

CENTRE OcéANOLOGIQUE
DE
BRETAGNE

Département
ELGMM

ACCEPTABILITE DU MILIEU - RADE DE BREST

ETUDE DES SUSPENSIONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE

ET A LA MICROSONDE (SEDIMENTOLOGIE ET MICROBIOLOGIE)

Rapport interne

PH. BASSOULET *
M. POMMEPUY *
M. CORMIER[†]

(mars 1980)

* Centre Océanologique de Bretagne.

† Faculté de Médecine de Rennes - laboratoire de bactériologie.

Cette étude a été réalisée en collaboration avec Madame BASSOULET
Messieurs BOHN, DESBRUYERES, et LERIBOT à l'aide du microscope à
balayage et de la microsonde du Centre Océanologique de Bretagne,
de la Compagnie Française des Pétroles et de la Faculté des
Sciences de PARIS V.

SOMMAIRE

- I. BUT DE LA METHODE
- II. MODE OPERATOIRE ET TECHNIQUES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS
- III. ETUDE DES ECHANTILLONS AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE - INTERPRETATION
DES PHOTOS REALISEES
- IV. ETUDE A LA MICROSONDE ELECTRONIQUE
- V. AMELIORATIONS A APPORTER AUX TECHNIQUES D'ETUDES - CONCLUSIONS
- VI. ANNEXES
 - Examens des prélèvements de juin 1980
 - Examens des prélèvements de décembre 1980

ACCEPTABILITE DU MILIEU - RADE DE BREST

Dans le programme "Acceptabilité du Milieu - Rade de Brest", on observe une décroissance des concentrations bactériennes des émissaires vers le large.

De nombreuses publications font état du "pouvoir auto-épurateur de l'eau de mer" et du rôle des matières en suspension.

Pour expliquer ce phénomène, il s'est avéré nécessaire d'utiliser le microscope électronique à balayage afin de cerner le comportement des bactéries en présence des particules en suspension.

I. BUT DE LA METHODE :

L'étude au microscope électronique à balayage des suspensions a pour but de compléter les informations données par les analyses sédimentologiques classiques (Granulométrie, Coulter Counter...).

Elle doit permettre :

- d'une part de cerner les diverses particules minérales et organiques présentes dans les suspensions,
- d'autre part, d'apprécier l'absence ou la présence de bactéries sur ces particules.

Le but ultime est de savoir quelles bactéries se fixent sur tel type de particules et donc d'avoir une idée des "préférences bactériennes" en ce qui concerne leur transport en suspension.

II. MODE OPERATOIRE ET TECHNIQUES DE PREPARATION DES ECHANTILLONS :

a) les filtres :

Les prélèvements d'eau de mer sont filtrés sur filtres Millipore (0,45 μm ou 0,22 μm).

Deux types de filtres ont été testés afin de mieux visualiser les suspensions au microscope électronique à balayage (M.E.B.) :

- Filtre acétate (0,45 μ) de 47 mm de diamètre,
- Filtre argent (0,45 μ) de 24 mm de diamètre.

Ces filtres ont ensuite subi le traitement de fixation classique pour l'étude microbiologique.

Le protocole en est le suivant :

- dans : Glutaraldehyde 2,5 % dans tampon Cacodylate de Na 140 meq pendant 2 heures.
- Lavage 3 fois 20 mn dans tampon Cacodylate de Na 360 meq.
- dans : $O_8 O_4$ 2 % dans tampon Cacodylate de Na 360 meq. pendant 2 heures.
- lavage : 1 fois 5 mn dans tampon Cacodylate de Na 360 meq.
- déshydratation à l'alcool :

à 30 %	pendant	20 mn
à 50 %	"	"
à 70 %	"	"
à 90 %	"	"
à 100 %	"	1 heure.

b) Fixation des filtres sur plots :

Les plots utilisés sont en dural de 13 mm et de 8 mm de diamètre suivant le type de M.E.B. employé (CAMBRIDGE ou JEOL).

Sur le plot, est appliqué du scotch double face qui reçoit ensuite le filtre.

c) Métallisation :

Les plots ainsi préparés doivent ensuite être métallisés pour assurer une parfaite conduction.

Deux types de métallisation ont été testés :

- au carbone,
- à l'or.

La métallisation au carbone a pour effet d'empâter les structures et donne une sorte de "flou". La métallisation à l'or par contre ne présentant pas cet inconvénient, a été retenue pour les analyses au M.E.B.

