

GRAND PROGRAMME QUALITE - EPURATION DES EAUX

**I - ETUDE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE
POUR LA DETECTION DES ENTEROBACTERIES
EN EAU DE MER**

H. MELIKECHI - M. POMMEPUY - M.P. CAPRAIS

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
A - MATERIEL ET METHODES	3
1 - MATERIEL	3
2 - METHODES	4
3 - EXPERIMENTATIONS	5
3.1 - Etude de la souche d'<i>E. coli</i> H10407 induite	5
3.1.1 - Effet de la présence de matière organique en eau douce et en eau de mer	5
3.1.2 - Etude de la persistance de l'activité β -galactosidase en fonction de la viabilité des bactéries	6
3.1.2.1 - <i>Effet du chloramphénicol</i>	6
3.1.2.2 - <i>Lyse bactérienne par congélation-décongélation</i>	6
3.1.2.3 - <i>Effet du chlore</i>	6
3.1.2.4 - <i>Destruction des bactéries par la température</i>	6
3.1.3 - Etude de la variation de l'intensité de l'activité enzymatique en fonction de l'état physiologique (phase de croissance) d'<i>E. coli</i>	7
3.2 - Etude d'effluents épurés de stations d'épuration dilués en eau de mer	7
B - RESULTATS ET DISCUSSION	8
1 - ETUDE DE LA SOUCHE D'<i>E. COLI</i> H 10407 INDUITE :.....	8
1.1 - Effet de la présence de matière organique en eau douce et en eau de mer	8

1.2 - Etude de la persistance de l'activité β-galactosidase en fonction de la viabilité des bactéries	9
1.2.1 - Etude de l'activité enzymatique après traitement	9
1.2.1.1 - Effet du chloramphénicol.....	9
1.2.1.2 - Effet de la lyse bactérienne	9
1.2.1.3 - Effet des bactéries par le chlore et la température	10
1.2.1.4 - Conclusion.....	10
1.2.2 - Evolution de la souche dans l'eau de mer après traitement	11
1.2.2.1 - Effet du chloramphénicol.....	11
1.2.2.2 - Effet de la lyse bactérienne	11
1.2.2.3 - Conclusion.....	12
1.3 - Etude de l'influence de l'état physiologique d'E. coli sur l'activité enzymatique	12
2 - CAS DES EFFLUENTS EPURES DILUES EN EAU DE MER	13
C - ETUDE DES CORRELATIONS	15
1 - CORRELATION ENTRE LES ACTIVITES ENZYMATIQUES ET LES NUMERATIONS BACTERIENNES	15
1.1 - Evaluation de l'activité enzymatique des bactéries non stressées à T0	15
1.2 - Evolution de l'activité enzymatique en fonction du temps de séjour de la bactérie en eau de mer	16
2 - CORRELATION ENTRE LES ACTIVITES β-GALACTOSIDASE ET β-GLUCURONIDASE	17
CONCLUSION	18
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	19

INTRODUCTION

L'état physiologique des bactéries peut être apprécié par la mesure de leur activité enzymatique.

La mesure des activités enzymatiques β -galactosidase et β -glucuronidase permet d'évaluer la contamination bactérienne en utilisant le 4-méthylumbelliferyl- β -D-galactosidase (MUGal) et le 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronidase (MUGLu) comme substrats respectifs (Berg et Fiksdal, 1988).

Le principe de cette mesure est basé sur l'hydrolyse enzymatique du substrat aboutissant à un produit fluorescent : le méthylumbelliférol (MUF).

Cette méthode alternative, permettant de détecter des indicateurs de contamination fécale, s'avère intéressante pour sa sensibilité et sa rapidité par rapport aux méthodes classiques de numération des coliformes fécaux (Feng et Hartman, 1982), ce qui est important quand il s'agit de prendre des décisions rapides lors de pollutions côtières.

Toutes les méthodes de numération des coliformes thermotolérants sont basées sur l'acidification et la fermentation du lactose. Or, les travaux de Munro (1988) mettent en évidence une perte de cette activité lors d'un séjour en mer d'*E. coli* au bout de 9 à 10 jours. D'autres auteurs (Guthrie et Scovill, 1984) notent l'apparition de colonies lactose négatives atypiques d'*E. coli*.

Enfin, diverses études se sont basées sur ces techniques pour la détection des coliformes fécaux aussi bien dans des eaux d'estuaires, des aliments ou des échantillons cliniques (Frampton et Restaino, 1993).

Ces techniques donnent une idée correcte de la contamination fécale ; une bonne corrélation entre la présence de coliformes fécaux et l'activité enzymatique est observée par Pommepuy *et al.* en 1993.

La limite de détection de cette technique est estimée à 10^2 - 10^3 coliformes fécaux/100 ml, ce qui correspond aux normes européennes pour les eaux de baignades. L'importance des nutriments contenus dans l'eau de mer a été prouvée quant à l'expression enzymatique (Apte et Batley, 1994). La β -galactosidase ainsi que la β -glucuronidase sont des enzymes inductibles et leur expression dépend de certains facteurs physiologiques et génétiques des bactéries (Martins *et al.*, 1993). Le lactose est un facteur inducteur de la β -galactosidase. En effet, lorsque le lactose est ajouté à une culture bactérienne dans un milieu sans lactose, la β -galactosidase et la perméase sont synthétisées presque simultanément. La présence du lactose augmente le nombre de ces protéines d'un facteur de 10^5 (Freifelder, 1990).

Cependant, Apte *et al.* (1994) constatent, contrairement à d'autres auteurs (Warren *et al.*, 1978 ; Berg et Fiksdal, 1988), que l'addition de lactose dans le milieu n'augmente pas la sensibilité ; ils observent plutôt l'effet inverse.

En fait, le lactose est rarement utilisé dans les expériences d'induction car la β -galactosidase synthétisée clive le lactose, entraînant une diminution de la concentration en lactose. Pour palier à ce problème, l'utilisation d'un analogue contenant un atome de soufre : l'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) est recommandée par Diehl (1991) afin d'augmenter la réponse enzymatique.

Dans l'environnement marin, certains facteurs tels que le manque de nutriments, la salinité ou la température créent des conditions non optimales pour la croissance des bactéries et affectent leur état physiologique. Des enzymes telles que les hydrolases sont souvent mises en jeu pour l'assimilation de certains éléments nutritifs ; les substrats étant alors plus facilement accessibles par les cellules bactériennes. L'enzyme 4-méthylumbelliferyl-heptanoate-hydrolase (MUHase) produite par une souche d'*E. coli* en eau de mer a été étudiée par Fiksdal *et al.* en 1989. Une augmentation de l'activité enzymatique semble être en relation avec l'adaptation des bactéries aux conditions nutritives du milieu marin.

La salinité est aussi un des facteurs influençant l'activité enzymatique. En effet Apte et Batley, en 1994 constatent, sur des effluents dilués en eau de mer, une diminution de la réponse enzymatique en fonction de la salinité.

Dans cette étude, les activités enzymatiques β -galactosidase et β -glucuronidase sont mesurées pour détecter la présence de coliformes fécaux et d'*E. coli* dans l'eau de mer. Des effluents épurés, prélevés à la sortie de stations d'épuration et dilués en eau de mer sont aussi testés par ces techniques et suivis pendant environ 2 semaines.

A - MATERIEL ET METHODES

1) MATERIEL

- Souche d'*E. coli* H10407,
- Effluents épurés prélevés à la sortie des stations biologiques de Maison Blanche et de Brest.

Tableau 1 : caractéristiques des effluents

Effluent	Maison Blanche			Brest		
	Date du prélèvement	22/07/93	12/08/93	31/08/93	12/08/93	31/08/93
Matières en suspension (MES)		9,80	4,80	14,40	17,20	34,20
Matières volatiles à 550 °C		8,60	-	13,40	-	32,0
Carbone organique total (COT)		12,93	9,20	19,30	12,65	24,90
Carbone organique dissous (COD)		10,71	8,64	15,80	9,65	15,45
Ammonium (NH ₄)		34,10	-	45,0	-	50,70
Phosphates (PO ₄)		19,0	-	30,10	-	22,70

Les valeurs sont exprimées en mg/l.

- Eau de mer artificielle (Instant Ocean), filtrée à 0,2 µm et autoclavée pendant 20 min à 120 °C.
- Milieu de base pour l'induction : hydrolysate de caséine (2,5 g), KH₂PO₄ (2 g), K₂HPO₄ (7 g), (NH₄)₂SO₄ (1g), MgCl₂ · 6H₂O (0,1 g), eau distillée (1 l).
- Milieux de culture pour les numérations bactériennes :

gélose Trypticase, incubation 18 h à 37 °C,
gélose lactosée de Drigalski, incubation 18 h à 42 °C,
gélose lactosée de Mac Conkey, incubation 18 h à 44 °C.

- Réactifs utilisés :

Inducteur : Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) -SIGMA chimie-
Tampon phosphate 0,05 M, pH 8,0 (KH₂PO₄ 0,1 M, NaOH 0,1 M, SLS 0,5 mg/ml)
Tampon phosphate 0,05 M, pH6,4 (KH₂PO₄0,1 M,NaOH 0,1 M)

Substrat (MUGal) : préparé extemporanément en ajoutant du 4-méthylumbelliferyl-β-D-galactoside à une concentration de 0,74 mM/l dans du tampon phosphate 0,05 M, pH 8. Après dissolution totale à une température voisine de 80 °C, la solution est filtrée sur 0,2 µm.

Substrat (MUGlu) : préparé extemporanément en ajoutant du 4-méthylumbelliferyl-β-D-glucuronide à une concentration de 1 mg/ml dans de l'eau tritonée.

L'eau tritonée est obtenue en introduisant 2 gouttes de triton X dans 100 ml d'eau distillée, puis autoclavée pendant 15 min à 120 °C. Le substrat MUGlu est dissout en chauffant légèrement puis filtré sur 0,2 µm.

Un spectrofluorimètre type SEQUOIA-TURNER modèle 450 est utilisé pour la mesure de la fluorescence du produit de la réaction enzymatique (MUF). Des tubes en quartz permettant le passage des UV, sont utilisés ; la lecture se fait à 360 nm pour l'excitation et à 450 nm pour l'émission.

2) METHODES

Mesure de l'activité enzymatique

Activité β-D-galactosidase : dans un erlen placé dans un bain marie agité à 44 °C sont introduits 13,5 ml de tampon phosphate 0,05 M, pH 8 additionné de SLS à 0,5 mg/ml et 9 ml de substrat MUGal.

Un volume adéquat, selon l'activité de l'échantillon à analyser, est filtré sur un filtre Nucléopore 0,2 µm. Le filtre est introduit dans le mélange tampon phosphate-substrat à T0.

La cinétique de fluorescence est alors suivie à intervalles de 5 mn pendant 30 minutes. Pour chaque mesure, 2,5 ml d'échantillon sont prélevés, additionnés de 100 µl de NaOH 10 N, puis introduits dans la cuve de mesure.

Pour chaque série, un blanc est réalisé et chaque échantillon est mesuré 2 fois.

Activité β-D-glucuronidase : la méthode de mesure est identique à celle de la β-D-galactosidase en introduisant 17 ml de tampon phosphate 0,05 M, pH 6,4 dans un erlen et 3 ml de substrat MUGlu.

Calcul de l'activité enzymatique

Les cinétiques de fluorescence sont calculées par l'intermédiaire des pentes des droites ajustées par la méthode des moindres carrés.

L'activité enzymatique par litre s'exprime par µmole de MUF produite par litre et par minute et est donnée par l'expression :

$$\text{Act. enzym./litre} = (\Delta F_m - \Delta F_t) \cdot \Delta F_c \frac{V}{v}$$

où

- ΔFm = pente moyenne des 2 réplicats
- ΔFt = pente du témoin
- ΔFc = pente de la courbe de calibration
- V = volume de la solution tampon dans l'erlen en ml
- v = volume de l'échantillon filtré en ml

Pour la détermination du ΔF_c , la fluorescence de solutions de 0,1 à 1 $\mu\text{M/l}$ de 4-méthylumbelliféron dans du tampon phosphate est mesurée par le spectrofluorimètre.

L'activité enzymatique par cellule, exprimée par μmole de MUF produite par cellule et par minute est donnée par l'expression :

$$\text{Act. enzym./cellule} = \frac{\text{Act./litre}}{\text{nb. de bactéries / litre}}$$

3) EXPERIMENTATIONS

Dans le cadre de cette étude, différents types d'expériences ont été réalisés.

3.1. Etude de la souche d'*E. coli* H10407 induite

Suite aux résultats obtenus précédemment (rapport G.P.Q.E., janvier 1993) où l'activité β -galactosidase était très faible, des essais d'induction de la souche d'*E. coli* H10407 ont été réalisés, à l'aide de l'IPTG.

- Préparation de la souche :

Une anse de culture de la souche d'*E. coli* H10407 est introduite dans 9 ml de milieu de base et 1 ml d'IPTG 2,5 mM. La culture bactérienne est incubée pendant 18 heures à 37 °C sous agitation.

La culture bactérienne est centrifugée et lavée à l'eau physiologique et le culot est récupéré dans 100 ml d'eau (eau douce ou eau de mer selon l'expérience).

Sur la souche ainsi induite, les expériences ont été réalisées pour mettre en évidence le rôle de la matière organique sur la survie en eau de mer et étudier les variations de l'activité enzymatique en fonction de l'état physiologique de la bactérie.

3.1.1. Effet de la présence de matière organique en eau douce et en eau de mer

Des expériences réalisées entre avril et juillet 1993 ont été faites sous différentes conditions :

- La survie d'*E. coli* (induit) est suivie en eau douce et en eau de mer à 30 ‰.
- Trois températures ont été testées (8 °C, 15 °C et 22 °C).
- L'apport de la matière organique a aussi été considéré (le même effluent a été utilisé pour les trois températures).

Cet effluent filtré sur 0,22 μm (après passage sur 3 μm et 0,45 μm) est dilué dans l'eau à différentes concentrations (0 %, 25 % et 50 %) puis stérilisé pendant 20 minutes à 120 °C.

Sous ces diverses conditions, les numérations d'*E. coli* sur gélose Trypticase ainsi que l'activité β -galactosidase ont été suivies pendant une semaine.

3.1.2. Etude de la persistance de l'activité β -D-galactosidase en fonction de la viabilité des bactéries

Lors des premières expérimentations (rapport GPQE, janvier 1993), on avait constaté que l'activité enzymatique se maintenait plus longtemps que le caractère cultivable d'*E. coli*. Il nous a donc paru intéressant de corréler l'activité enzymatique en fonction du nombre de bactéries cultivables. Des expériences ont alors été réalisées, à 15 °C, sur des souches d'*E. coli* stressées (en présence d'antibiotique inhibant la synthèse des protéines), lysées par congélation-décongélation, chlorées ou détruites à haute température. Ceci afin de voir si l'activité enzymatique peut persister lorsque les bactéries sont mortes ou viables non cultivables.

