamination effectués à la fin des années 1980 (PICLET G., LE MAO P. 1992), est similaire à celui dégagé lors d'études sur la purification de coquillages en eau préalablement stérilisée au chlore, à l'ozone ou aux ultra-violetts (FLEET G.H. 1978, BUISSON D.H. and al. 1981, Morel et al. 1989).



**Figure 3:** Cinétique de décontamination des huîtres et des moules en bassin insubmersible aéré (méthode analytique officielle V08-600). Chaque valeur est la moyenne arithmétique de 4 résultats analytiques

Ces résultats peuvent être également exprimés par l'évolution des pourcentages d'*E.coli* éliminés (figure 4) : purification des coquillages à

97% pour les huîtres et 93% pour les moules au cours des 12 premières heures pour atteindre respectivement 99,7% et 99,9% à 72 heures. Le faible rendement de décontamination des coquillages à 6 heures s'explique par la forte contamination de l'eau lors des premières heures.



**Figure 4:** Evolution des pourcentages d'*E. coli* éliminés au cours de la décontamination en BIA

\* Rendement A : Rendement par rapport à l'étape précédente

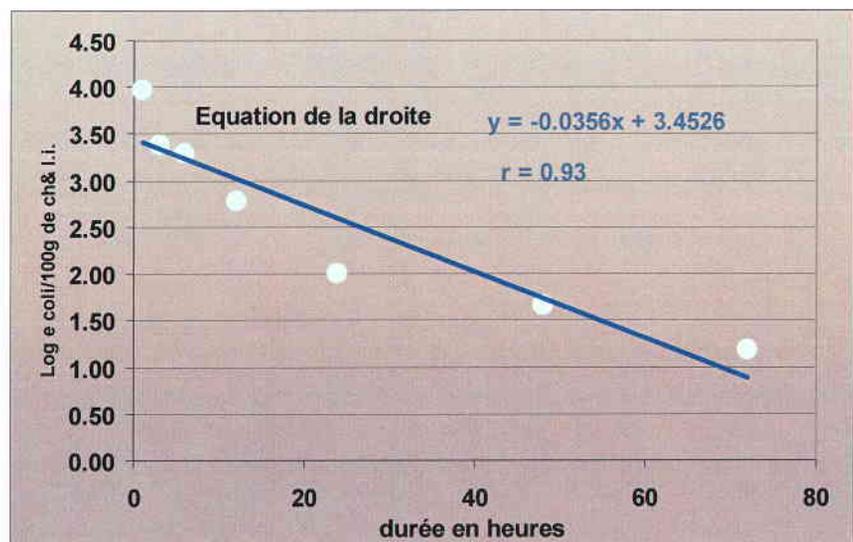
\*\* Rendement B : Rendement cumulé

Ce procédé prouve donc sa réelle efficacité et l'objectif de résultats (< 230 *E. coli*/100g de chair et de liquide intervalvaire) attendu par la profession et les services de l'Etat chargés des contrôles sanitaires est atteint en moins de 24 heures pour les huîtres, et en moins de 48 heures pour les moules, très contaminées initialement.

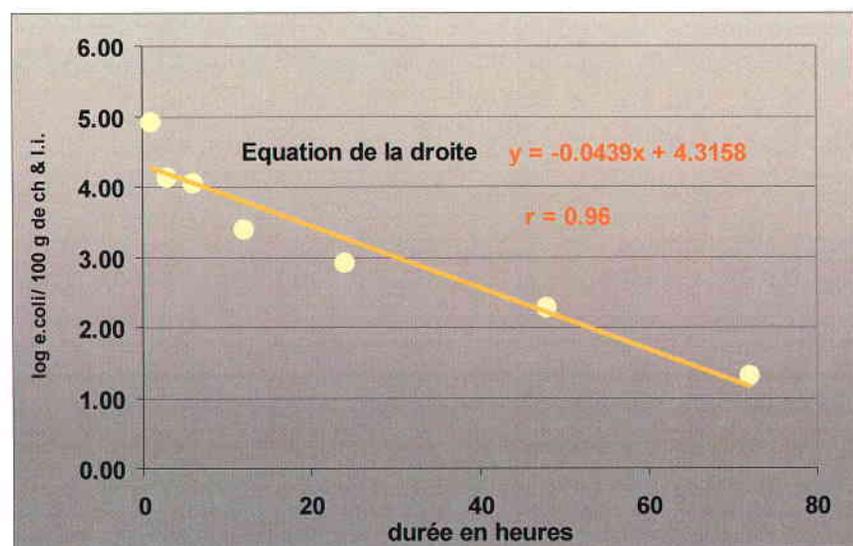
La durée du traitement serait elle primordiale ? La régression linéaire entre la décontamination bactérienne des coquillages et ce facteur en souligne une forte liaison, hautement significative (figures 5 et 6). Ainsi, la durée explique à elle seule 87% de la décontamination des huîtres et



92 % de celle des moules, ceci dans plus de 995 cas sur 1000 (tableau 8). Elle est essentielle à la bonne conduite de cet équipement.