III. ETUDES DES ECHANTILLONS AU M.E.B. - INTERPRETATIONS DES PHOTOS :

Des échantillons ont fait l'objet de cette étude au M.E.B. Il s'agit des prélèvements des campagnes de Juin et Novembre-Décembre 1980 dont la situation figure sur la carte ci-jointe.

Prélèvements de Juin 1980 :

- Point 20 (Passe ouest du Port de Commerce), surface-flot (échantillon 218 ;
- Emissaire du Moulin Blanc (échantillon EX4) ;
- Zone Industrielle Portuaire , sortie de la station d'épuration de Brest. (échantillon ZIP).

Prélèvements de Décembre 1980 :

- Zone industrielle (ZIP).
- Point 6 (Passe Sud du port de plaisance du moulin blanc)
- Point 1 (Exutoire du vallon).

Pour chacun de ces points, des photos au M.E.B. ont été réalisées (voir photos et interprétation en annexe).

Ces études ont été réalisées sur les appareils suivants :

- . CAMBRIDGE , du Centre Océanologique de Bretagne,
- . CAMEBA BEB 07 de la Compagnie Française des Pétroles,
- . JEOL de la Faculté des Sciences, Paris V.

IV. ETUDE A LA MICROSONDE ELECTRONIQUE :

Afin de compléter les renseignements apportés par le M.E.B., en particulier en ce qui concerne la nature géochimique des éléments particuliers, il s'est avéré nécessaire de passer les échantillons à la microsonde électronique (CANECA). Les spectres caractéristiques donnant la nature et l'intensité des éléments ont été obtenus. Après calcul des formules structurales, on pourra déterminer quels types de minéraux argileux sont présents sur les filtres.

Remarque :

La métallisation à l'or utilisée pour l'étude au M.E.B. a l'inconvénient de masquer les raies caractéristiques proches de cet élément dans le spectre (du fait de son numéro atomique élevé) lorsqu'on utilise la microsonde électronique. Une métallisation au carbone est donc plus appropriée dans ce cas.

V. AMELIORATIONS A APPORTER AUX TECHNIQUES D'ETUDES - CONCLUSIONS :

Outre le fait signalé ci-dessus concernant la métallisation, certaines techniques peuvent être améliorées. Notamment, la présence de bactéries isolées serait certainement plus facilement décelable par l'emploi d'un autre type de filtre.

Il serait souhaitable pour la détermination des différents types argileux au M.E.B. de réaliser des photos types de minéraux argileux connus.

Conclusions :

Ce travail est une approche originale de l'étude de la fixation des bactéries sur les particules en suspension. Le matériel analysé est de l'eau de mer filtrée provenant de la Rade de Brest (à proximité des égouts et du Port de Commerce).

Il est étonnant de constater que, malgré des teneurs en suspension très faibles (1 à 3 mg/l) et des quantités d'eau de mer filtrées limitées (\approx 100 ml), les observations se soient avérées aussi fructueuses sur le plan microbiologique.

Dans le temps imparti, seuls quelques examens ont pu être réalisés à la microsonde et au microscope à balayage.

En effet, il a fallu au préalable résoudre le problème du traitement des échantillons et se familiariser avec la manipulation des appareils.

De ces rapides observations, il ressort néanmoins quelques résultats intéressants :

- 1) Il est possible, avec une certaine habitude, de reconnaître les différents composants présents sur le filtre (minéraux, organismes planctoniques, etc.).
- 2) On peut distinguer par leur morphologie les formes bactériennes classiques : cocci, bacilles, vibrions ; mais également leur "vitalité" (cellules vivantes, en voie de multiplication, mortes).
- 3) Les bactéries rejetées par les égouts semblent, selon les saisons ou la qualité des rejets (par exemple teneurs en matières en suspension), se présenter sous différentes formes et modes d'attachement :
 - . colonies très denses (cf. Déc. 81 - ZIP en annexe), sans support particulaire bien défini.
 - . colonisation dense de matériel particulaire organique ou minéral (cf. juin 81 - ZIP).
 - . de rares colonies ou bactéries isolées.
- 4) Sur un même prélèvement certaines particules apparaissent comme fortement colonisées par les bactéries, d'autres sont indemmes de toute présence.
- 5) A l'aide de la microsonde, il est possible d'analyser les composants chimiques des minéraux sur lesquels sont susceptibles de se fixer les bactéries, cependant , l'interprétation de ces résultats doit être faite avec prudence. En effet, du fait du matériel analysé, seule une estimation semi-quantitative peut être réalisée.