3.1.2.1. Effet du chloramphénicol

Le chloramphénicol est un antibiotique qui inhibe la synthèse des protéines.

Au cours de cette expérience, la souche est induite suivant le même protocole que celui décrit précédemment et l'on introduit dans les cultures, au bout de 9 h d'incubation, des concentrations de 0, 10, 100 et 250 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol dans différents échantillons. Les cultures sont incubées à 37 °C sous agitation pendant environ 12 h. Les culots bactériens récupérés après lavage sont remis en suspension dans 100 ml d'Instant Ocean à 34 ‰ (sans apport de matière organique).

3.1.2.2. Lyse bactérienne par congélation-décongélation

Une fraction de la culture bactérienne induite, diluée dans l'eau de mer est soumise à 6 cycles de congélation à - 80 °C suivie de décongélation à 44 °C. Après addition de lysozyme à 0,2 $\mu\text{g/ml}$ de culture, l'échantillon est incubé à 37 °C pendant 30 minutes.

Au cours de la seconde expérience (09/08), deux échantillons ont été traités, l'un en eau de mer à 34 ‰, l'autre en eau douce.

Afin de se rendre compte de l'efficacité de la lyse bactérienne, les échantillons sont observés en épifluorescence.

3.1.2.3. Effet du chlore

Dans un flacon, une autre fraction de 10 ml de culture est mise en contact pendant une heure avec 1 ml d'eau de Javel concentrée. La solution est filtrée sur 0,22 μm et le filtre lavé à l'eau physiologique est introduit dans 10 ml d'Instant Ocean à 34 ‰.

3.1.2.4. Destruction des bactéries par la température

Un flacon de 10 ml de la culture induite diluée dans l'eau de mer est autoclavé pendant 10 minutes à 115 °C afin d'analyser le cas de bactéries mortes.

Après tous ces traitements, des numérations ainsi que des mesures de l'activité β -galactosidase sont réalisées sur ces différents échantillons.

3.1.3. Etude de la variation de l'intensité de l'activité enzymatique en fonction de l'état physiologique (phase de croissance) d'*E. coli*

Afin de comparer l'activité enzymatique des bactéries à différentes phases de croissance (phases exponentielle et stationnaire), deux cultures d'*E. coli* induit de 12 h et 38 h d'incubation à 37 °C sont réalisées. Après lavage des bactéries à l'eau physiologique, les culots sont repris dans 10 ml d'eau de mer. Les densités optiques des deux échantillons sont mesurées ; l'échantillon en phase stationnaire de croissance est dilué de façon à avoir une densité optique proche de celle de l'échantillon en phase exponentielle.

Des numérations et des mesures de l'activité β -galactosidase sont suivies sur ces échantillons maintenus à 15 °C et à l'obscurité pendant environ 15 jours.

3.2. Etude d'effluents épurés de stations d'épuration dilués en eau de mer

Des effluents épurés sont prélevés à la sortie de la station biologique de Maison Blanche et/ou de Brest, les 21 juillet, 13 août et 30 août 1993.

Les effluents sont dilués au 1/10e et au 1/50e dans l'eau de mer artificielle à 34 ‰. Les flacons sont maintenus environ 2 semaines à 15 °C à l'obscurité sous agitation magnétique (150 t/min).

Des prélèvements sont réalisés régulièrement de façon à suivre les numérations bactériennes ainsi que les activités enzymatiques β -D-galactosidase et β -D-glucuronidase.

B - RESULTATS ET DISCUSSION

1) ETUDE DE LA SOUCHE D'*E. COLI* H 10407 INDUITE :

1.1. Effet de la présence de matière organique en eau douce et en eau de mer

Trois expériences ont été réalisées (13-19 avril (fig. 1) ; 20-26 avril (fig. 2) et 6-13 juillet (fig. 3)) avec la même qualité de matière organique et à des températures de 8 °C, 15 °C et 22 °C. D'une manière générale, une bonne survie d'*E. coli* est observée en eau douce pendant les 6 à 7 jours d'expérience avec un léger effet de protection à 25 et 50 % d'effluent par rapport au témoin.

En eau de mer à 30 ‰, l'effet de la salinité sur la survie d'*E. coli* est visible. Une chute d'au moins une unité Log est observée au bout du 6e jour d'expérience sur tous les échantillons allant jusqu'à 3 unités Log pour les échantillons à 50 % d'effluent (fig. 2 et 3). Dans tous les cas, l'apport de matière organique de l'effluent en eau de mer ne semble pas protéger la survie des bactéries. Ces résultats ont été observés lors de l'étude menée entre septembre et décembre 1992 sur la souche d'*E. coli* H10407 non induite.

Fiksdal et Midttun (1993) notent que la capacité de protection de l'effluent augmente lorsque le nombre de bactéries atteint des valeurs faibles, de l'ordre de 10^3 à 10^4 UFC/ml. Dans notre étude, les numérations de départ étaient de l'ordre de 10^6 UFC/ml et nous observons en eau de mer, lorsque les numérations atteignent cet ordre de grandeur (10^3 à 10^4 UFC/ml) une chute moins prononcée pour les échantillons à 25 et 50 % d'effluent à 22 °C et à 50 % d'effluent à 15 °C (fig. 1 et 3).

Les valeurs des T90 (temps correspondant à la perte de cultivabilité de 90 % de la population bactérienne) ont été calculées pour ces différentes expériences.

En eau douce, l'apport de l'effluent augmente la valeur du T90 de 4 jours à plus de 20 jours (13-19/04 et 20-26/04). Ceci n'a pas été le cas lors de l'expérience du 6 au 13 juillet.

En eau de mer, le T90 n'augmente pas en présence de l'effluent mais, on observe plutôt l'effet inverse. Ceci traduit le fait que, dans un milieu hostile tel que l'eau de mer, la matière organique n'est pas toujours utilisée et de ce fait n'a pas toujours un effet protecteur pour la survie des bactéries. Les conditions de mise en oeuvre d'un mécanisme d'halotolérance par les bactéries ne seraient pas réunies dans notre étude.

Lors de ces expériences, une baisse de l'activité enzymatique par litre est observée pendant les deux premiers jours. A une salinité de 30 ‰ et à 22 °C (13-19/04), cette baisse de l'activité n'est observée qu'entre les 2e et 4e jours. A TO, les valeurs des activités par litre varient de 0,1 à 4 $\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ selon l'expérience.

Les valeurs des activités par cellule varient peu à salinité 0 ‰ tout au long de l'expérience, on observe une augmentation progressive de l'activité par cellule en fonction du temps à 30 ‰.

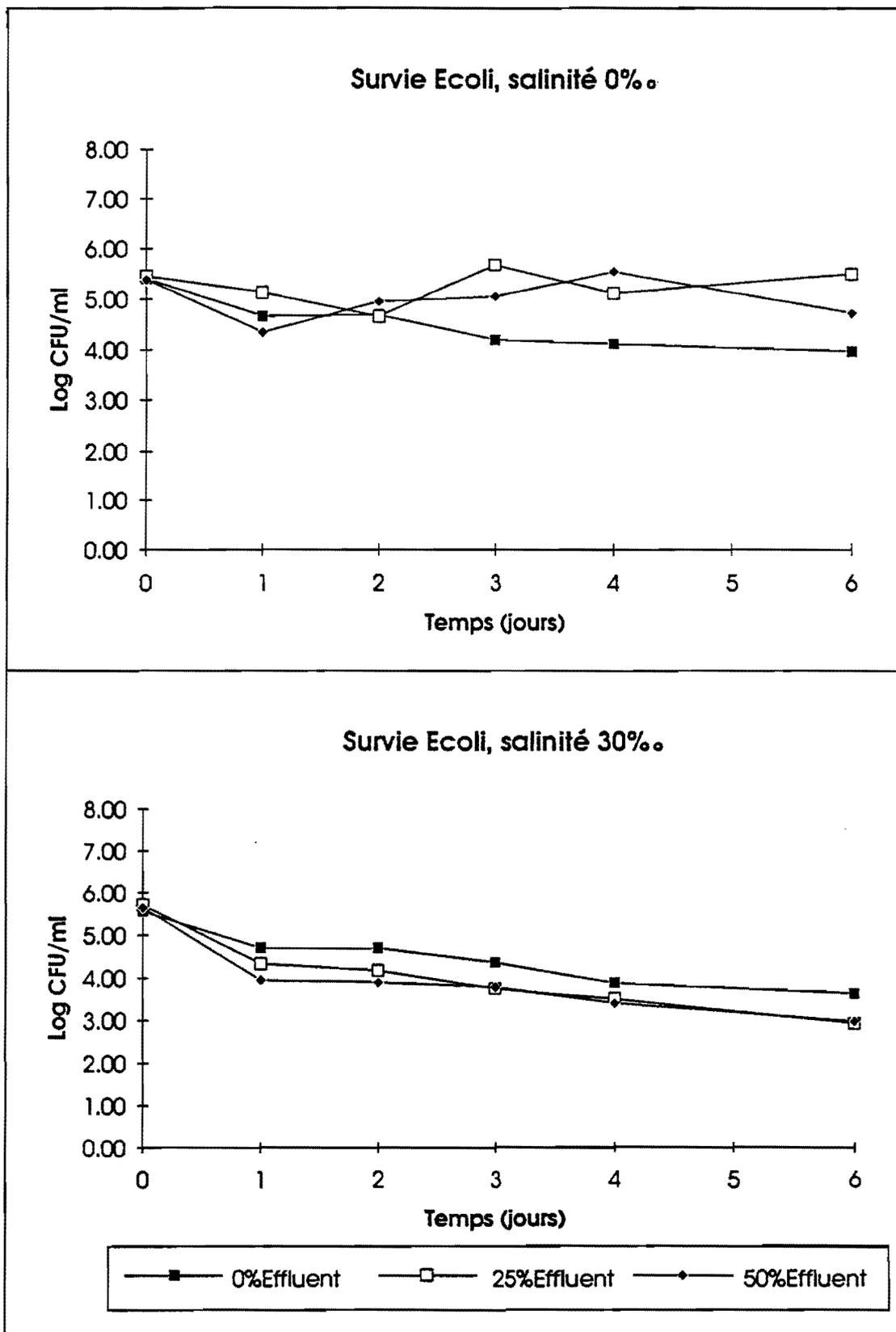


Fig. 1 : Survie de *E. coli* H10407 à 22°C (13-19/04/93).

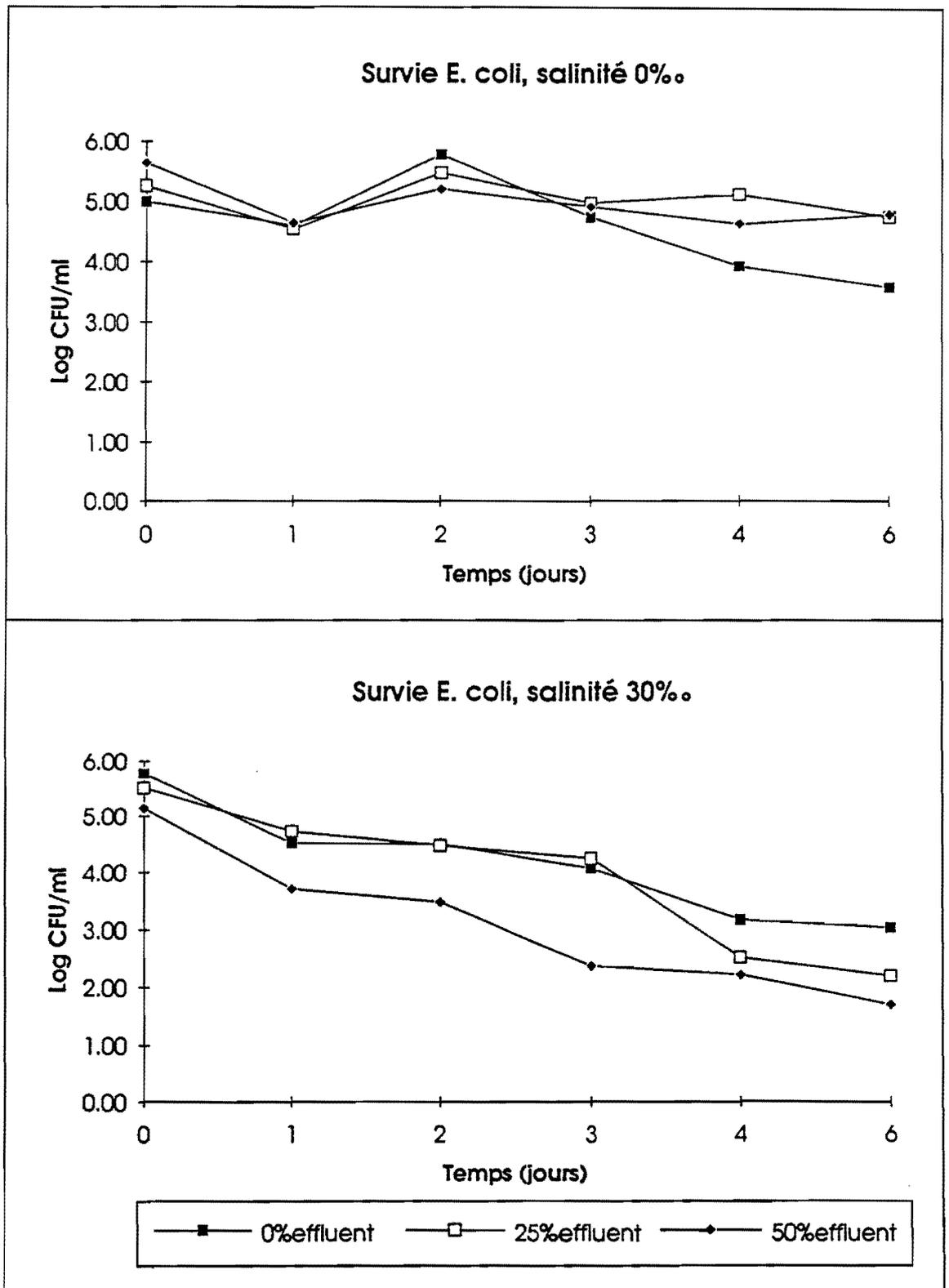


Fig. 2 : Survie de *E. coli* H10407 à 8°C (20-26/04/93).