**Figure 5:** Régression linéaire entre la décontamination bactérienne des huîtres et la durée du séjour en BIA.



**Figure 6:** Régression linéaire entre la décontamination bactérienne des moules et la durée du séjour en BIA.

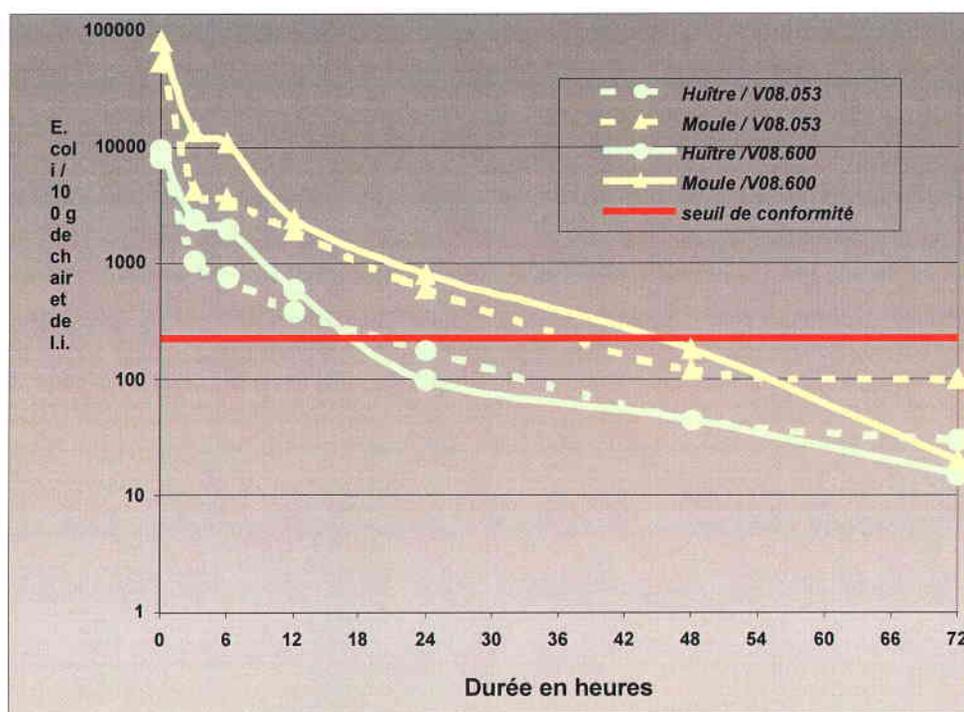
Une autre approche peut également exprimer la performance des BIA, il s'agit du T90, qui est le temps nécessaire pour réduire de 90% la population bactérienne initiale. Dans cette étude, il s'estime à près de 23 heures (intervalle de confiance à 95% : 17.1 à 34.5 heures) pour les moules et à 28 heures pour les huîtres (intervalle de confiance à 95% : 19.4 à 50.8 heures).

Coquillage	Variance liée à la régression	Probabilité	Coeff .r
Huîtres	87%	p < 0.005	0.93
Moules	92%	p < 0.001	0.96

**Tableau 8 :** Caractéristiques des régressions linéaires entre la décontamination des coquillages et la durée du séjour en BIA.

Qu'en est-il de l'homogénéité de la décontamination des coquillages en fonction de leur positionnement dans le bassin, intermédiaire ou fond ? Le test de Wilcoxon ne permet pas de mettre en évidence de différence significative, observation qui se révèle cruciale en matière d'assurance qualité et précieuse aux responsables professionnels comme aux services chargés des contrôles car elle satisfait un point clé relatif à la connaissance opérationnelle des équipements utilisés.

Au cours de cette étude, la cinétique de décontamination des coquillages a également été suivie par une méthode analytique alternative, le dénombrement en milieu gélosé (Norme V08.053). Les résultats sont comparables à ceux obtenus par la méthode officielle (NF V08.600) et les seuils de la norme produits (< 230 *E.coli*/100g de CLI) sont atteints en des temps proches (figure 7), confirmant l'absence de différence significative entre ces méthodes (CALVEZ N. 1999). Cette méthode alternative, plus rapide, a donc été appliquée au second essai sur les coques.



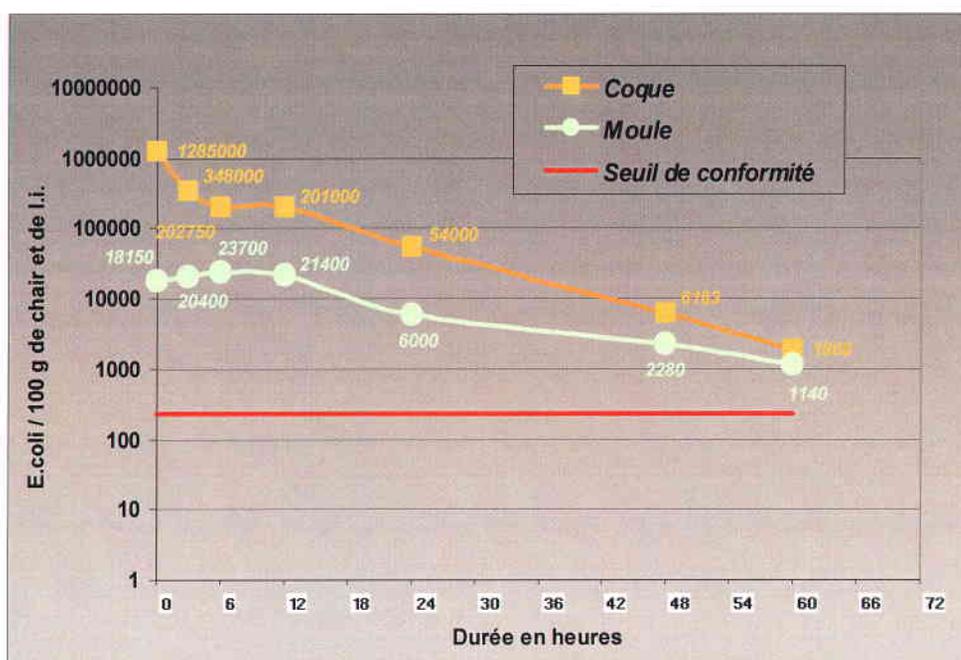
**Figure 7 :** Evolution de la cinétique de décontamination des huîtres et des moules selon les deux méthodologies analytiques mises en pratique.