Ces premiers résultats, pour partiels qu'ils soient, sont néanmoins très intéressants et originaux.

Ils permettent d'orienter les axes d'études pour une phase ultérieure :

- 1) Recherche des formes bactériennes rejetées par les égouts (formes libres, coloniales, adsorbées).
- 2) Recherche de l'identification des minéraux d'après leur composition chimique donnée par la microsonde.
- 3) Identification des différents types de minéraux ou organismes susceptibles de fixer les bactéries. Ce travail pourrait être réalisé de deux manières :
 - sur des prélèvements effectués en Rade,
 - sur des ensemencements d'argiles "propres" à partir de souches isolées dans la Rade de Brest.
- 4) Par filtration différentielle (50 μ ; 0,45 μ ; et 0,22 μ) étudier quelle est la fraction fixant les bactéries.
- 5) Tenter de quantifier les résultats par numération des bactéries libres et non libres.

RADE DE BREST

0 1 2 Km

① Point de prélèvement
248 Echantillons examinés au microscope électronique à balayage et microsonde.

BREST

ZIF

VALLON

EX4

MOULIN BLANC

248

19

14

BANC DU CORBEAU

Presqu'île de
PLOUGASTEL

Ref.

48
24

22

20

28

0

26

24

VI. ANNEXÉS

EXAMENS DES PRELEVEMENTS DE JUIN 1980

1) Prélèvement de la station d'épuration de Brest

- 22 940 : vue générale d'une particule *. Le support représente les pores du filtre. On observe de nombreuses bactéries fixées.
- 22 039 : détail de la photo précédente. bacille.
- 22 937 : détail de la photo 22 940. Bacilles et bactéries mortes fixés à la surface du support.
- 22 938 : détail de la photo 22 940. Amas bactérien fixé. En haut, à droite, détail du filtre.
- 22 943 : vue générale d'une particule* issue de la station d'épuration. Nombreuses bactéries fixées.
- 22 942 : détail de la photo précédente montrant la répartition des bactéries.
- 22 941 : idem.
- 22 935 : détail de la photo 22 943 montrant un cocci.
- 22 945 : grain de quartz sur support filtre acétate (0,45 μ).
- 22 946 : détail de la photo précédente.
- 22 944 : grain de quartz sur support filtre acétate. Dans ces photos, on note la difficulté de distinguer des bactéries isolées dans les pores du filtre.
- 22 934 : vue générale d'une particule*.
- 22 936 : détail de la photo précédente.

* Les premières recherches et analyses à la microsonde semblent indiquer que ces particules sont, dans la grande majorité des cas, d'origine organique.