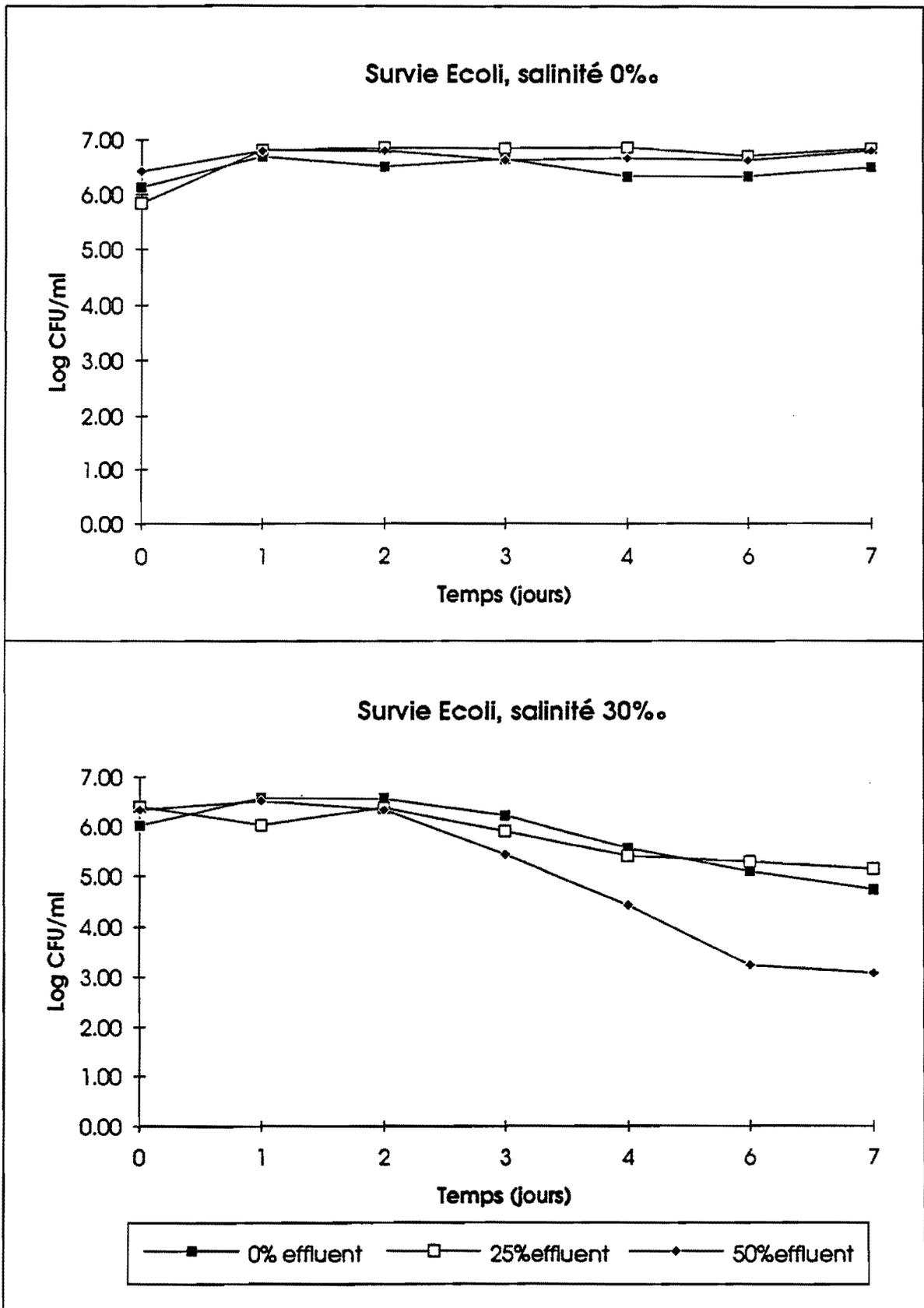


Fig. 3 : Survie de *E. coli* H10407 à 15°C (06-13/04/93).

1.2. Etude de la persistance de l'activité β -D-galactosidase en fonction de la viabilité des bactéries

La souche d'*E. coli* a été soumise à différents traitements afin de tester la persistance de l'activité enzymatique en fonction de l'état physiologique de la bactérie puis la possibilité de reviviscence en mer.

1.2.1. Etude de l'activité enzymatique après traitement

1.2.1.1. Effet du chloramphénicol

La souche a été soumise à 3 concentrations de chloramphénicol ; les résultats sont présentés sur le tableau 2.

Tableau 2 : Effet du chloramphénicol - T0 -

Date de l'expérience	Paramètres mesurés	1	2	3
15/07/1993	Num. (CFU/ml)	$2,50.10^7$	$1,50.10^7$	$2,80.10^6$
	Act/l ($\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	12,59	7,01	2,99
	Act/l ($\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	$5,04.10^{-10}$	$4,67.10^{-10}$	$1,06.10^{-9}$

1 : Témoin

2 : Echantillon avec 100 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol

3 : Echantillon avec 250 $\mu\text{g/ml}$ de chloramphénicol

D'une manière générale on constate que pour des valeurs de chloramphénicol inférieures ou égales à 100 $\mu\text{g/ml}$, aucun effet n'est visible sur le résultat des cultures, il y a cependant une légère diminution de l'activité enzymatique ; une concentration en antibiotique de 250 $\mu\text{g/ml}$ entraîne simultanément une perte de cultivabilité et la baisse de l'activité enzymatique (cette dernière est cependant dans des proportions moindres que la perte de cultivabilité).

1.2.1.2. Effet de la lyse bactérienne

La lyse des bactéries par la technique de congélation-décongélation a permis de diminuer le nombre de bactéries de 2 à 4 unités Log.

Au niveau de l'activité par litre, une chute importante, est observée après la lyse. Selon l'efficacité de la lyse, on observe des diminutions de l'activité par litre juste après la lyse, de 4,22 à $3.10^{-2} \mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ (15/07 - tableau 3)

Tableau 3 : Effet de la lyse par congélation-décongélation - T0 - (15/07/1993)

Echantillon	Témoin	1.1	Témoin	1.2	Témoin	1.6
CFU/ml	$3,70.10^6$	$7,0.10^3$	$1,9.10^6$	$1,4.10^{-4}$	$4,3.10^{-5}$	< 10
Act/l ($\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	13,41	6,24	9,41	10,6	4,22	3.10^{-2}
Act/cell ($\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	$3,6.10^{-9}$	$8,9.10^{-7}$	$4,95.10^{-9}$	$7,57.10^{-7}$	$4,95.10^{-9}$	$3,10.10^{-6}$

Témoin : avant traitement

1.1 : 3 cycles de congélation-décongélation

1.2 : 6 " " " " "

1.6 : 6 " " " " " + lysozyme

1.2.1.3. Effet des traitements des bactéries par le chlore et la température

Sur ces deux types de traitement, la chute de la numération bactérienne est radicale (tab. 4). On passe de l'ordre de 10^6 CFU/ml à moins de 10 bactéries cultivables par ml.

L'activité enzymatique subit aussi une chute importante ; les valeurs de l'activité par litre passent de $9,41 \mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ pour l'échantillon témoin à des valeurs inférieures à 10^{-3} pour les échantillons chlorés et autoclavés.

Ces traitements drastiques ont vraisemblablement un effet direct (mort de la cellule) mais également indirect (hydrolyse des protéines). A T0 après autoclavage, la chute de l'activité pourrait être due à la destruction totale de l'enzyme et de la cellule.

Tableau 4 : Effet de la destruction des bactéries (chlore, autoclavage) - T0

Echantillon	1	1.4	1.5
CFU/ml	$1,9.10^6$	< 10	< 10
Act/l ($\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	9,41	< 10^{-3}	< 10^{-3}
Act/cell ($\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	$4,9.10^{-9}$	-	-

1 : Témoin

1.4 : Echantillon autoclavé

1.5 : Echantillon chloré

1.2.1.4. Conclusion

Ces expérimentations avaient pour but d'étudier la persistance de l'activité enzymatique lorsque les bactéries ne sont plus cultivables.

Lors de traitements drastiques (chlore - température élevée) l'activité enzymatique des bactéries disparaît simultanément avec leur possibilité de cultiver ; la disparition d'activité bactérienne est attribuée à la mort de la bactérie et à la destruction de l'enzyme par le traitement.

Lors de traitements plus "doux" (chloramphénicol, congélation-décongélation) on observe simultanément la perte du pouvoir de cultiver et la baisse de l'activité enzymatique mais cependant pas dans les mêmes proportions : la perte de cultivabilité étant souvent plus importante que la baisse de l'activité enzymatique ; il semble donc que les bactéries viables non cultivables puissent garder quelque temps une activité enzymatique quoique réduite.

1.2.2. Evolution de la souche dans l'eau de mer après traitement

Ces expériences ont été réalisées en eau de mer à 34 ‰ et à 15 °C. Les résultats obtenus sont regroupés sur les figures 4 et 5.

1.2.2.1. Effet du chloramphénicol

Lors de ces expériences, on observe à T0 une diminution du nombre de bactéries de 1 unité Log pour les échantillons à 250 µg/ml de chloramphénicol. Il n'y a pas de différence significative entre le témoin et l'échantillon à 10 µg/ml de chloramphénicol.

La chute des numérations bactériennes dans le temps est plus prononcée pour les échantillons à 100 et 250 µg/ml de chloramphénicol que pour le témoin. Une perte de 1 unité Log est observée en 4 jours pour le témoin, alors qu'elle est d'environ 3 unités Log pour les échantillons à 100 et 250 µg/ml entre les troisième et quatrième jours (fig. 4).

On constate aussi que les valeurs du T90 diminuent en fonction de la concentration en chloramphénicol ; elles passent de 7,8 jours pour le témoin, à 3 jours pour l'échantillon à 250 µg/ml de chloramphénicol.

1.2.2.2. Effet de la lyse bactérienne

La lyse des bactéries par la technique de congélation-décongélation a permis d'abaisser le nombre de bactéries de 4 unités Log pendant les 3 à 4 premiers jours. Au bout d'une semaine environ, un redressement du nombre de bactéries est observé, atteignant une numération voisine de l'échantillon témoin après 17 jours (fig. 5).

Ceci peut s'expliquer par le fait que, la lyse bactérienne n'étant pas totale, les bactéries ayant échappé à cette lyse se reproduisent de nouveau ; la présence de la matière organique des bactéries lysées contribue à ce redressement. Lors de l'examen en épifluorescence, juste après le traitement, on constate en effet, que parmi les bactéries éclatées, il reste quelques bactéries intactes.

Sur un essai de lyse (par congélation-décongélation), une meilleure efficacité a été observée en épifluorescence sur les bactéries immergées dans l'eau douce que sur celles immergées dans l'eau de mer : le nombre de bactéries restées intactes est beaucoup plus faible que dans l'échantillon d'eau de mer.

Ceci peut s'expliquer par le fait que la paroi des bactéries en eau de mer subit des modifications qui rendraient les cellules plus résistantes aux chocs thermiques.

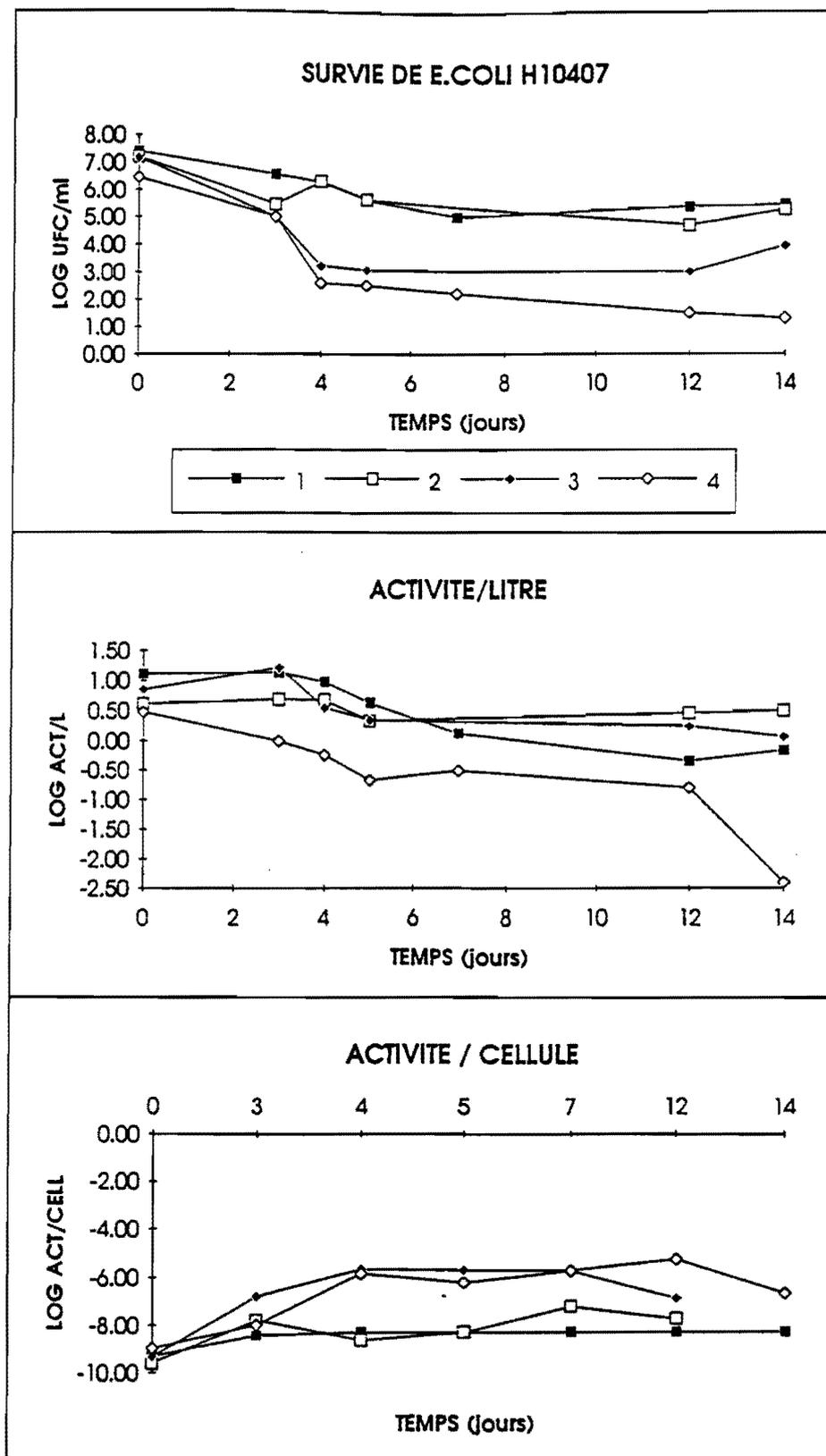


Fig. 4 : Effet du chloramphénicol
 1 : Témoin
 2 : 10 µg/ml de chloramphénicol
 3 : 100 µg/ml de chloramphénicol
 4 : 250 µg/ml de chloramphénicol