Chaque valeur est la moyenne arithmétique de 4 résultats analytiques

## **5.2 – Essai de décontamination des coques**

En l'absence d'expérience antérieure sur les coquillages fouisseurs et en particulier les coques, nous avons repris à l'identique, le protocole de contamination expérimenté lors du premier essai, en intégrant une quantité minimale de bivalves non fouisseurs (moules). Malgré la contamination initiale extrême des coques, 70 fois plus importante que celle des moules, totalement déconnectée de la réalité microbiologique des zones conchyloles, nous avons suivi l'étude de leur décontamination (figure 8). Elle ne paraît pouvoir aboutir qu'après 4 à 5 jours de traitement, ce qui, entre autres raisons (probabilité élevée de la présence de germes pathogènes) conforte l'obligation de reparquer les coquillages de zones C et d'en interdire l'exploitation en zones D.





**Figure 8 :** Cinétique de décontamination des coques et des moules en bassin insubmersible aéré (méthode analytique V08.053). Chaque valeur est la moyenne arithmétique de 6 résultats analytiques pour les coques et d'un seul résultat pour les des moules.

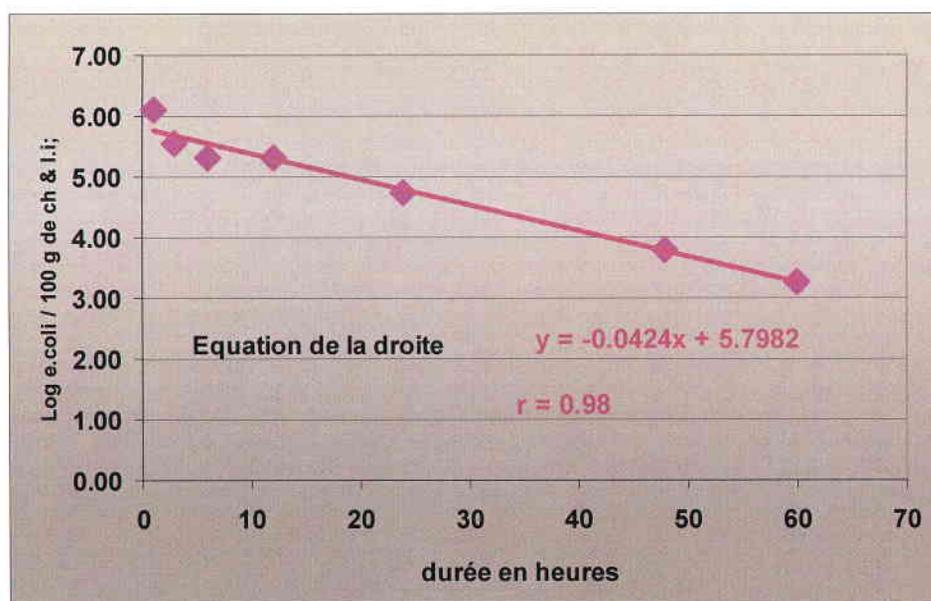
Par ailleurs, la courbe relative aux moules confirme l'impérieuse nécessité de ne pas mélanger les coquillages de groupes différents, voire de lots de qualité bactériologique hétérogène ou encore provenant de zones classées différemment, en raison des risques de recontamination par le transfert continu des germes des coquillages les plus contaminés vers les moins contaminés (PICLET et LE MAO 1992).

L'efficacité de la décontamination en *E. coli*, si elle est inférieure à celle des bivalves non fouisseurs au bout de 12 heures, 84.4 % contre 93.7% (huîtres) et 97% (moules), s'avère par contre tout à fait comparable en fin de traitement, 99.9 % après 60 heures.

On retrouve dans cet essai la liaison hautement significative entre la décontamination et la durée du séjour en BIA (tableau 10 et Figure 9), déjà mise en relief pour les huîtres et les moules lors du premier essai.

Coquillage	Variance liée à la régression	Probabilité	Coeff .r
Coque	96.7%	p < 0.0001	0.98

**Tableau 10 :** Caractéristiques de la régression linéaire entre la décontamination des coques et la durée du séjour en BIA.



**Figure 9 :** Régression linéaire entre la décontamination bactérienne des coques et la durée du séjour en BIA

Quant au T90 de 23.6 heures, il est de même durée que celui des moules, estimé lors du premier essai avec cependant un intervalle de confiance à 95% plus étroit (19.8 à 29.3 heures).