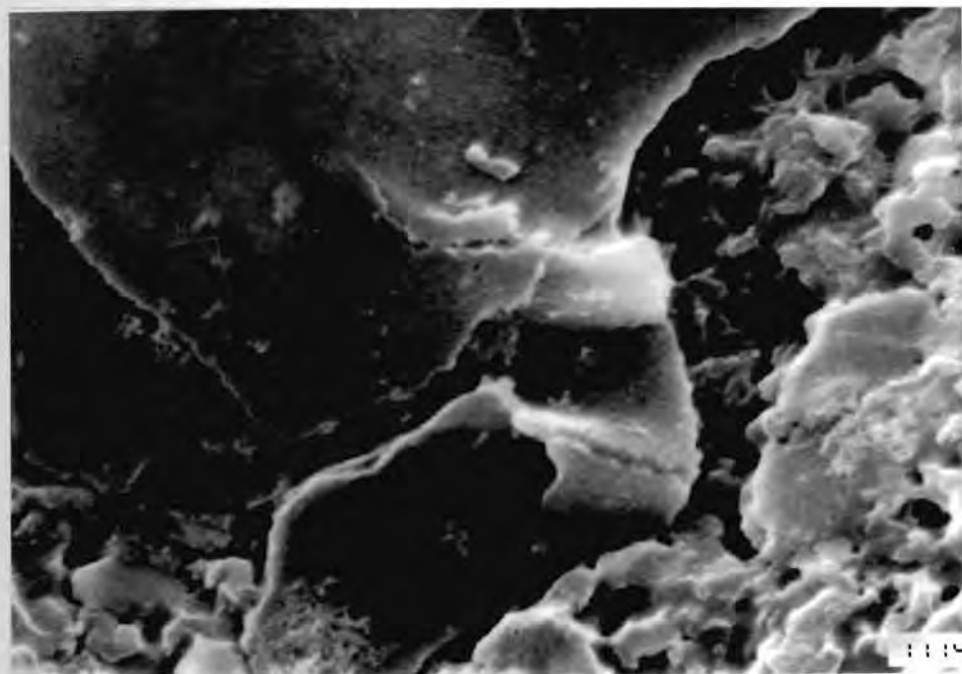
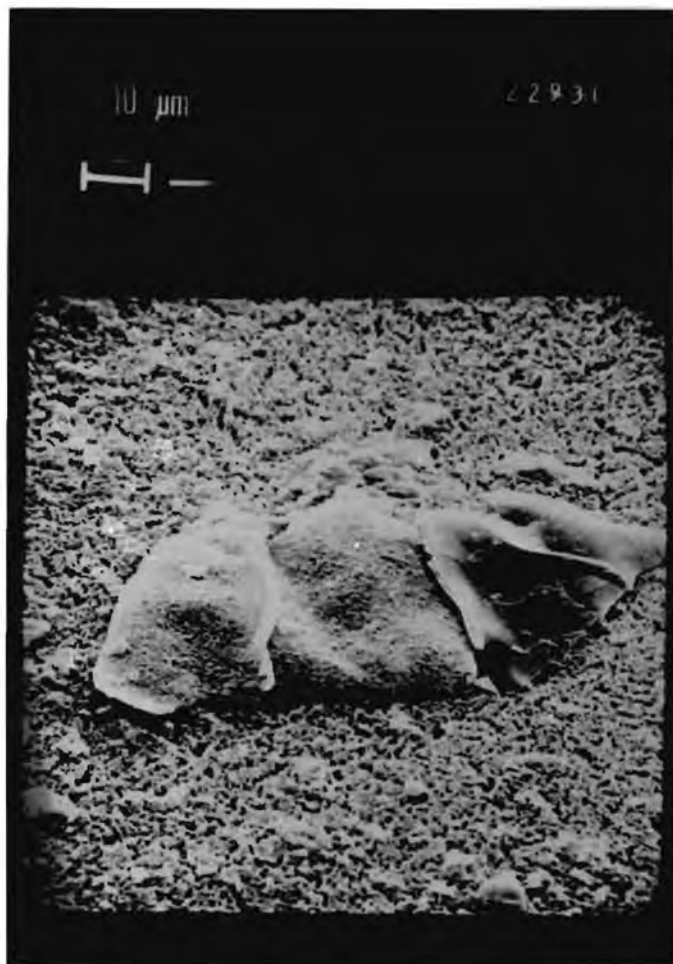