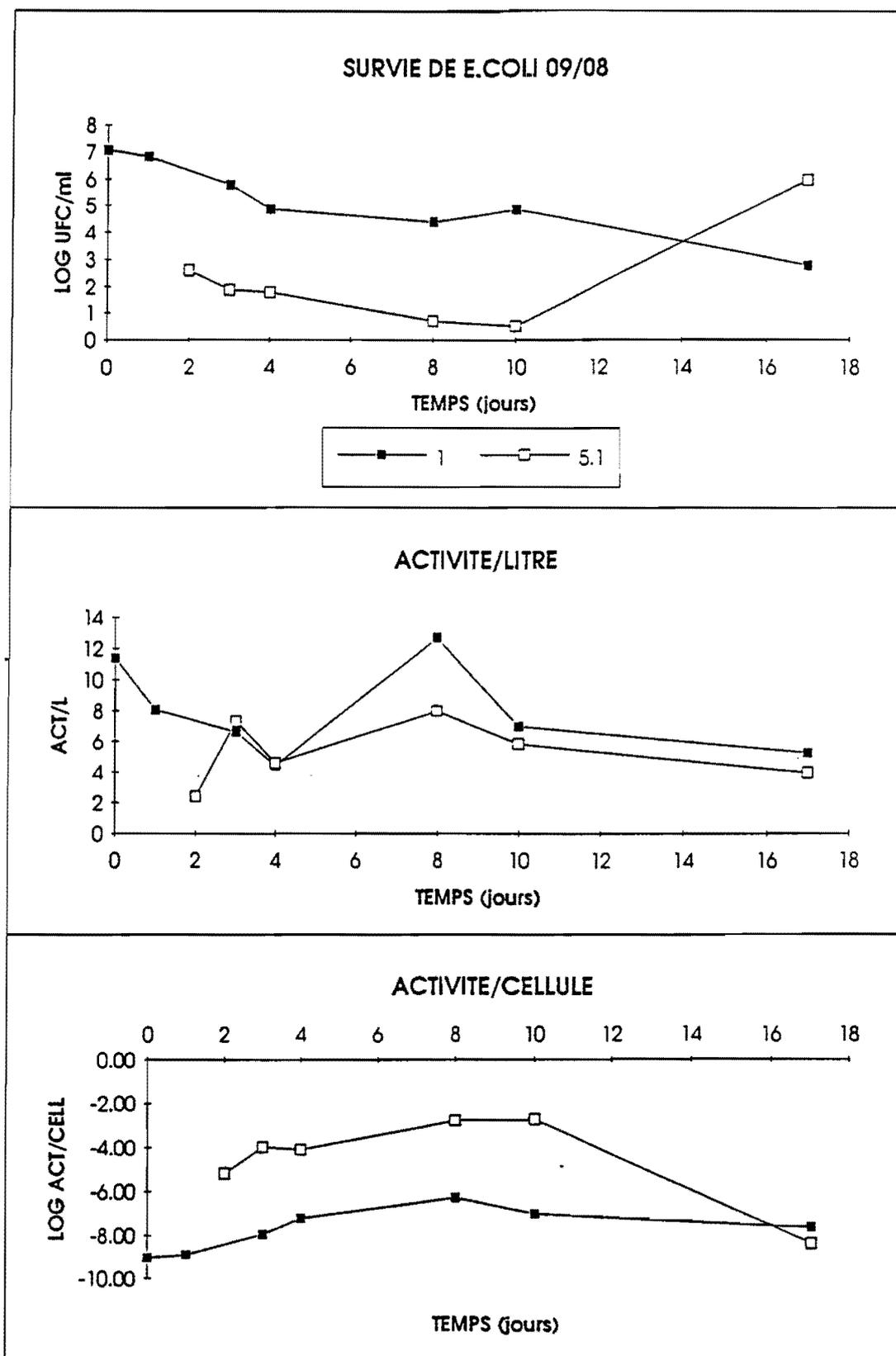


Fig 5 : Etude des bactéries lysées
 1 : Témoin
 5.1 : Echantillon lysé par congélation-décongélation

1.2.2.3. Conclusion

D'une manière générale, le traitement des bactéries entraîne une décroissance bactérienne immédiate et au bout de quelques jours en eau de mer, un maintien ou un redémarrage de la croissance vraisemblablement due à une utilisation de la matière organique (bactéries détruites) par les bactéries qui ont résisté au traitement ; ceci s'accompagne d'un maintien ou d'une augmentation de l'activité enzymatique de la suspension. De tels résultats ont été précédemment trouvés par Shuval *et al.* (1973) après chloration. Singh *et al.* (1986) constatent que cette reviviscence s'accompagne d'un maintien du pouvoir pathogène.

1.3. Etude de l'influence de l'état physiologique d'*E. coli* sur l'activité enzymatique

Lors de cette étude en eau de mer, deux échantillons ont été testés : l'un en phase exponentielle de croissance, l'autre en phase stationnaire. Ce dernier a été dilué aux 2/3 afin de rapprocher la valeur de sa densité optique à celle de l'échantillon en phase exponentielle.

A T₀, le nombre de bactéries dans le premier échantillon est de l'ordre de 10⁷ UFC/ml, le second (en phase stationnaire, dilué) est à 4.10⁶ UFC/ml.

Pendant la première semaine de l'expérience, une variation similaire du nombre de bactéries est observée pour les deux échantillons avec cependant, des valeurs légèrement plus élevées pour l'échantillon en phase stationnaire (environ une unité Log d'écart). Cette variation s'accroît au cours de la deuxième semaine pour atteindre, au bout de 17 jours, un écart d'environ 2,5 unités Log en faveur de l'échantillon en phase stationnaire (fig. 6).

Le T₉₀ est de 8 jours pour cet échantillon, alors qu'il est réduit de moitié (4 jours) pour l'échantillon en phase exponentielle. Les bactéries en phase stationnaire de croissance survivent plus facilement en eau de mer que celles en phase exponentielle. Cette constatation a été faite par Kolter en 1992 lors d'une étude sur la survie des bactéries en phase stationnaire. Ces auteurs notent qu'en ajoutant à une culture de bactéries jeunes, une minorité de bactéries plus vieilles, ces dernières se multiplient alors que les bactéries jeunes n'arrivent pas à survivre et vont jusqu'à disparaître de la culture.

Au cours de notre étude, les valeurs des activités β -galactosidase par litre, bien que très voisines pour les deux échantillons, sont en chaque point légèrement plus élevées dans le cas de l'échantillon en phase stationnaire.

L'activité par cellule n'est pas significativement différente que les cellules soient en phase exponentielle ou en phase stationnaire (fig. 6).

Tableau 5 : Influence de l'état physiologique d'*E. coli* sur l'activité enzymatique

Echantillon	1 T ₀	1 T ₁₇	2 T ₀	2 T ₁₇
CFU/ml	1,2.10 ⁷	2,4.10 ⁵	4,4.10 ⁶	1,1.10 ⁵
Act/l ($\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	11,39	5,24	14,5	6,31
Act/cell. ($\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$)	9,40.10 ⁻¹⁰	2,18.10 ⁻⁸	3,30.10 ⁻⁹	5,73.10 ⁻⁸

1 : Phase exponentielle

2 : Phase stationnaire

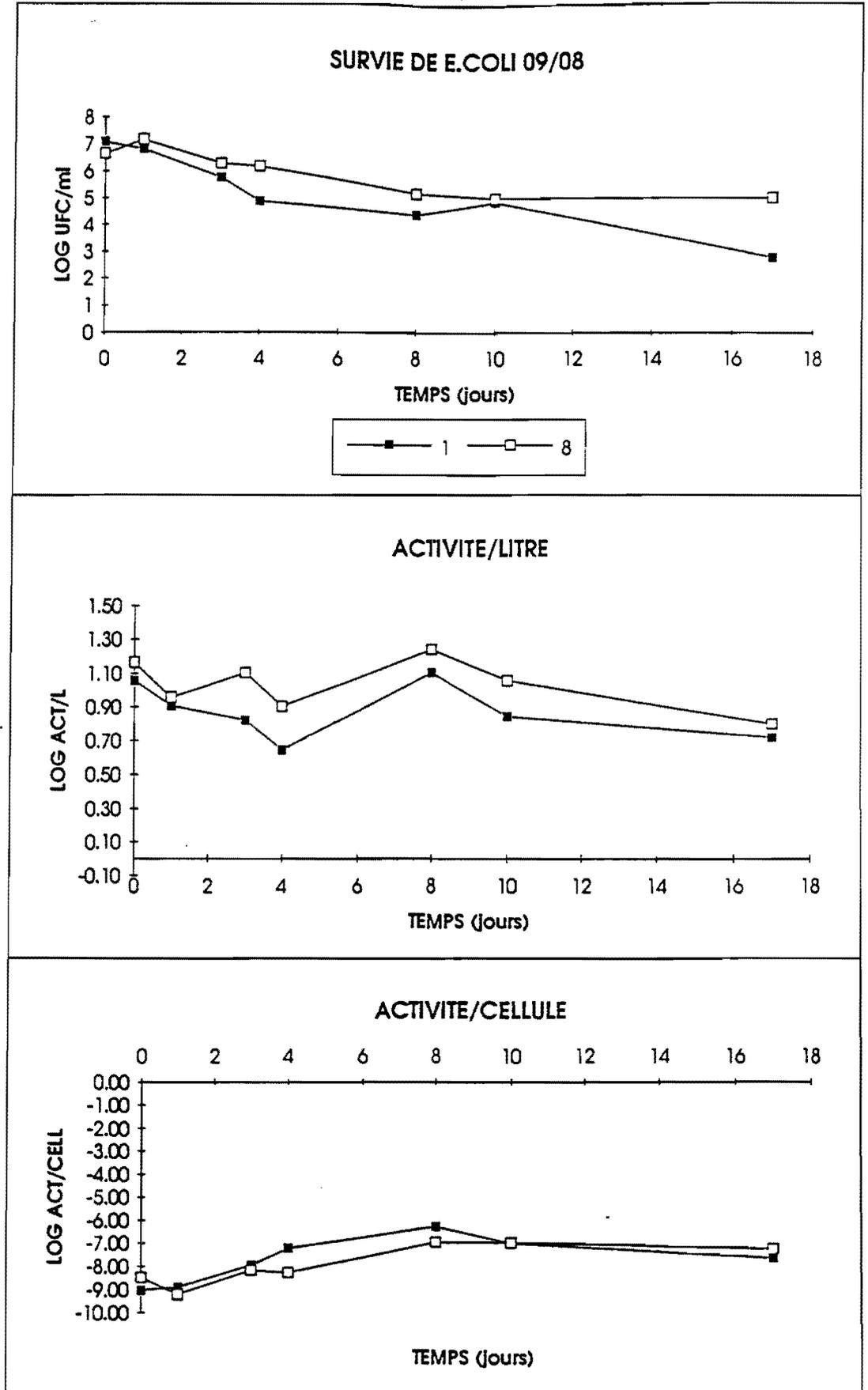


Fig. 6 : Etude de l'état physiologique d'*E. coli* H10407
1 : Echantillon en phase exponentielle
8 : Echantillon en phase statinnaire

2) CAS DES EFFLUENTS EPURES DILUES EN EAU DE MER

* **Au cours de la première expérience (22/07/1993)**, l'effluent prélevé à la sortie de la station de Maison Blanche est dilué au 1/10e en eau de mer. A T0 (fig. 7 et 8), le nombre de bactéries cultivables (lactose + sur gélose de Drigalski) est de 3,5 (Log CFU/ml), une chute d'environ 0,5 unités Log est observée à T1 puis une stabilisation pendant les 5 jours suivants. Une diminution plus importante du nombre de bactéries a lieu au cours de la deuxième semaine et entre les 20e et 34e jours, le nombre de bactéries se maintient entre 1 et 0,5 unités Log. Le T90 déterminé pour cette expérience est de 10,5 jours.

* **Au cours de la deuxième expérience (13/08/1993)** - fig. 9 -, deux effluents (Stations Maison Blanche et Brest) sont analysés à deux dilutions différentes en eau de mer (1/10e et 1/50e).

Sur la courbe de survie des bactéries (13/08), on observe des allures de décroissance similaires entre les différents échantillons. A T0, le nombre de bactéries cultivables est de $3 \cdot 10^2$ CFU/ml pour les dilutions au 1/10e et de $5 \cdot 10^1$ CFU/ml pour les dilutions au 1/50e. Au bout de 10 jours, ces valeurs décroissent aux environs de 15 CFU/ml et de 3 CFU/ml respectivement.

Entre les deux effluents (Maison Blanche et Brest), il n'y a pas de différence significative des charges bactériennes à T0 ($3 \cdot 10^2$ CFU/ml) et la chute bactérienne suit la même allure au cours du temps.

La valeur du T90 varie alors de 10,7 jours à 13 jours selon l'échantillon considéré. Sur l'échantillon de Maison Blanche dilué au 1/10e, on retrouve une valeur de T90 (10,7 jours) du même ordre que celle déterminée au cours de l'expérience précédente (10,5 jours).

Sur les échantillons dilués au 1/50e, la valeur du T90 est un peu plus élevée (12 jours pour Maison Blanche et 13 jours pour la station de Brest).

L'analyse physico-chimique sur les effluents prélevés a été réalisée. L'effluent prélevé à la station de Brest est plus chargé en matières en suspension (17,2 mg/l contre 4,8 mg/l pour l'effluent de Maison Blanche).

Le carbone organique total est de 12,65 mg/l à Brest et 9,20 mg à Maison Blanche, mais les valeurs mesurées pour le carbone organique dissous sont voisines (9,65 mg/l et 8,64 mg/l respectivement).

* **Lors de l'expérience du 30 août 1993** (effluents de Maison Blanche et de Brest dilués au 1/10e et 1/50e), les eaux sont plus chargées. En effet, le nombre de bactéries cultivables à T0 est de $1,3 \cdot 10^4$ CFU/ml à Maison Blanche et de $1,5 \cdot 10^3$ CFU/ml à Brest pour les dilutions au 1/10e. Cette augmentation de la charge peut s'expliquer par des variations journalières.

On constate, au cours de cette expérience, une chute du nombre de bactéries plus rapide par rapport à l'expérience précédente. Les valeurs décroissent d'environ 3 unités Log en 2 semaines pour les différents échantillons.