## 6. Conclusion

Le classement des zones conchylicoles de production à travers le monde, prioritairement effectué sur la base de critères bactériologiques, s'inscrit dans une démarche de plus en plus affirmée de limitation des risques sanitaires. Pour ce faire, la législation européenne et donc française se réfère à la qualité des coquillages qui y sont élevés tandis que la réglementation américaine prend en considération la qualité de l'eau. A ce classement en gradients de salubrité sont éventuellement affectés des impératifs techniques assujettis à la qualité finale du produit. Le décret du 28 avril 1994 impose ainsi une purification des coquillages issus de zones classées B, sans toutefois définir la notion d'eau propre et les procédés techniques pour y aboutir. Si l'on se réfère à la réglementation, la notion d'eau propre ne saurait être assimilée à une eau stérile car les coquillages autorisés à la consommation peuvent contenir une faible contamination ( $<230 E.coli/100g$ ). Relevant d'une même approche, la réglementation américaine accepte, quant à elle, une certaine contamination de l'eau des zones salubres. Il en découle que leurs productions de coquillages peuvent être consommées sans traitement préalable.

Aussi, aux procédés classiques de traitement de l'eau avant immersion des coquillages, on peut suggérer la mise en œuvre, au sein des entreprises conchylicoles, d'un équipement spécifique, le bassin insubmersible aéré dont nous avons évalué l'efficacité de décontamination. Cette étude a une fois encore démontré une décroissance continue de la charge bactérienne des bivalves, le seuil de qualité étant atteint, dans notre étude, en moins de 24 heures pour les huîtres et en moins de 48 heures pour les moules, le meilleur rendement purificateur étant obtenu pendant les 12 premières heures du traitement. En retenant la norme américaine comme base de référence pour la définition de « l'eau propre », on constate d'une part que l'eau pompée satisfait à ce critère réglementaire et d'autre part, qu'après une phase de contamination, imputable aux coquillages à purifier et ceci est vrai pour toutes les techniques actuelles, elle retrouve à nouveau ce seuil en 24 heures. Compte tenu de ces éléments et des bonnes pratiques professionnelles en cours, nous proposons en complément, d'éliminer des mousses formées en surface et d'éviter le stockage des coquillages dans la couche d'eau superficielle du bassin. Cette gestion qualitative du bassin insubmersible doit aussi s'assurer d'un approvisionnement en eau de



mer au moment le plus propice de la marée qui se situe le plus souvent de 1 à 2 heures avant la pleine mer.

Ces essais ont montré par ailleurs l'homogénéité de la décontamination des coquillages au sein du bassin insubmersible et une élimination plus rapide des bactéries chez les moules suivie des coque et enfin des huîtres. Ils ont aussi dégagé une relation linéaire significative entre la décontamination et la durée du séjour en BIA.

Les données des services vétérinaires du Finistère, relatives à la qualité des coquillages destinées à la consommation humaine, viennent étayer ces observations. Elles nous informent de la bonne qualité sanitaire des coquillages en provenance des gisements en eau profonde dont 98.1 % des résultats présentent une teneur en *Escherichia coli* inférieure à la norme (< 230 *E. coli* /100g de chair et de liquide intervalvaire). Elles accréditent la réalité d'une décontamination performante des bassins insubmersibles aérés pour les coquillages non fousseurs (98.2 % des résultats inférieurs à 230 *E. coli*), d'une durée en bassin insubmersible plus aléatoire pour les coquillages fousseurs (95.3% des résultats inférieurs à 230 *E. coli*). Moins bien maîtrisée, la purification de quelques coquillages fousseurs mériterait des travaux complémentaires pour parfaire nos connaissances (densité, temps de séjour, mode opératoire) et aider ainsi la profession conchylicole à améliorer la prévention des risques sanitaires.

L'utilisation simultanée d'une méthode alternative rapide (technique en milieu gélosé) et de la méthode de référence (technique du nombre le plus probable en milieu liquide) souligne la bonne adéquation des résultats, corroborant ainsi son évaluation antérieure. Plus souple et moins fastidieuse, cette méthode alternative pourrait être retenue à l'avenir à l'occasion d'essais similaires.



## 7. Bibliographie

**Afnor 2000.** Dénombrement des *Escherichia coli* présumés dans les coquillages vivants, technique du nombre le plus probable, norme NF V 08-600, 13 p.

**Afnor 1999.** Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux de surface et résiduaires, partie 1 : méthode par filtration sur membrane, norme ISO 9308-1, 21 p.

**Afnor 1993.** Dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$  glucuronidase positive par comptage des colonies à 44°C – méthode de routine, norme NF V08.053, 13 p.

**Alibou J. 1987.** Etude de l'évolution simultanée des abondances et de la survie des *salmonella* et des coliformes fécaux dans différents ouvrages épurateurs et milieux aquatiques. Thèse de doctorat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 218 p.

**Aubert J., Zheng T.L. 1989.** The contribution of some marine microorganisms in the decontamination of shellfish, Rev. Int. Oceanogr. Med., 93-94, pp. 3-15.

**Beucher M. 1993.** Etude de l'accumulation, de la rétention et du relargage de bactéries entériques par l'huître *Crassostrea gigas*, mémoire pour l'obtention du diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, 122 p.

**Bougrier S., Geairon P., Deslous-Paoli J.M., Bacher C. et Jonquières G., 1995.** Allometric relationships and effects of temperature on clearance and oxygen consumption rates of *Crassostrea gigas* (Thunberg), Aquaculture, 134, pp. 143 - 154



**Buisson D.H., Fletcher G.C. and Begg C.W. 1981.** Bacterial depuration of the pacific oyster (*crassostrea gigas*) in New Zealand. New Zealand journal of science, **24**, pp. 253 – 262.

**Cabelli V.J., Heffernan W.P., 1970.** Accumulation of *Escherichia coli* by the Northern Quahaug, Appl. Microbiol., 19(2), pp. 239-244.