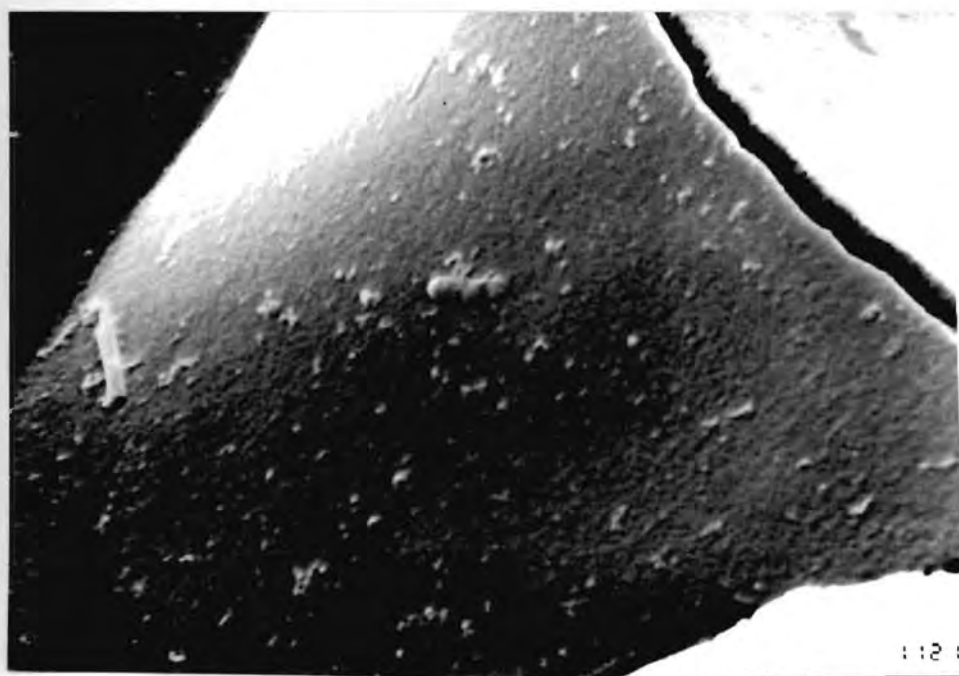


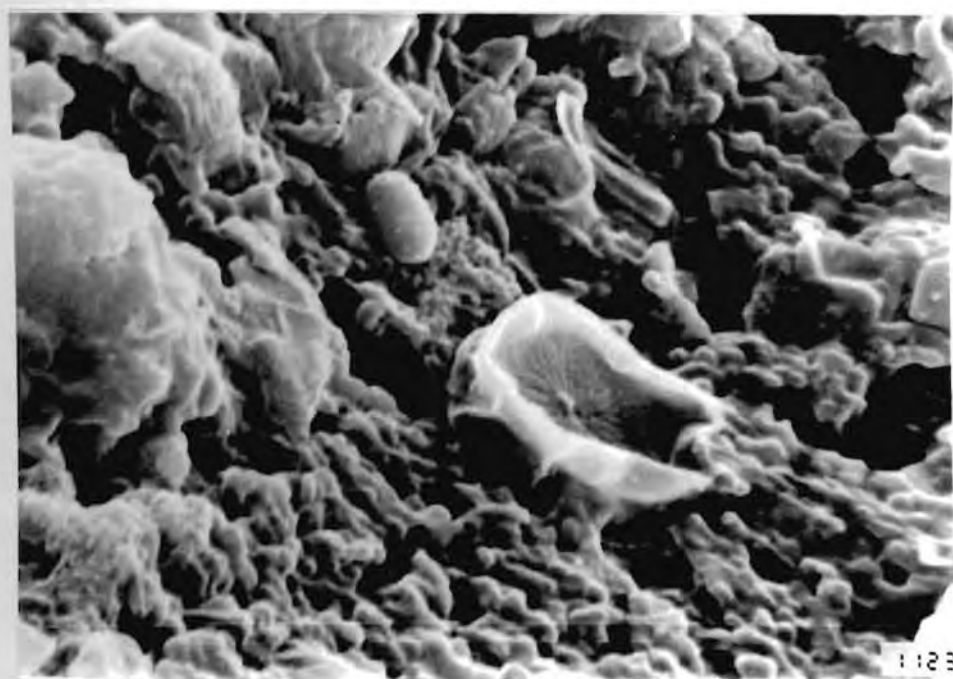
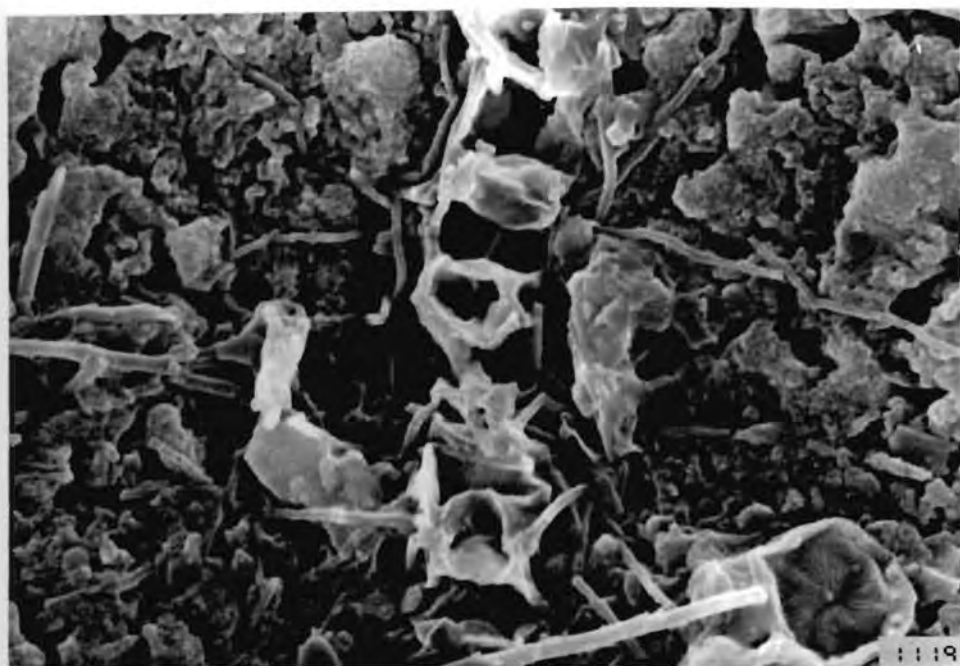
2) Prélèvements de la Passe Ouest du Port de Commerce