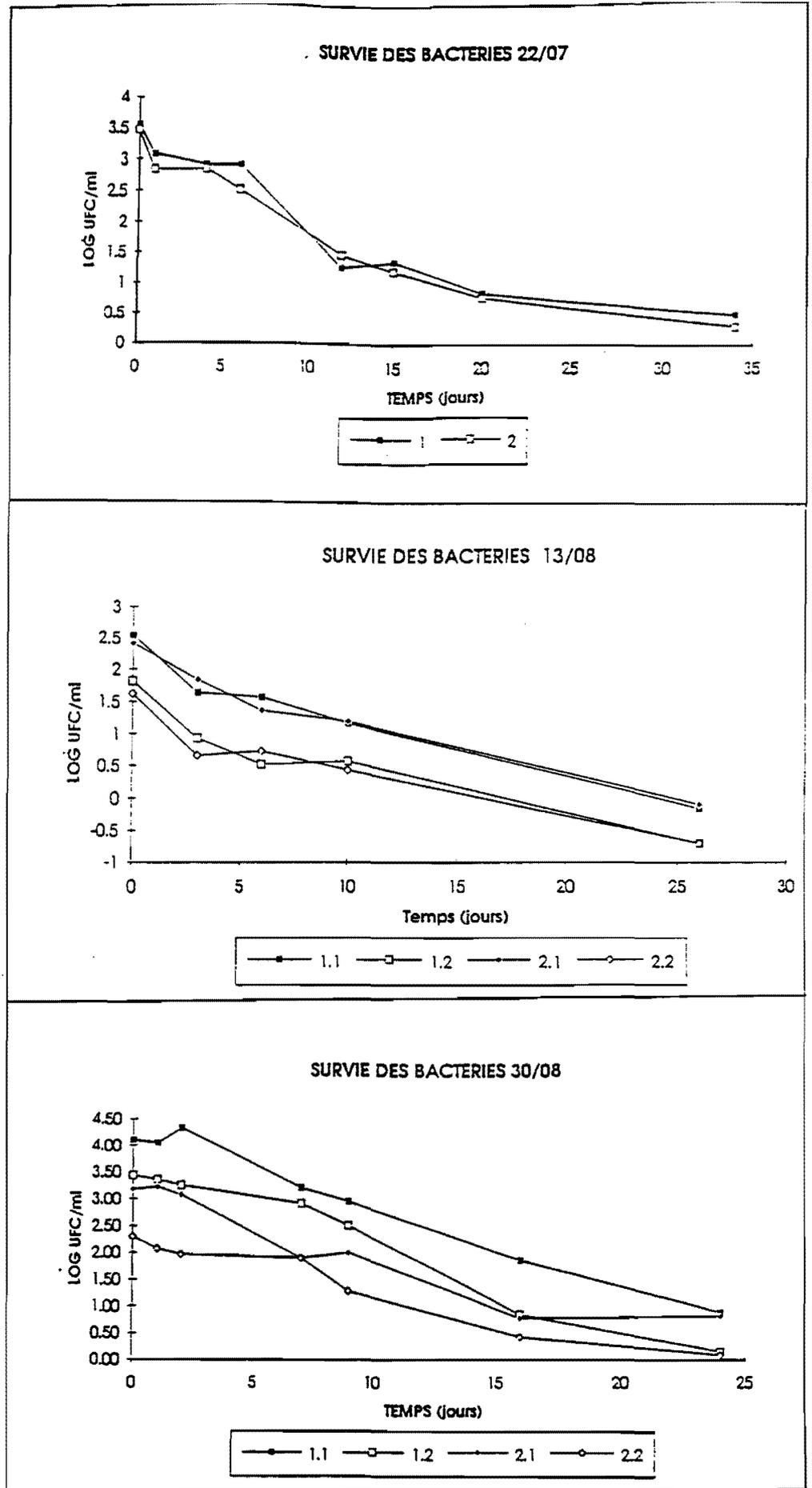


Fig. 7 : Survie des bactéries en eau de mer, 15°C

1, 2 : Effluents de la station de Maison Blanche (réplicats, 22.07) dilués au 1/10
 1.1 : Effluent épuré de la station de Maison Blanche (13.08) dilué au 1/10
 1.2 : " " " " " " " " 1/50
 2.1 : " " " " Brest (30.08) dilué au 1/10
 2.2 : " " " " " " " " 1/50

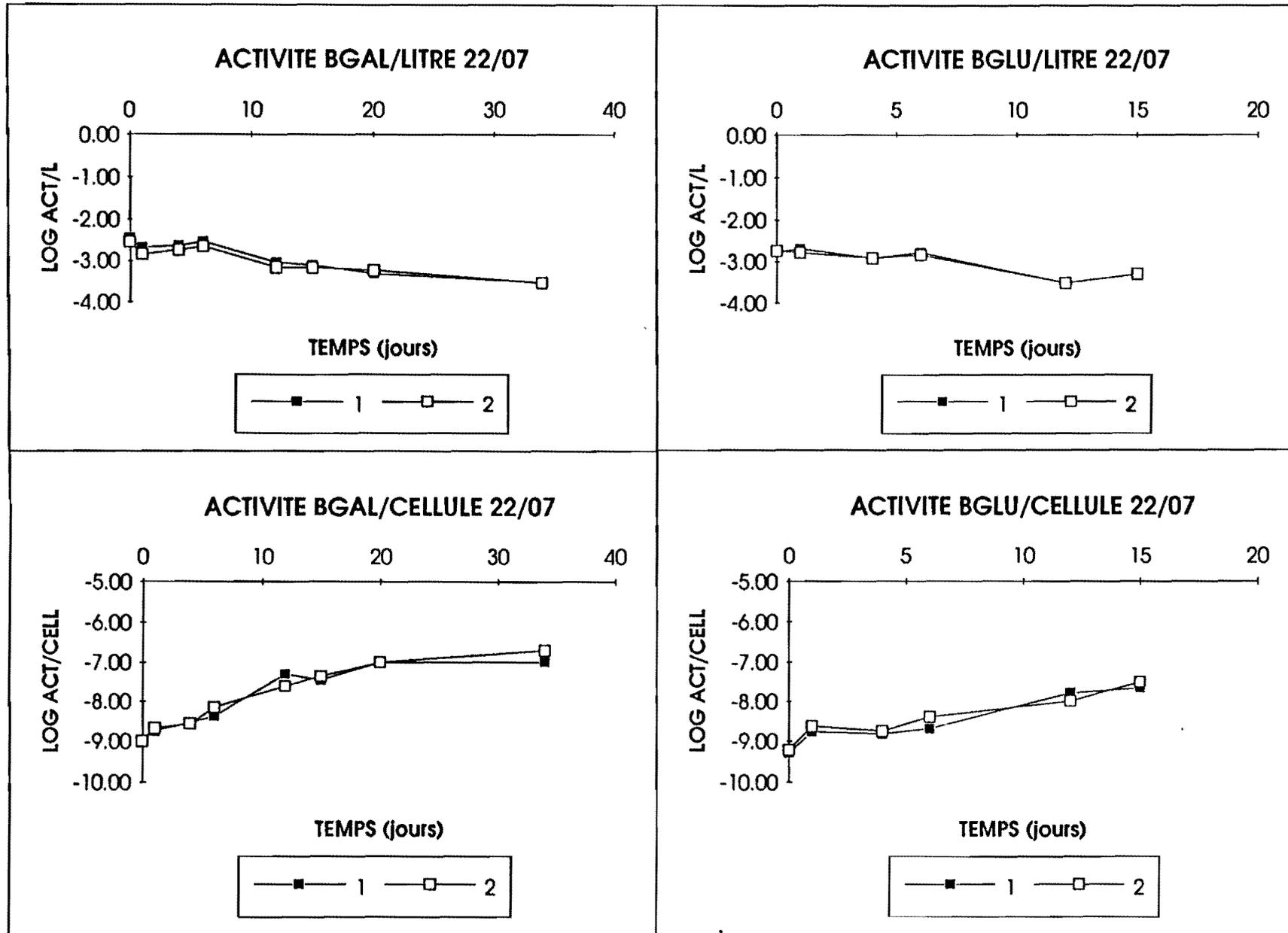


Fig 8 : Activités enzymatiques (β -galactosidase et β -glucuronidase) des effluents du 22/07/93
 1, 2 : Effluents de la station de Maison Blanche (réplicats) dilués au 1/10

EFFLENTS EPURES DILUES (15°C) du 13/08/93

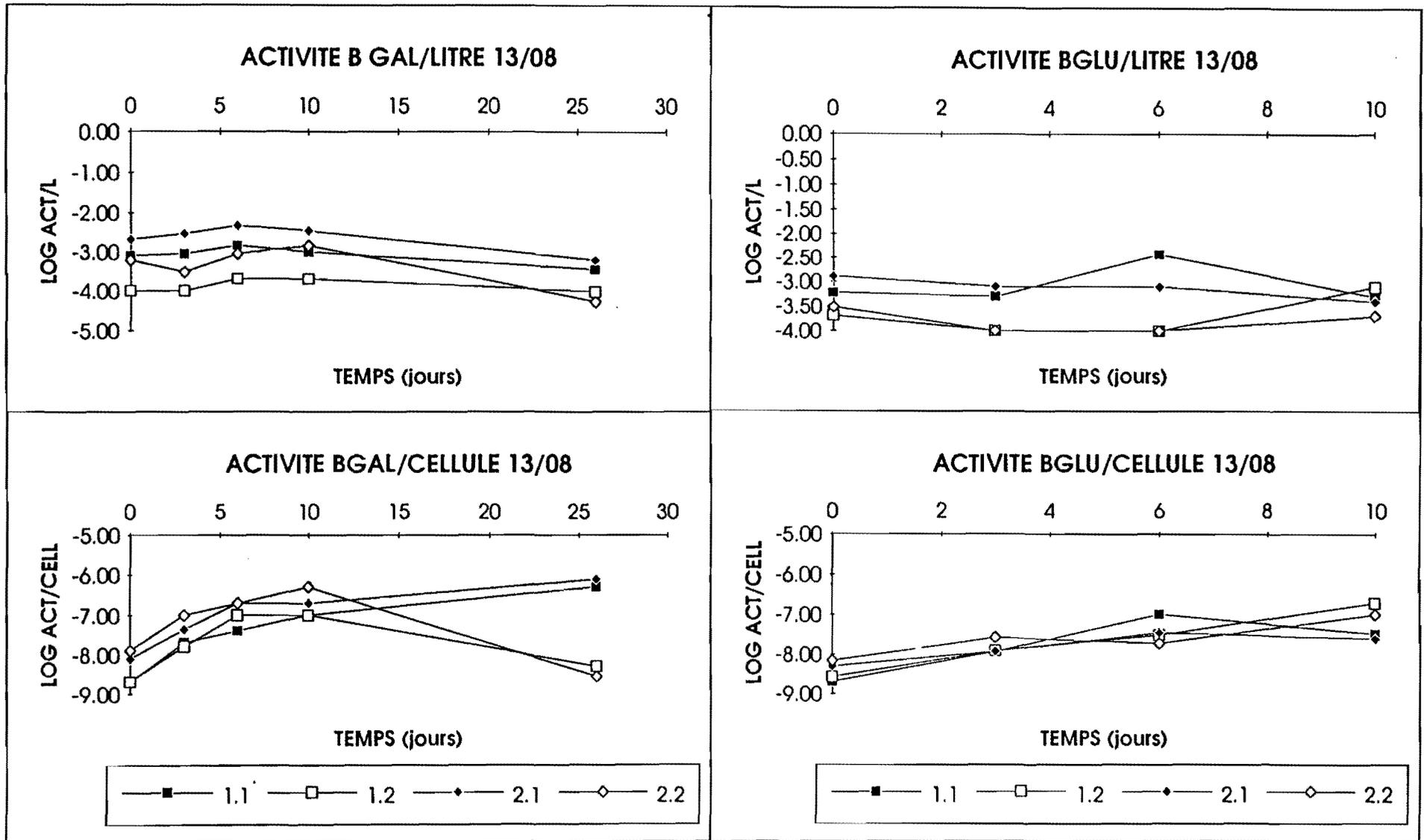


Fig 9 : Activités enzymatiques (β -galactosidase et β -glucuronidase) des effluents du 13/08/93

1.1 : Effluent épuré de la station de Maison Blanche dilué au 1/10

1.2 : " " " " " " 1/50

2.1 : Effluent épuré de la station de Brest dilué au 1/10

2.2 : " " " " " " 1/50

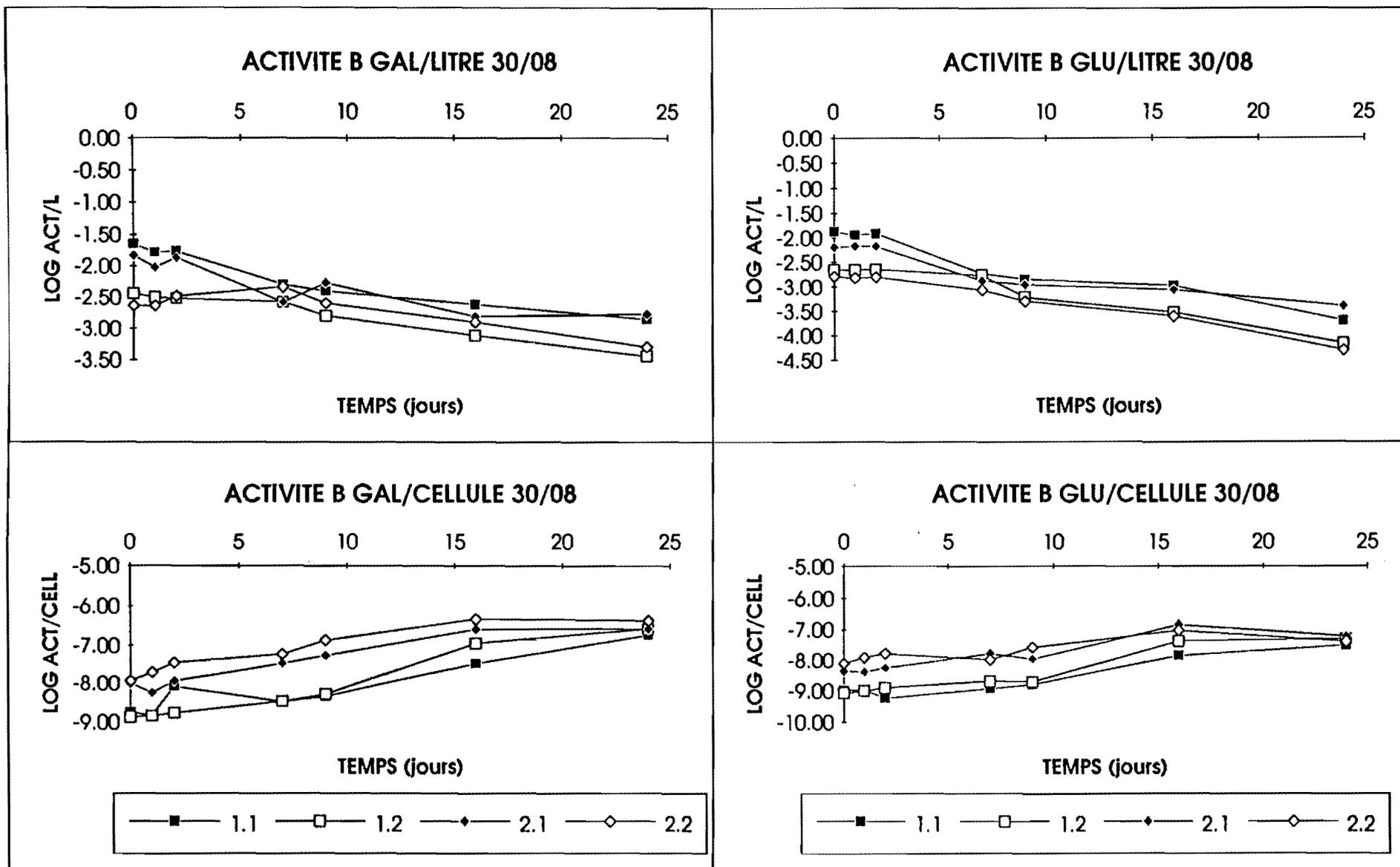


Fig 10 : Activités enzymatiques (β -galactosidase et β -glucuronidase) des effluents du 30/08/93