**Cabelli V.J., Heffernan W.P. 1970.** Elimination of bacteria by the soft shell clam *Mya arenaria*, Journ. Fish. Res. Board Canada., 27, pp. 1579-1587.

**Caillères J.P. 1992.** Traitement de l'eau par ultra-violets, application à la purification des coquillages, Katadyn France. Deuxième conférence internationale sur la purification des coquillages, Rennes 6, 7 et 8 avril, éditions IFREMER, pp. 373 – 386.

**Calvez N. 1999.** Etude comparative de la contamination fécale des coquillages et de l'eau environnante. Rapport de stage pour l'obtention du diplôme universitaire de technologie (UBO Quimper), option agro-alimentaire, 39 p.

**Conseil des communautés européennes 1991.** Directive du conseil 91/492/CEE du 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants, 14 p.

**Commission des communautés européennes 2001.** Règlement (CE) n° 466/2001 du 8 mars 2001 portant fixation des teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires, pp.77/1 – 77/21.

**Convenant A. 1991.** Salmonelles et coquillages en Ile et Vilaine et les Côtes d'Armor, IFREMER R.INT. DEL/91.06/Saint Malo, 46 p.



**Direction Départementale des Services Vétérinaires du Finistère 2003.** Recherche des salmonelles dans les eaux conchylicoles du Finistère sud en octobre 2002, données non publiées.

**Direction Départementale des Services Vétérinaires du Finistère 2003.** Bilan des dénombrements colimétriques dans les coquillages du Finistère destinés à la consommation humaine entre 1999 et 2001, données non publiées.

**Dupray E.(coordinateur) 1999.** Rejets agricoles et bactériologie en baie de la Fresnaye. Rapport IFREMER établi dans le cadre du programme « Bretagne Eau pure », volet 2, 71 p.

**Dupray E., Baleux B., Bonnefont JL. Guichaoua C. Pommepuy M. et Derrien A. 1991.** Apports en bactéries par les stations d'épuration, La mer et les rejets urbains, Bendor 13-15 juin 1990, actes du colloque, 11, pp. 81 – 87.

**Faury N., Masson D. et Ratiskol J. 1992.** Essais de décontamination des huîtres *Crassostrea gigas* en bassin par renouvellement et circulation de l'eau. Purification des coquillages, deuxième conférence internationale, 6-7-8 avril, Rennes (France), R. Poggi et J.Y. Le Gall, éditions IFREMER, pp.233 – 256.

**Fleet G.H. 1978.** Oyster depuration : a review. Food Technol. Aust., **30**, pp. 44-54.

**Haeghebaert S., Le Querrec F., Vaillant V., Delarocque Astagneau E. et Bouvet P. 2001.** Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1998, bulletin épidémiologique hebdomadaire n° 15, 14p.

**Halna du Fretay B. 2001.** Etude de la contamination fécale des coquillages et de l'eau environnante, exemple de l'estuaire de l'Aven. Rapport de stage pour l'obtention du diplôme universitaire de technologie (UBO Quimper), option agro-alimentaire, 32 p.



**Heffernan W.P., Cabelli V.J. 1970.** Elimination of bacteria by the Northern Quahaug *Mercenaria mercenaria*, environmental parameters significant to the process. Journ. Fish. Res. Board Canada., 27, pp. 1569-1577.

**Heffernan W.P., Cabelli V.J. 1971.** The elimination of bacteria by the Northern Quahaug : variability in the reponse of individual animals and the development of criteria., Proceed of the Nat. Shellfish. Assoc., 61, pp. 102-108.

**His E. et Cantin Ch. 1995.** Biologie et physiologie des coquillages. IFREMER, Diecton de l'environnement et de l'aménagement littoral, R.INT. DEL/95.06/Arcachon, 108 p.

**Jones P.W. 1992.** Salmonellas in animal wastes and hazards for other animals and humans from handling animal wastes, Salmonella and salmonellosis, 15 – 17 sept., Ploufragan – France, pp. 280 – 294.

**Lees D.N., Nicholson M. and Tree J.A. 1994.** The relationship between levels of E. coli in shellfish and in seawater with reference to legislative standards, First international conference on molluscan shellfish safety, Sydney Australia, november 94, 13p.

**Le Guyader F., Miossec L., Haugareau L., Dubois E., Kopecka H. and Pommepuy M. 1998.** RT-PCR evaluation of viral contamination in live shellfish beds over a 21 months period, Water Sci. Techn., 38, n°12, pp. 45 - 50.

**Marteil L. et Coll. 1976.** La conchyliculture française, 2<sup>ème</sup> partie : biologie de l'huître et de la moule, revue des travaux de l'Institut Scientifiques et Techniques des Pêches Maritimes, tome XL, fasc.2, 348 p.

**Miossec L. et Vaillant V. 2001.** Epidémiologie des gastro-entérites virales associées à la consommation de coquillages, bulletin de la société française de microbiologie, vol. 16, n°2, pp. 103 – 112.



**Monfort P., Minet J., Rocourt J., Piclet G. and Cormier M. 1998.** Incidence of *Listeria* spp. In Breton live shellfish. Letters in applied microbiology, 26, pp. 205 –208.

**Monfort P., Piclet G., Le Gal D., Raguénes P., Le Naour G., Boulben S., et Le Saux J.C. 1997.** Incidence de *Salmonella* spp. Dans les bivalves issus de zones conchylicoles du Finistère (France). Colloque salmonelles et salmonelloses, 20, 21 et 22 mai Ploufragan, France, pp.431 – 433.