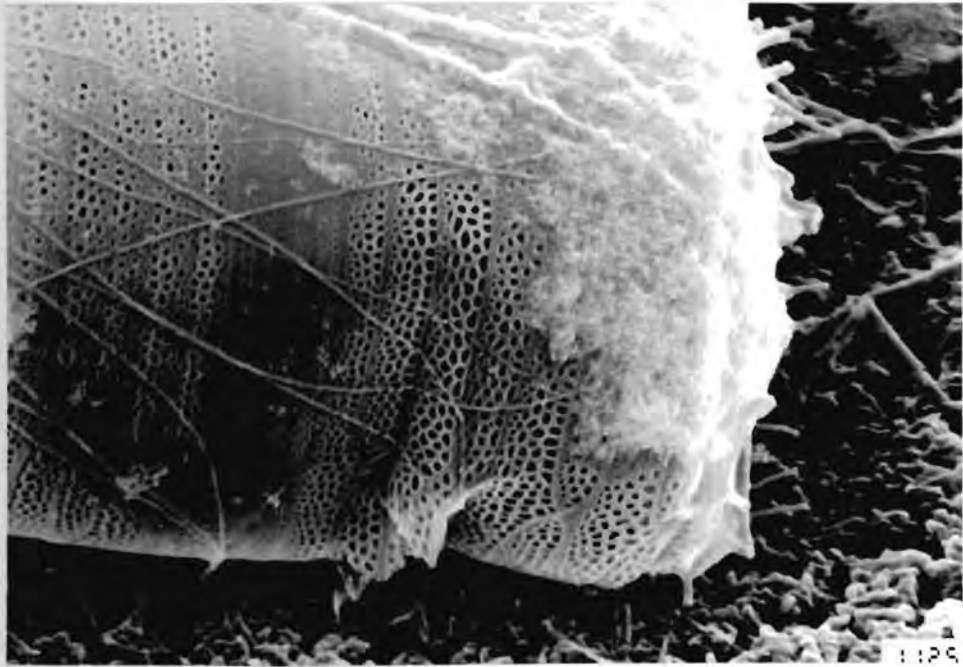
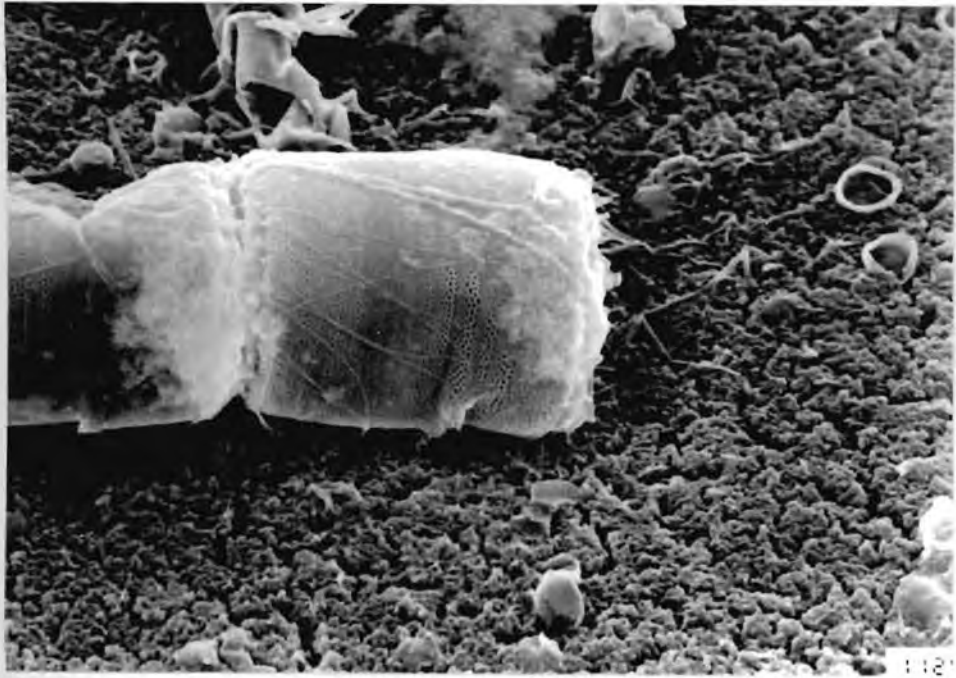
(Point 22 Flot - Surface - N° 218)