1.1 : Effluent épuré de la station de Maison Blanche dilué au 1/10

1.2 : " " " " " " 1/50

2.1 : Effluent épuré de la station de Brest dilué au 1/10

2.2 : " " " " " " 1/50

Ces différences de survie observées par rapport aux expériences précédentes peuvent être dues à la variation de la qualité des effluents. En effet, les caractéristiques physico-chimiques ont été mesurées et pour tous les paramètres analysés (MES, matières volatiles à 550 °C, COT, COD, NH₄ et PO₄) les valeurs sont plus élevées que celles des effluents prélevés les 22 juillet et 12 août 1993 (tableau 1).

Les valeurs du T90 de cette dernière expérience sont de l'ordre de 6 jours avec une valeur de COD de 15,5 mg/l, alors que le T90 est de 10-11 jours pour des valeurs de COD voisines de 9 mg/l au cours des deux premières expériences.

Ceci rejoint les résultats obtenus lors de l'étude d'*E. coli* H10407 en présence d'effluents où l'on observe que la quantité de matières organiques présentes dans l'effluent n'est pas toujours un facteur favorisant la survie des bactéries en eau de mer. Il semble que c'est plutôt la nature de ces matières qui serait importante. En effet, des travaux antérieurs sur les phénomènes d'halotolérance ont montré l'importance de la présence de substrats énergétiques et de composés osmoprotecteurs tels que la proline ou la glycine-bétaïne (Csonka, 1981 ; Le Rudulier et Brouillard, 1983). D'autre part, il est indispensable que les bactéries aient l'information génétique nécessaire pour mettre en oeuvre ces mécanismes et pouvoir accumuler, s'ils existent dans le milieu, les composés osmoprotecteurs.

En ce qui concerne les activités β -galactosidase par litre de ces différents effluents dilués en eau de mer (fig. 8, 9, 10), elles sont de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4} $\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$ à T0 au cours des deux premières expériences et légèrement plus élevées (10^{-2} à 10^{-3} $\mu\text{M.l}^{-1}.\text{min}^{-1}$) lors de l'expérience du 30 août.

Les variations de ces activités β -galactosidase par litre dans le temps, bien que corrélées avec les courbes de survie, sont très faibles. Les valeurs des activités β -glucuronidase par litre sont généralement du même ordre de grandeur que les activités β -galactosidase par litre et suivent la même évolution dans le temps.

Les activités enzymatiques par cellules rapportées au nombre de bactéries cultivables (lactose + sur gélose de Drigalski) sont de l'ordre de 10^{-7} à 10^{-9} $\mu\text{M}.\text{min}^{-1}.\text{cell}^{-1}$ en moyenne, ce qui correspond à des valeurs obtenues avec *E. coli* dont l'activité avait été induite par l'IPTG. Il est intéressant de noter que dans le cas d'effluents les bactéries rejetées sont très actives sur le plan de l'activité β -galactosidase et que cette activité se maintient à un niveau élevé pendant toute l'expérimentation ou peut même augmenter de 1 à 2 Log comme lors des expériences des 27 juillet et 30 août 1993.

C - ETUDE DES CORRELATIONS

1. Corrélation entre les activités enzymatiques et les numérations bactériennes

Dans le cadre d'études précédentes des corrélations entre activités enzymatiques et numérations bactériennes avaient été trouvées sur des échantillons naturels de la baie de Morlaix (fig. 11) (Fiksdal *et al.* (1994) ; Pommeputy *et al.* (soumis)). Les corrélations obtenues étaient :

$$\log \beta_{gal} = 0,74 \log CF - 5,44$$

$$\log \beta_{glu} = 0,68 \log CF - 5,31$$

avec

β_{gal} = activité β -galactosidase ($\mu\text{M.l}^{-1}\text{min}^{-1}$)

β_{glu} = activité β -glucuronidase ($\mu\text{M.l}^{-1}\text{min}^{-1}$)

CF : Coliformes fécaux/100 ml

Les coefficients de corrélation pour ces deux équations étant hautement significatifs.

Dans le cadre de cette étude, il nous a paru intéressant d'approfondir ce travail et l'interprétation de ce type de corrélations. Nous avons d'une part associé les données obtenues à T0 afin d'évaluer la relation pouvant exister entre numération et activité enzymatique pour des bactéries non stressées et d'autre part observé l'évolution de ces deux paramètres en fonction du temps d'exposition des bactéries à l'eau de mer (étude du stress).

1.1. Evaluation de l'activité enzymatique des bactéries non stressées à T0

Sur la figure 12 nous avons reporté les résultats obtenus à T0 : *E. coli* induit, *E. coli* non induit et eaux d'effluent diluées dans l'eau de mer synthétique.

Trois familles de points se distribuent ainsi :

- *E. coli* non induit se détache particulièrement du reste des points avec des activités par litre très faibles.

- *E. coli* induit forme une famille de points avec des numérations et des activités β -galactosidase très élevées.

- Les eaux d'effluent se situent dans le prolongement d'*E. coli* induit avec des numérations bactériennes et des activités plus faibles. Les points inférieurs sont caractérisés par des valeurs de l'ordre de 10^2 UFC/ml pour une activité β -galactosidase par litre d'environ 10^{-4} $\mu\text{M.min}^{-1}$.

L'étude des corrélations de l'ensemble des points alignés à T0 (*E. coli* induit et eaux d'effluent) donne la relation suivante (fig. 13) :

$$\log \beta_{gal} = 0,82 \log CF - 4,90$$

avec $n = 41$ et $r = 0,97$

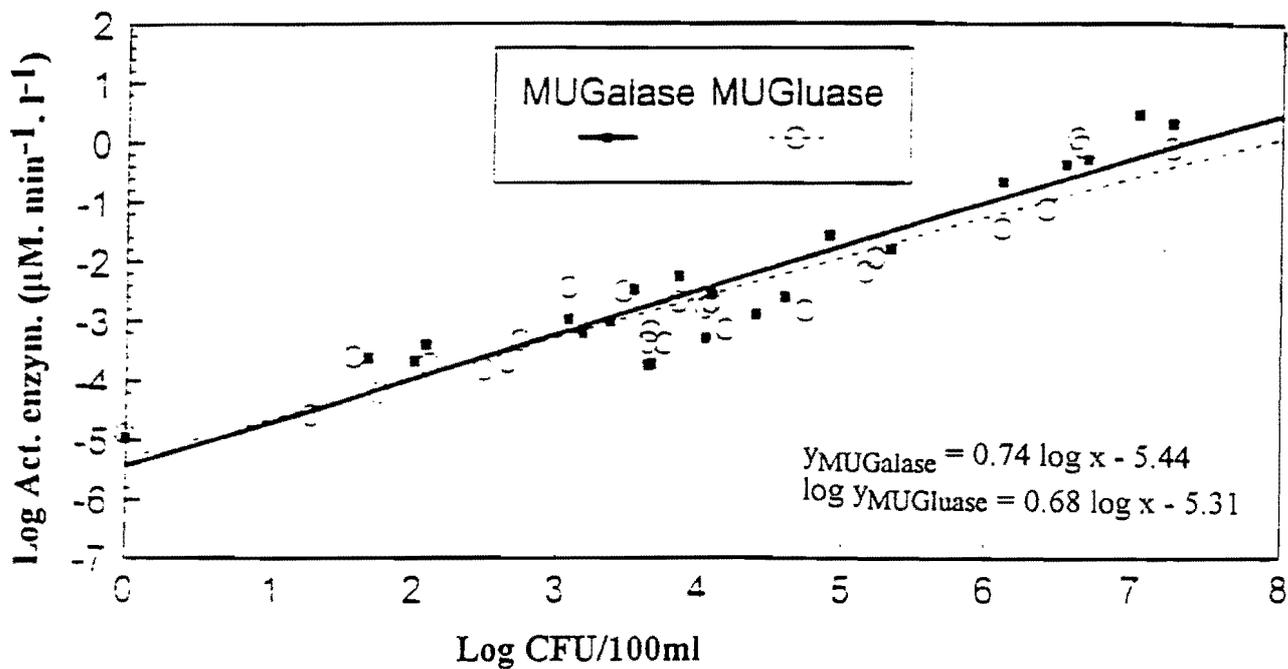


Fig. 11 : Relation entre le nombre de coliformes fécaux et l'activité enzymatique (β -galactosidase et β -glucuronidase). Estuaire de Morlaix (27 avril 1992, 4 mai 1992).

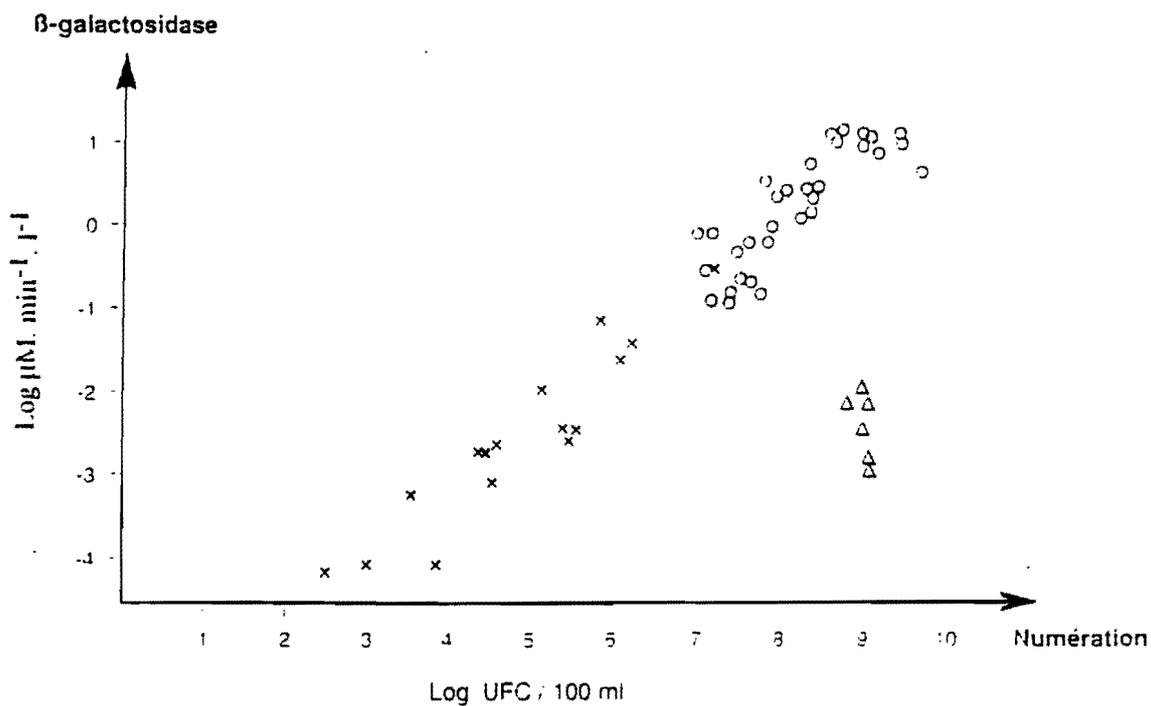


Fig. 12 : Activité β -galactosidase à T0.