**Morel M., Cuvelier N., Hitier B. et Ruelle F. 1989.** Purification des moules dans de l'eau de mer désinfectée aux ultra-violets. Rapport interne de la Direction des Ressources Vivantes, IFREMER, 89.028 CSRU / Boulogne, 22 p.

**Piclet G. et Le Mao P. 1992.** Qualité sanitaire des coquillages après passage en bassin insubmersible aéré. Deuxième conférence internationale sur la purification des coquillages, Rennes 6 7 et 8 avril, éditions IFREMER, pp.303-313.

**Pommepuy M. 1995.** Devenir des bactéries entériques en milieu littoral. Effet du stress sur leur survie. Thèse en vue du Doctorat de l'Université de Rennes 1, 147 p.

**Préfecture du Finistère 2000.** Arrêté n° 2000/0806 du 25 mai 2000 portant classement de salubrité et surveillance sanitaire des zones de production des coquillages vivants dans le département du Finistère, 3 p. + annexes.

**République française 1999.** Arrêté du 21 mai 1999 relatif au classement de salubrité et à la surveillance des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants, journal officiel de la république française du 10 juin 1999, pp. 8508 – 8509.



**République française 1994.** Décret n° 94-340 du 28 avril 1994 relatif aux conditions sanitaires de production et de mise sur le marché des coquillages vivants, journal officiel de la république française du 30 avril 1994, pp. 66342 – 6345.

**Richards G.P. 1988.** Microbiological purification of shellfish : a review of depuration and relaying., J. Food. Prot. , 51 (3), pp. 51-65.

**Rowse A.J., Fleet G.H. 1984.** Effects of water temperature and salinity on elimination of *Salmonella charity* and *Escherichia coli* from Sydney rock oysters (*Crassostrea commercialis*)., Appl. And Environ. Microbiol., 48(5), pp. 1061-1063.

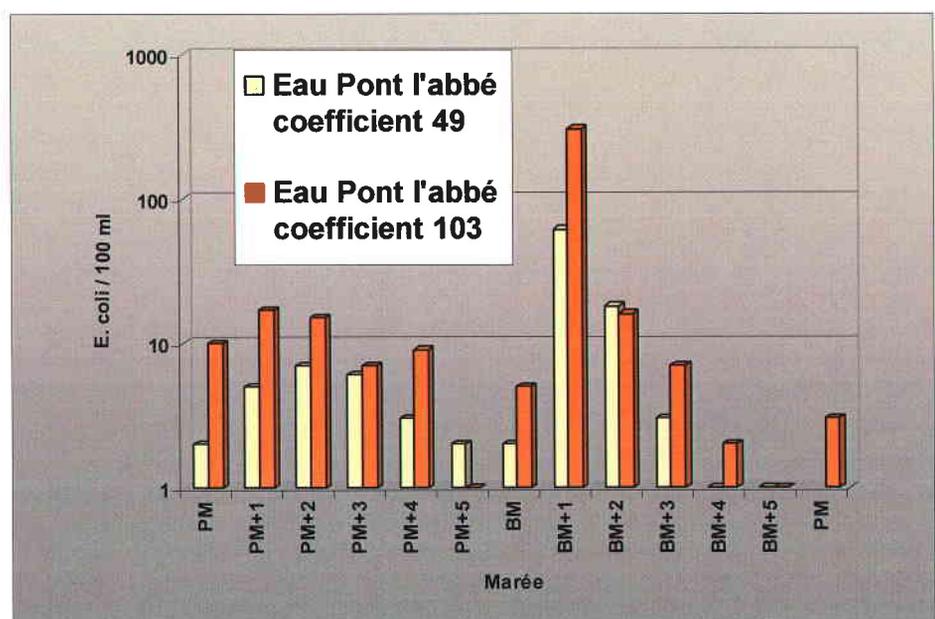
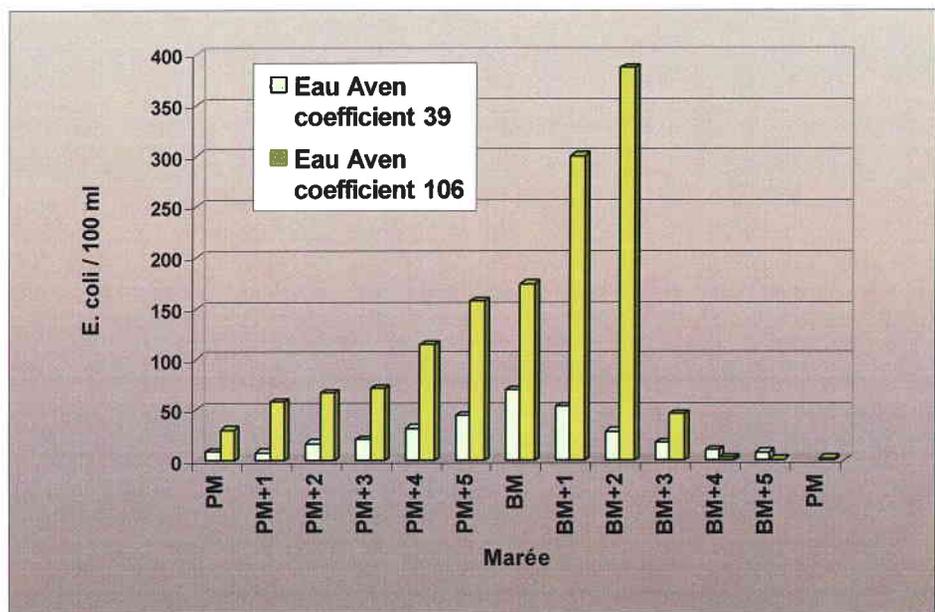
**Schwartz D. 1995.** Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes, 4<sup>ème</sup> édition. Médecine sciences Flammarion. 313 p.