- 22 933 : diatomée accolée à une particule. Plus haut, bacille.
au-dessous : le filtre.
- 22 930 : vue générale d'une des nombreuses particules présentes sur le
filtre. Sur la partie droite de celle-ci des bactéries fixées.
- 1 113 : (x 10 000) plaquette argileuse.
- 1 126 : (x 3 500) détail d'une particule. Amas vraisemblablement bacté-
riens. Morphologie compatible de vibrions. Présence de micro-
colonies.
- 1 128 : (x 10 000) détail d'une autre particule. On note la différence
de colonisation des supports d'un même prélèvement.
- 1 121 : (x 10 000) idem photo précédente, avec vue d'un bacille.
- 1 119 : (x 3 500) diatomées coloniales planctoniques : Chaetoceros.
Apparaissent ici déshydratées et brisées par suite de la tech-
nique de fixation utilisée.
- 1 117 : (x 5 000) diatomées non déterminables centriques.
- 1 123 : (x 7 500) idem. Présence d'un bacille isolé sur le filtre.
- 1 124 : (x 1 500) diatomées du type des trois photos précédentes avec
diatomées coloniales (peut être Melosira - eau douce).
- 1 125 : (x 3 500) idem.



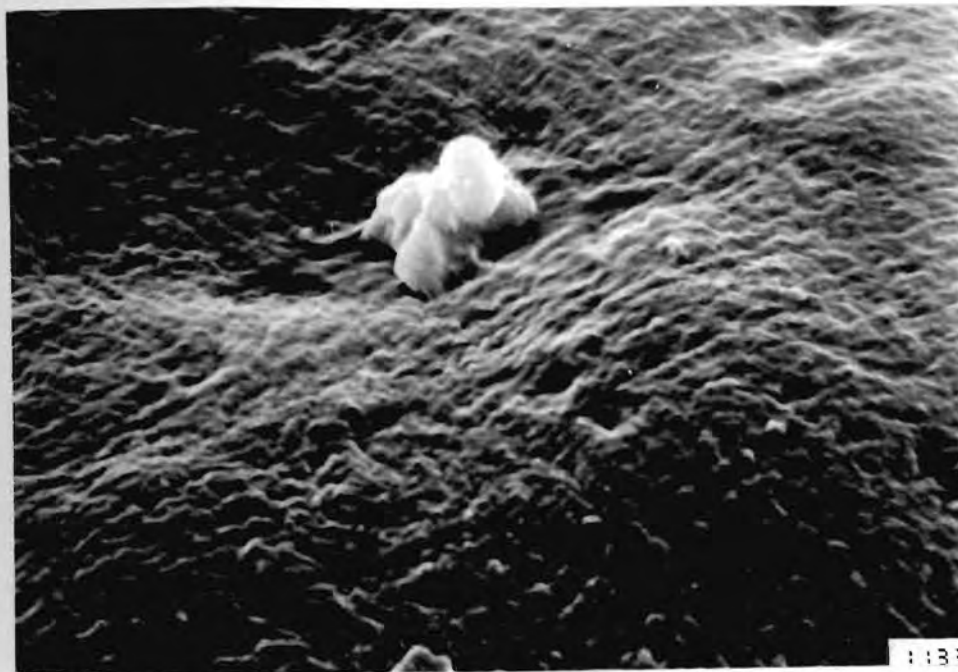
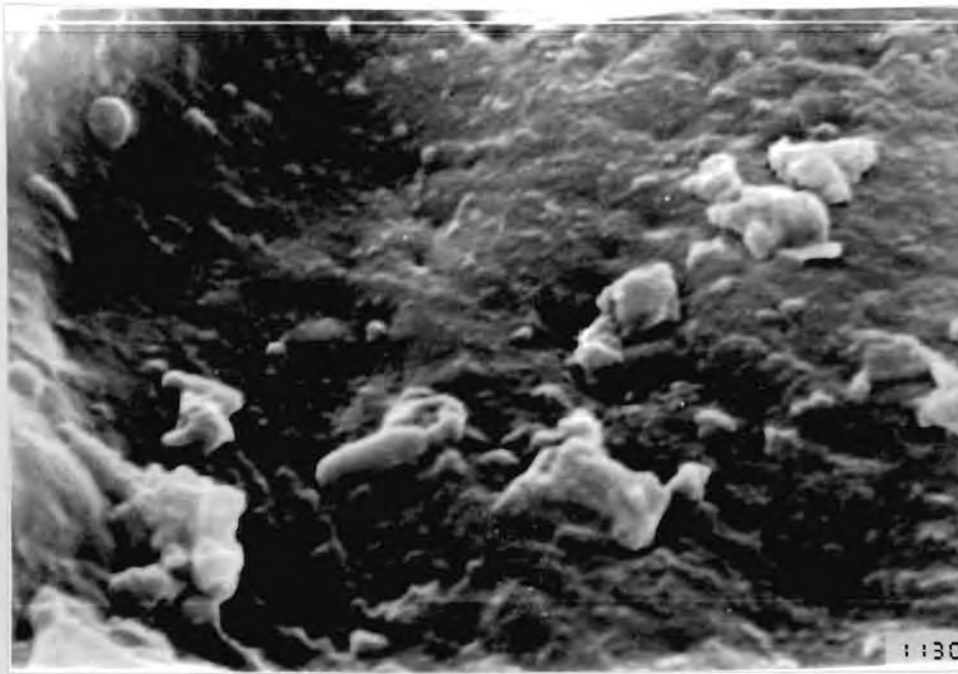