- x : Eaux de stations d'épuration diluées en eau de mer
- o : *E. coli* induit (IPTG)
- Δ : *E. coli* non induit

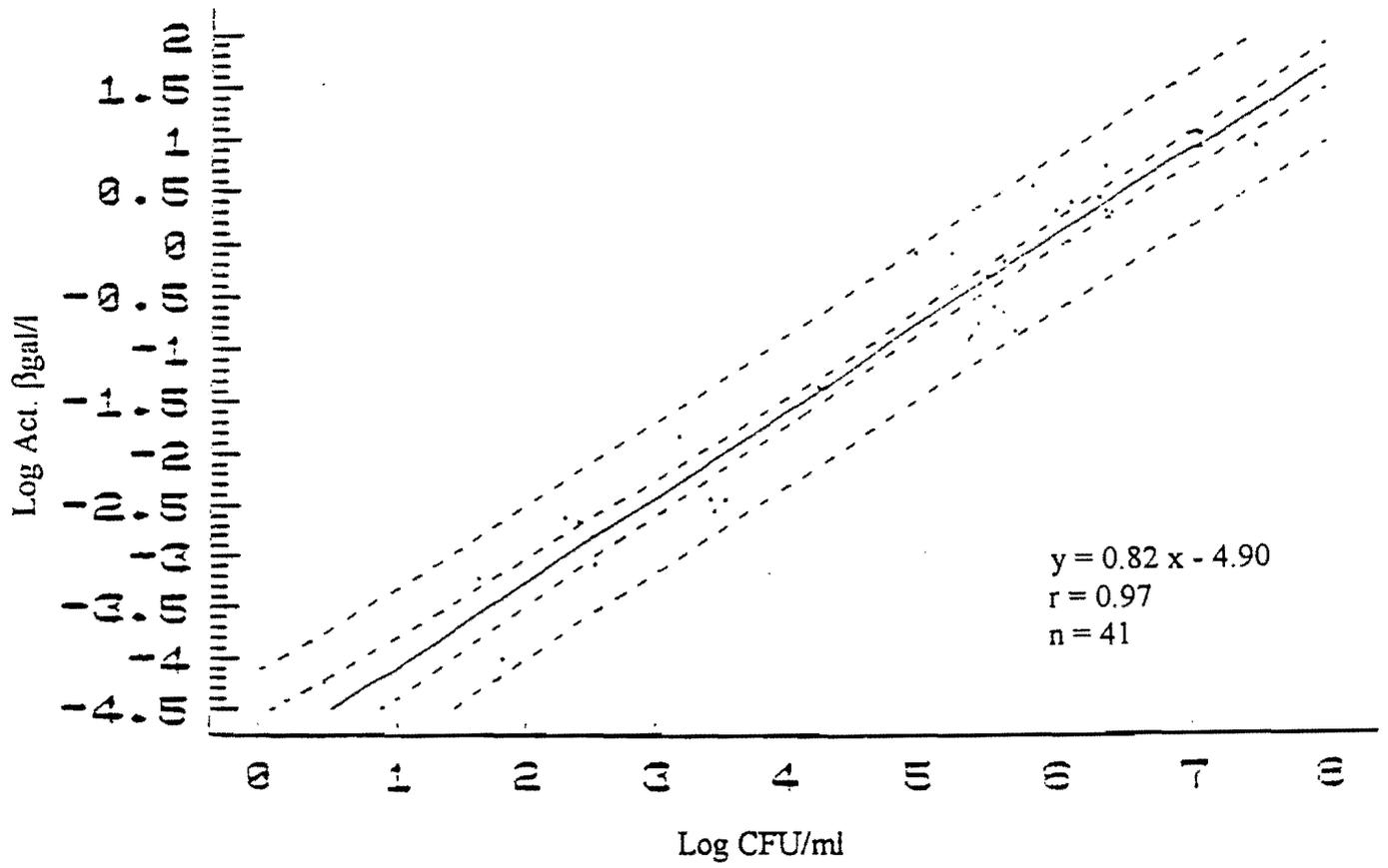


Fig. 13 : Corrélation Log Act β gal - Log CFU/ml.

L'activité moyenne par cellule est dans ce cas de $1,20 \cdot 10^{-8} \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. La pente de la relation précédente égale à 0,82 ($\sigma = 0,032$) et non à 1, fait que l'on ne peut considérer que l'activité par cellule soit constante quelque soit le nombre de cellules même en intégrant l'erreur liée à l'imprécision des mesures ($\approx 0,5 \log$ pour les deux types d'analyses) confirme ce résultat. Le traitement des deux groupes de points (*E. coli* induit - eaux d'effluent) donne une pente inférieure à 1.

Lors des faibles numérations, l'activité par cellule apparaît systématiquement légèrement plus élevée que dans les fortes concentrations bactériennes ; plusieurs explications peuvent être avancées : un déficit en inducteur par forte charge bactérienne, une meilleure expression de l'activité lorsqu'il y a peu de cellules (problème des floccs), une saturation du spectrofluorimètre lors d'analyse avec des échantillons trop chargés (ou une analyse bactériologique plus précise pour des concentrations faibles).

Une autre conclusion importante est que l'activité enzymatique des eaux d'effluent est très élevée ; on a donc en milieu naturel de fortes inductions des bactéries puisqu'elles se situent dans la gamme des résultats obtenus avec un *E. coli* induit.

A Morlaix, l'activité par cellule pour des eaux d'effluent ou des eaux situées en amont de l'estuaire (très contaminées par le rejet de brut du by-pass) - fig. 11 - points situés en haut à droite du graphique - variaient entre 3 à $5 \cdot 10^{-8} \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Pour *E. coli* non induit, l'activité est de l'ordre de 10^{-11} voire $10^{-12} \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$. Les bactéries des eaux d'effluent présentent donc des activités enzymatiques importantes traduisant ainsi un métabolisme actif.

1.2. Evolution de l'activité enzymatique en fonction du temps de séjour de la bactérie en eau de mer

Dans nos expérimentations nous avons suivi l'évolution des activités et des numérations après un séjour en eau de mer (plusieurs jours).

La figure 14 reporte les résultats obtenus en numération et activité enzymatique par litre en fonction du temps. On observe d'une manière générale, que ce soit pour la souche d'*E. coli* ou pour les eaux usées, une décroissance plus rapide de la numération bactérienne (nombre d'unité formant colonie), que de l'activité enzymatique (les points au cours de l'expérience se déplaçant de la droite vers la gauche ; en d'autres termes, si l'on reporte l'activité par litre au nombre de cellules qui cultivent on obtient des activités cellulaires qui augmentent avec le temps.

L'interprétation des activités cellulaires très élevées donne lieu à plusieurs hypothèses :

- les bactéries immergées dans l'eau de mer subissent une induction qui augmente l'activité β -galactosidase ou β -glucuronidase. Martin *et al.* (1989) et Kjelleberg *et al.* (1987) ont montré une augmentation de certaines activités enzymatiques lors de stress qu'ils interprètent comme une réponse aux changements environnementaux. De même, Fiksdal *et al.* (1989) observent également l'augmentation de l'activité hydrolase chez les bactéries en état de stress. Il est cependant peu vraisemblable que, sans inducteur (*E. coli* est immergé dans de l'eau de mer synthétique) l'activité β -galactosidase puisse être augmentée à des niveaux aussi élevés ($1,6 \cdot 10^{-6} \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$), d'autant plus qu'entre un *E. coli* non induit et un *E. coli* induit, l'activité passe de 10^{-11} - $10^{-12} \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ à $10^{-8} \mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ seulement, et ceci pour des

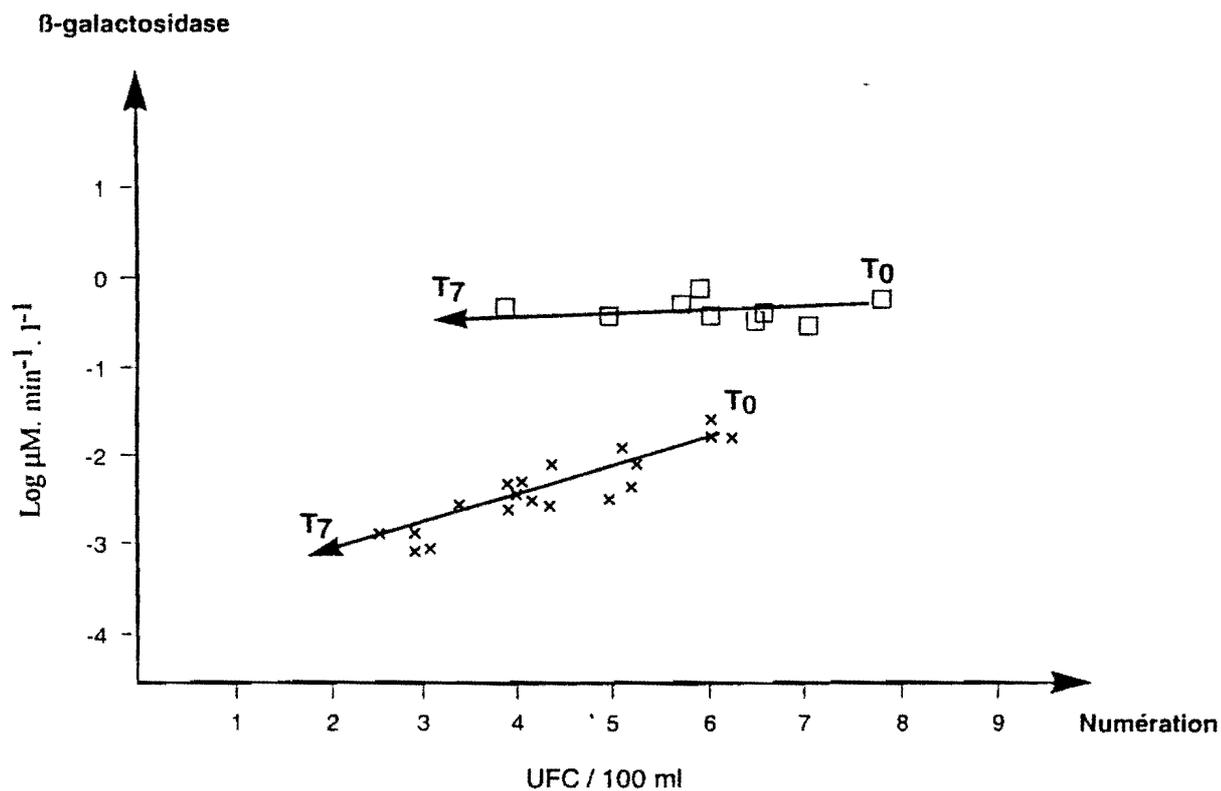


Fig. 14 : Evolution en eau de mer de l'activité enzymatique et du nombre de bactéries en fonction du temps.

□ : *E. coli* induit

× : Eaux de stations d'épuration

T0 : Temps initial de séjour en eau de mer

T7 : Fin de l'expérience (7 jours en eau de mer)

bactéries en bon état physiologique (fin de phase exponentielle de croissance en milieu nutritif et présence d'inducteur).

- La deuxième hypothèse est qu'il existe un maintien de l'activité enzymatique dans la cellule qui ne cultive plus, soit par non dégradation intracellulaire de l'enzyme, soit par maintien de la production enzymatique chez ces bactéries viables non cultivables.

En ce qui concerne la persistance de l'enzyme après la mort de la cellule, Lewin B. (1988), indique qu'en milieu carencé, sans inducteur, on observe une dégradation très rapide des protéines et des ARN messagers. Nos expériences avec le chloramphénicol et celles de congélation-décongélation tendent à montrer qu'un blocage de l'induction ou la lyse bactérienne s'accompagne d'une diminution, parfois limitée (chloramphénicol), de l'activité enzymatique. En tout état de cause, il semble peu vraisemblable que l'enzyme -qui est une protéine - puisse subsister et rester active pendant 4 à 7 jours en milieu carencé après la mort de la cellule. L'activité β -galactosidase détectée serait plus vraisemblablement attribuée aux cellules viables et non cultivables qui persistent dans le milieu.

2. *Corrélation entre les activités β -galactosidase et β -glucuronidase*

Sur les expériences réalisées les 27 juillet, 13 et 30 août 1993, nous avons étudié simultanément ces deux activités sur des eaux d'effluent diluées dans de l'eau de mer artificielle.

Les résultats sont reportés sur la figure 15, la corrélation trouvée est :

$$\log \beta \text{ glu} = 0,85 \log \beta \text{ gal} - 0,70$$

avec $r = 0.84$ et $n = 52$

Ce résultat est un peu différent de celui trouvé précédemment dans l'estuaire de Morlaix où nous avons (Fig. 16) :

$$\log \beta \text{ glu} = 0,96 \log \beta \text{ gal} - 0,278$$

avec $r = 0.97$ et $n = 32$

On sait que l'activité β -glucuronidase est plus spécifique d'*E. coli* que l'activité β -galactosidase qui elle, reflète l'activité des coliformes fécaux. Selon les sites et les prélèvements, il est vraisemblable que le rapport des deux flores puisse changer, ce qui expliquerait le changement des variables de cette corrélation.

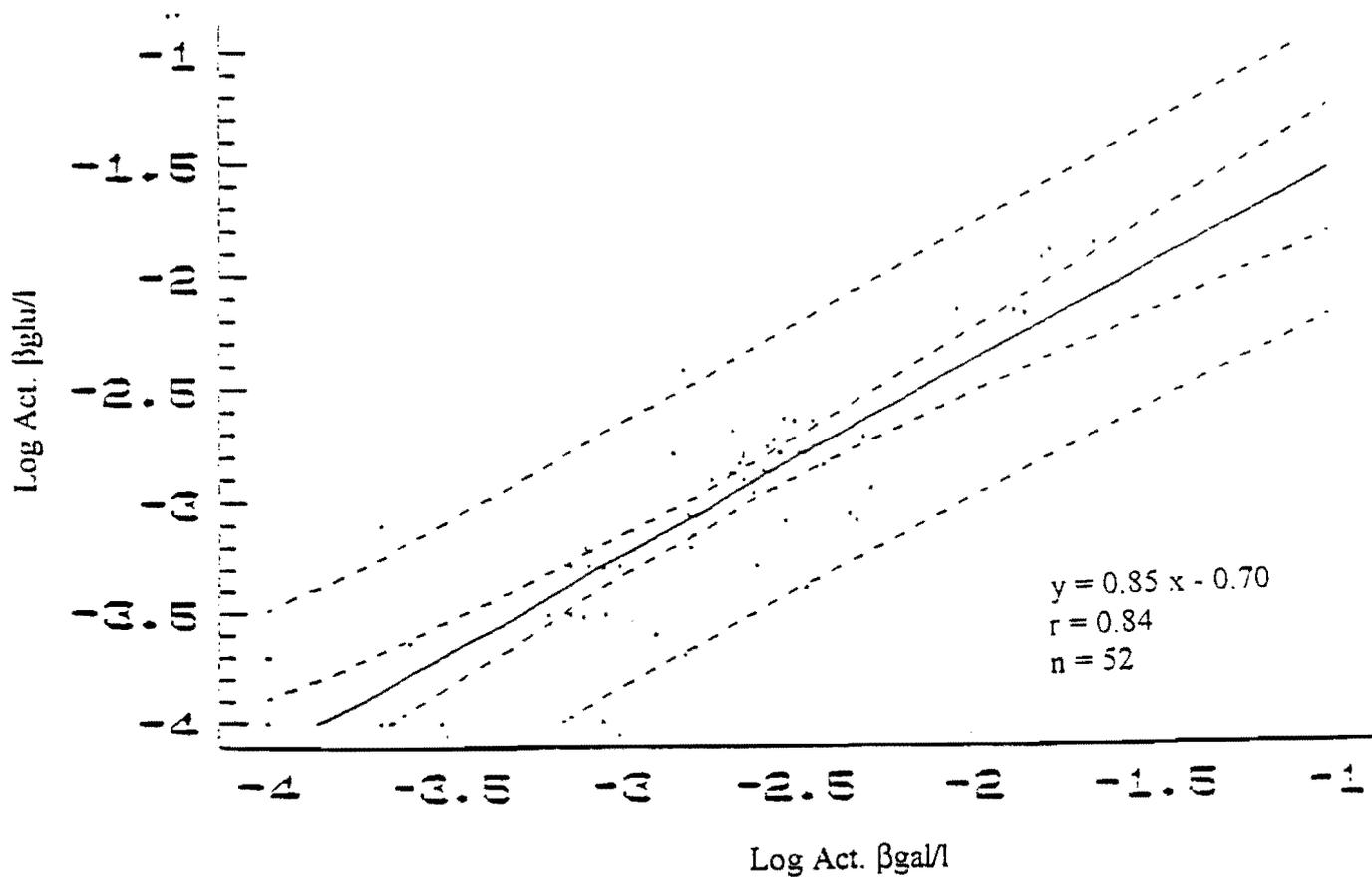


Fig. 15 : Corrélation Log Act β glu - Log Act β gal.