**Siegel S. 1954.** Nonparametric statistics for the behavioral sciences. International Student edition, 312 p.

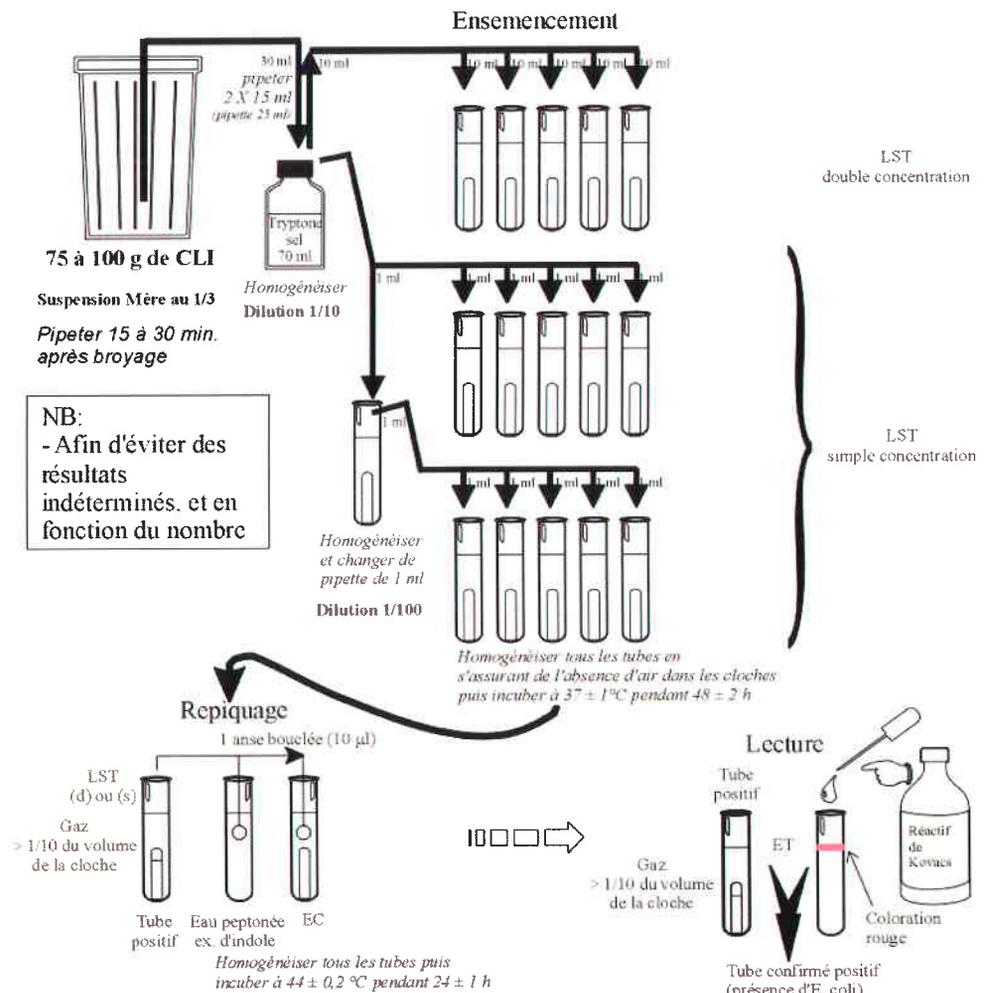
**Timoney J.F., Abston A. 1984.** Accumulation and elimination of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by hard clams in an « in vitro » system., Appl. And Environ. Microbiol. 48(5), pp.986-988.



**Annexe 1 :** Evolution de la contamination colimétrique de l'eau au cours d'un cycle de marée sur deux sites conchylicoles du Finistère



## Annexe 2 : Dénombrement des *Escherichia coli* dans les coquillages en milieu liquide (technique du nombre le plus probable – norme AFNOR V08.600)



### Choix des dilutions

Noter le nombre de tubes positifs par dilution. Il faudra retenir 3 dilutions consécutives.

Cas 1 : Au moins une dilution révèle 5 tubes positifs

- Choisir la dilution la plus élevée révélant 5 tubes positifs et les 2 dilutions suivantes.
- Si toutes les dilutions révèlent 5 tubes positifs, choisir les 3 dilutions les plus élevées.

Cas 2 : Aucune dilution ne révèle 5 tubes positifs

- Choisir les 3 dilutions les plus élevées de la série

Cas particulier : plusieurs dilutions choisies ne révèlent pas de tube positif.

- Retenir la dilution la moins élevée ne contenant pas de tubes positifs ainsi que les 2 dilutions précédentes

### Détermination du coefficient NPP

Lire sur la table NPP correspondant au volume de l'inoculum. Seuls les résultats de catégorie 1 et 2 seront acceptés

### Calcul du NPP

NPP = coefficient NPP x 1/ première dilution choisie

Si tous les tubes sont négatifs le résultat est : < 18 *E. coli* / 100 g de CLI

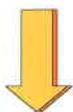
Les résultats > 1000 sont arrondis à la dizaine inférieure si l'unité < 5 et à la dizaine supérieure si l'unité > ou = 5.