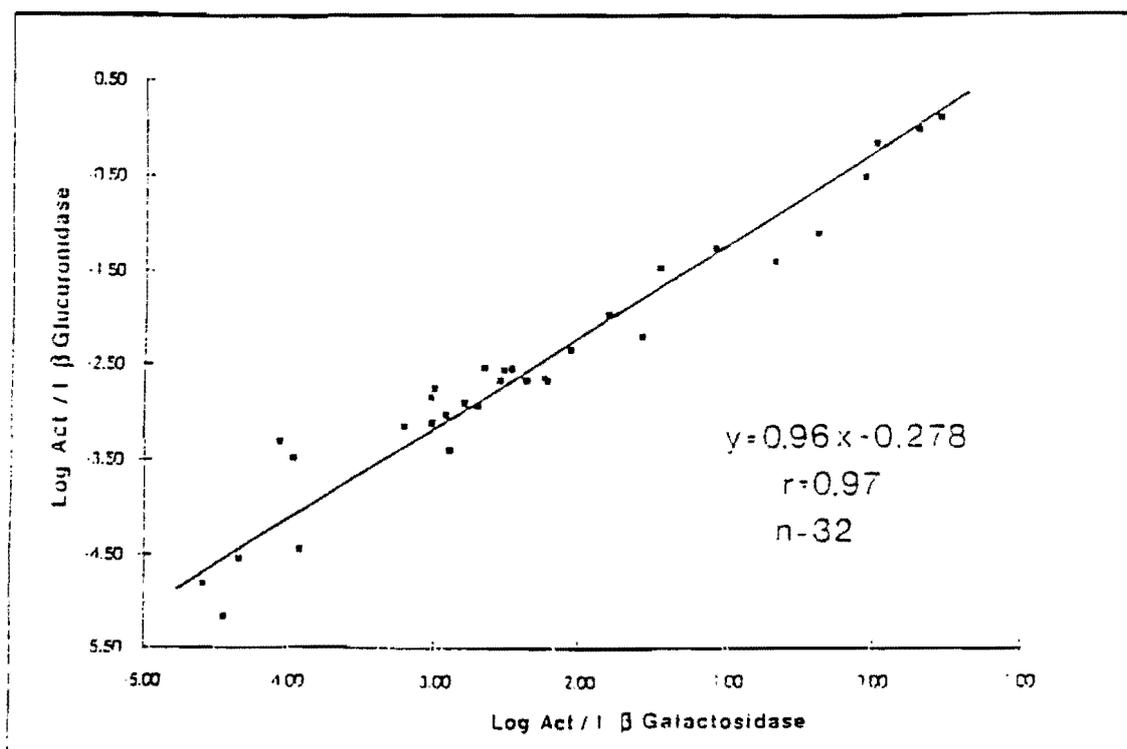


Fig. 16 : Corrélation entre les activités β -galactosidase et β -glucuronidase.
Estuaire de Morlaix (mars, avril 1992 et janvier 1993).

CONCLUSION

La qualité microbiologique des eaux côtières est réglementée par des normes qui régissent le nombre de coliformes thermotolérants à ne pas dépasser pour protéger certains usages (baignade, conchyliculture). Le contrôle des eaux est réalisé par des techniques classiques de numérations bactériennes obtenues par culture sur membrane ou en milieu liquide et donnant des réponses en 24 voire 48 heures ; de nouvelles techniques, basées sur des activités enzymatiques spécifiques d'espèces bactériennes, ont récemment été proposées pour détecter *E. coli* ou les coliformes thermotolérants. Plusieurs auteurs préconisent l'emploi de substrats fluorescents permettant de mettre en évidence l'activité β -galactosidase ou β -glucuronidase (Berg et Fiksdal, 1988 ; Mates et Shaffer, 1988 ; Palmer *et al.*, 1993).

L'utilisation de l'activité β -glucuronidase est cependant reconnue pour être plus efficace pour détecter *E. coli* et est recommandée par Augoustinos *et al.* (1993) pour améliorer cette détection dans les eaux naturelles.

Dans cette étude, nous avons tenté d'appréhender les possibilités et les limites de cette technique analytique à partir d'expérimentations réalisées d'une part sur des eaux usées (diluées dans de l'eau de mer) et d'autre part sur une souche d'*E. coli* stressée ou non ; l'intérêt de ces dernières expériences était d'étudier la variabilité de la réponse enzymatique en fonction du temps.

Il semble plus vraisemblable que le maintien de l'activité β -galactosidase puisse être attribué aux cellules qui restent viables et ne cultivent plus. Rosack et Colwell (1987) ont montré que lorsque les bactéries sont stressées, elles passent par différents états où elles gardent une activité physiologique alors qu'elles ont perdu le pouvoir de cultiver. Depuis, de nombreux auteurs ont publié sur l'état viable non cultivable et ont montré que pendant cette période qui précède la mort bactérienne, différents réajustements physiologiques avaient lieu afin de permettre à la bactérie de survivre, en particulier de nombreuses protéines de stress sont sécrétées par activation de gènes (Kolter, 1992 ; Hood *et al.*, 1986 ; Reeve *et al.* 1984).

En conclusion, en ce qui concerne l'aspect surveillance sanitaire des eaux côtières dans lesquelles se rejettent des eaux usées, si l'hypothèse que nous avons développée s'avère confirmée (maintien de l'activité enzymatique chez les bactéries viables non cultivables), l'analyse par la MUG de l'activité enzymatique est intéressante. En effet, par cette technique il serait possible de suivre une contamination fécale rémanente de manière plus fiable, puisqu'elle prendrait en compte les bactéries stressées. Par ailleurs, Munro *et al.* (1989) montre que l'activité β -galactosidase disparaît au bout de 14 jours de stress environ.

Quoiqu'il en soit, il existe une excellente corrélation entre les deux activités ; le choix de l'une ou l'autre analyse peut se faire à partir de critères tels qu'une meilleure sélectivité (β -glucuronidase - *E. coli*). Cependant le fait que la mesure de la β -galactosidase soit plus sensible (meilleure réponse pour des contaminations faibles), peut jouer en faveur du choix de cette dernière.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AUGOUSTINOS M.T., GRABOW N.A., GENTHE B., KFIR R., 1993.
An improved membrane filtration method for enumeration of faecal coliforms and *E. coli* by a fluorogenic β -glucuronidase assay. *Wat. Sci. Tech.*, 27 (3-4), 267-270.
- APTE S.C., BATLEY G.E., 1992. Rapid detection of sewage contamination in marine waters using a fluorometric assay of β -D-galactosidase activity. *The Science of the Total Environment*, 141, 175-180.
- BERG J., FIKSDAL L., 1988. Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-méthylumbelliféron- β -D-galactoside. *Appl. Env. Microbiol.*, 54, 2118-2122.
- CSONKA L.N., 1981. Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*, *Mol. Gen. Gene.*, 182, 82-86.
- DIEHL J.D., 1991. Improved method for coliform verification. *Appl. Env. Microbiol.*, 57, 604-605.
- FENG P.C.S., HARTMAN P.A., 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *E. coli*, *Appl. Env. Microbiol.* 43, 1320-1329.
- FIKSDAL L., MIDTTUN I., 1993. Enzymatic activity of enterobacteria in relation to rapid detection and survival in sea water. Progress report for IFREMER Centre de Brest.
- FIKSDAL L., POMMEPUY M., DERRIEN A., CORMIER M., 1989. Production of 4-methylumbelliferyl heptanoate hydrolase by *E. coli* exposed to seawater. *Appl. Env. Microbiol.*, 55, 2424-2427.
- FIKSDAL L., POMMEPUY M., CAPRAIS M.P., MIDTTUN I., 1994.
Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Appl. Env. Microbiol.*, 60, 5, 1581-1584.
- FRAMPTON E.W., RESTAINO L., 1993. Methods for *E. coli* identification in food, water and clinical samples based on β -glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.*, 74, 223-233.
- FREIDELDER D., 1990. La régulation de l'activité des gènes chez les procaryotes. In : *Biologie Moléculaire*, 263-280.
- GUTHRIE R.K., SCOVILL M.A., 1984. Recovery of *E. coli* and *Vibrio cholerae* from aquatic microcosms. *Wat. Res.*, 18, 1055-1057.
- HOOD M.A., GUCKERT J.B., WHITE D.C. and DECK F., 1986. Effect of nutrient deprivation on lipid, carbohydrate, DNA, RNA and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 788-793.

- KJELLEBERG S., HERMANSSON M., MARDEN P. and JONES G., 1987. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annu. Rev. Microbiol.* 41 : 25-49.
- KOLTER R., 1992. Life and death in stationary phase, *ASM News*, Vol. 56, n° 2, pp. 75-79.
- LE RUDULIER D., BROUILLARD L., 1983. Glycine-betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Env. Microbiol.*, 46, 152-159.
- LEWIN B., 1988. Genes (traduction A. Kahn). Chapitre 10. Une panoplie d'operons : le modèle operon lactose et d'autres exemples. Ed. Med. Sciences. Flammarion, pp. 219-247.
- MATES A., SCHAFFER M., 1988.
Quantitative determination of *E. coli* from faecal coliforms in seawater. *Microbios*, 53, 161-165.
- MARTINS M.T., RIVERA I.G., CLARK D.L., STEWART M.H., WOLFE R.L., OLSON B.H., 1993. Distribution of mid A gene sequences in *E. coli* isolates in water sources and comparison with the expression of β -D-glucuronidase activity in 4-méthylumbelliferyl- β -D-glucuronide media, *Appl. Env. Microbiol.*, 59, 2271-2276.
- MATIN A., AUGER E.A., BLUM P.H. and SCHULTZ J.E., 1989. Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 43 : 293-316.
- MUNRO P.M., 1988. Modifications somatiques et adaptation d'*E. coli* en milieu marin. Thèse de Doctorat de l'Université d'Aix-Marseille II.
- MUNRO P.M., GAUTHIER M.J., BREITMAYER V.A., BONGIOVANNI J., 1989. Influence of osmoregulation processes on starvation of *E. coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55 (8), 2017-2024.
- PALMER C.J., TSAI Y.L., LEE LANG A., SANGER MANO L.R., 1993.
Evaluation of coliber-marine water for detection of total coliforms and *E. coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 786-790.
- POMMEPUY M., FIKSDAL L., CAPRAIS M.P., CORMIER M., 1993. Evaluation of bacterial contamination in an estuary using rapid enzymatics techniques. Soumis pour Congrès Budapest, IAWQ 17e conférence. Juillet 1994.
- REEVE C.A., BOCKMAN A.T. and MATIN A., 1984. Role of protein degradation in the survival of carbon starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 157 : 758-763.
- REEVE C.A., AMY P.S. and MATIN A., 1984. Role of protein synthesis in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* 160 : 1041-1046.
- ROSACK D.B. et COLWELL R.R., 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Env. Microbiol.* vol. 53, pp. 2889-2982.

- SHUVAL H.I., COHEN J. and KOLODNEY, 1973. Regrowth of coliforms and fecal coliforms in chlorinated wastewater effluent. *Wat. Res.* 7 : 537-546.
- SINGH A., YEAGER R. et G.A. Mc FETERS, 1986. Assessment of in vivo revival, growth and pathogenicity of *E. coli* strains after copper and chlorine injury. *Appl. Env. Mic.* 52 : 832-837.
- WARREN L.S., BENOIT R.E., JESSEE J.A., 1978. Rapid enumeration of fecal coliforms in water by a colimetric β -D-galactosidase assay. *Appl. Env. Microbiol.*, 35, 136-141.

GRAND PROGRAMME QUALITE - EPURATION DES EAUX

II - EFFET D'UN EFFLUENT DE STATION D'EPURATION SUR LA SURVIE ET L'ETAT PHYSIOLOGIQUE D'*ESCHERICHIA COLI* ET *SALMONELLA MANHATTAN* EN EAU DE MER

J. DUPONT - O. KEVORKIAN

SOMMAIRE

II - EFFET D'UN EFFLUENT DE STATION D'EPURATION SUR LA SURVIE ET L'ETAT PHYSIOLOGIQUE D'*ESCHERICHIA COLI* ET *SALMONELLA MANHATTAN* EN EAU DE MER

INTRODUCTION	24
MATERIEL ET METHODES	24
1. Effluent de station d'épuration	24
2. Eau de mer	25
3. Souches bactériennes	25
4. Microcosmes	25
5. Plan expérimental	25
6. Survie des bactéries dans les microcosmes	26
7. Etat Physiologique des bactéries survivantes	26
7.1 Substrats utilisés	27
7.2 Cinétiques de croissance	27
7.3 Expérimentations témoins	27
RESULTATS	28
1. Survie des bactéries dans les microcosmes	28
1.1 Evolution du nombre de bactéries cultivables en fonction du temps de séjour en eau de mer	28
1.1.1 <i>Escherichia coli</i>	28
1.1.2 <i>Salmonella manhattan</i>	29
1.2 Estimation et modélisation des effets des facteurs salinité, effluent, et température sur la survie bactérienne	29
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> (tableau 1, figure 3)	30
1.2.2 <i>Salmonella manhattan</i> (tableau 2, figure 4)	30
2. Etat physiologique des bactéries survivantes	31
2.1 Expérimentations témoins	31
2.1.1 Croissance des bactéries dans le milieu minéral minimum M63 sans substrat	31
2.1.2 Influence de la salinité et de la concentration en effluent du milieu M63 avec substrat sur la croissance des bactéries survivantes	31
2.2 Evolution de l'assimilabilité des substrats et du niveau d'activité métabolique des bactéries survivantes en fonction de leur temps de séjour en eau de mer	31
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	32
2.2.2 <i>Salmonella manhattan</i>	33

2.3	<i>Estimation et modélisation des effets de la salinité, de l'effluent et de la température sur l'assimilabilité des substrats et le niveau d'activité métabolique des bactéries survivantes</i>	34
2.3.1	<i>Escherichia coli</i>	34
2.3.2	<i>Salmonella manhattan</i>	36

DISCUSSION	38
-------------------	-------	----

BIBLIOGRAPHIE	43
----------------------	-------	----