**Annexe 3 :** Dénombrement des *Escherichia coli* dans les coquillages en milieu gélosé (norme AFNOR V08.053)

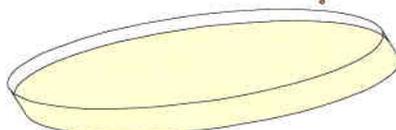
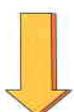


Broyage 1 mn à 15000t/mn

Prélever 75 g de chair et de liquide intervalvaire  
Ajouter 150 g de diluant tryptone sel pour obtenir  
une dilution au 1/3.

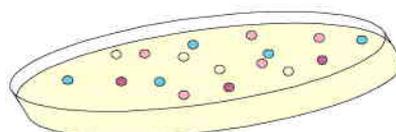


Transférer le broyat dans un sac stomacher muni  
d'un filtre et laisser reposer de 15 à 30 mn



Prélever 1 ou 3 ml du broyat et les transférer  
dans une boîte de pétri  
Ajouter le milieu chromogène (RGBCIG)  
maintenu en surfusion puis homogénéiser

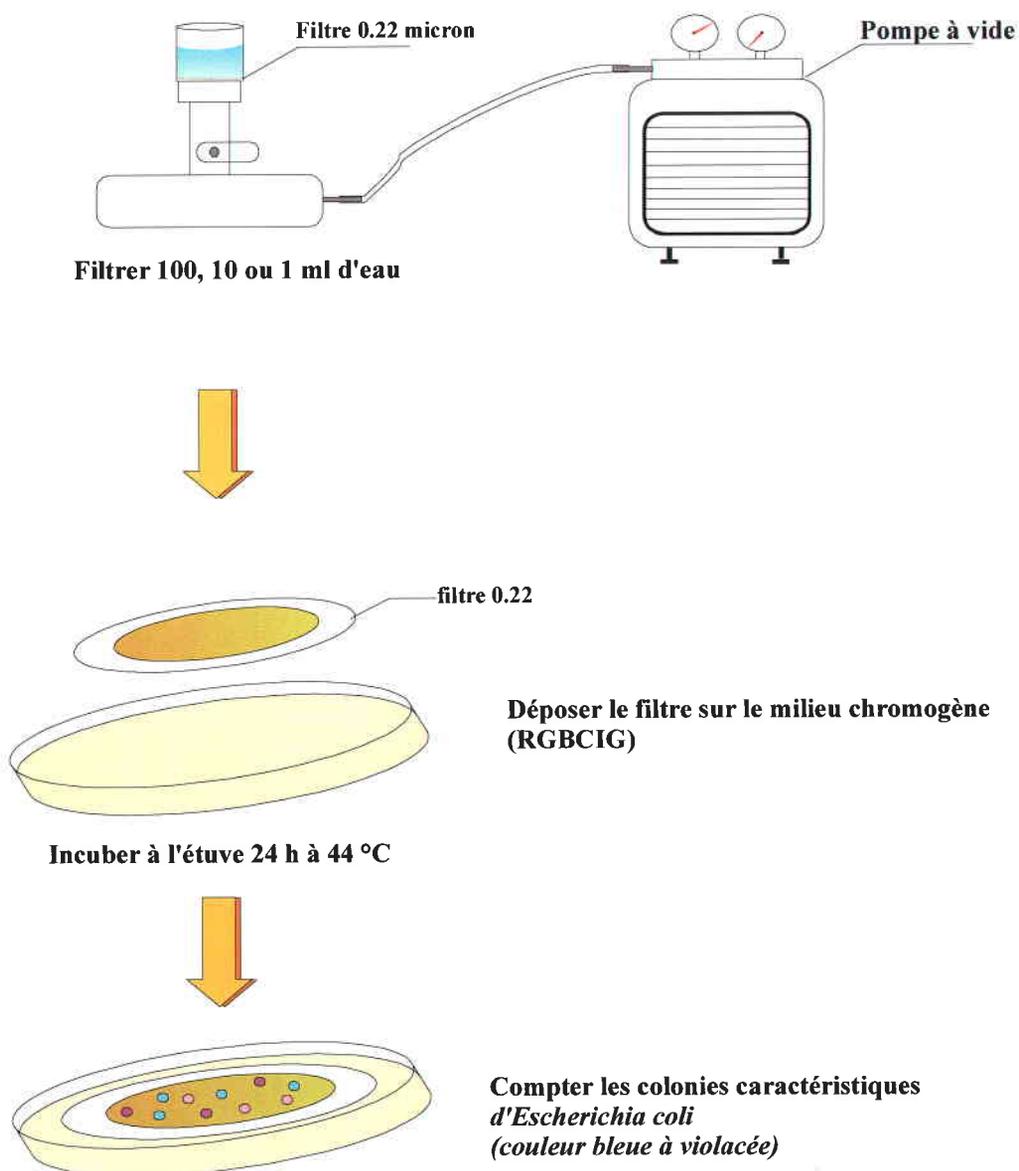
Incuber à l'étuve 24 h à 44°C



Compter les colonies caractéristiques  
d'*Escherichia coli*  
(couleur bleue à violacée)



**Annexe 4 :** Dénombrement des *Escherichia coli* dans les eaux en milieu gélosé (norme ISO 9308-1)



*Impression : Service TMSI/IDM/RIC  
IFREMER – Centre de Brest  
BP 70 – 29280 Plouzané  
Tél. : 02 98 22 43 53*