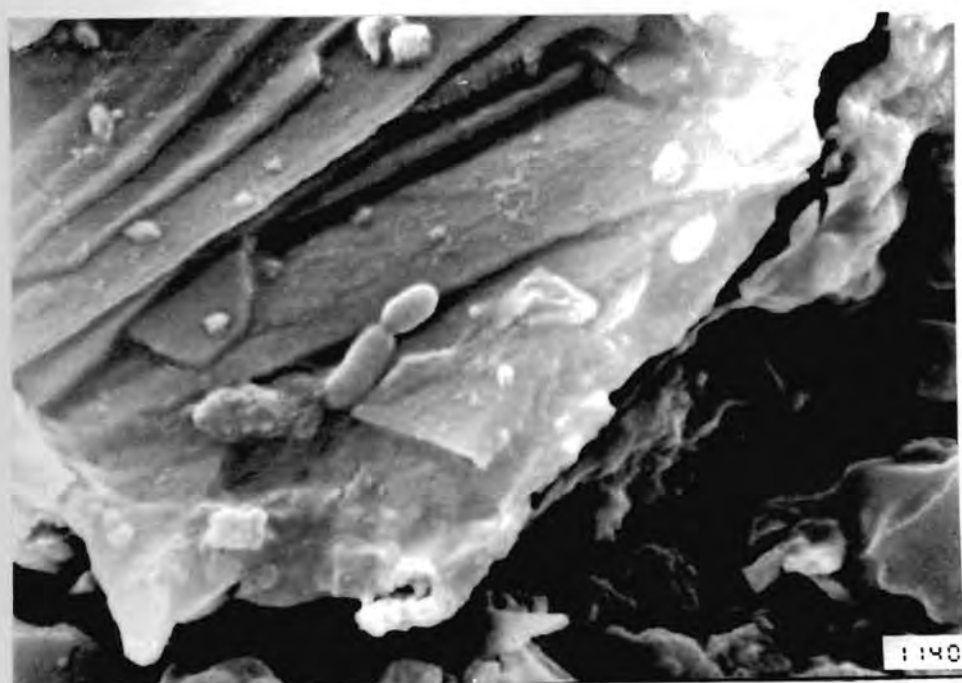
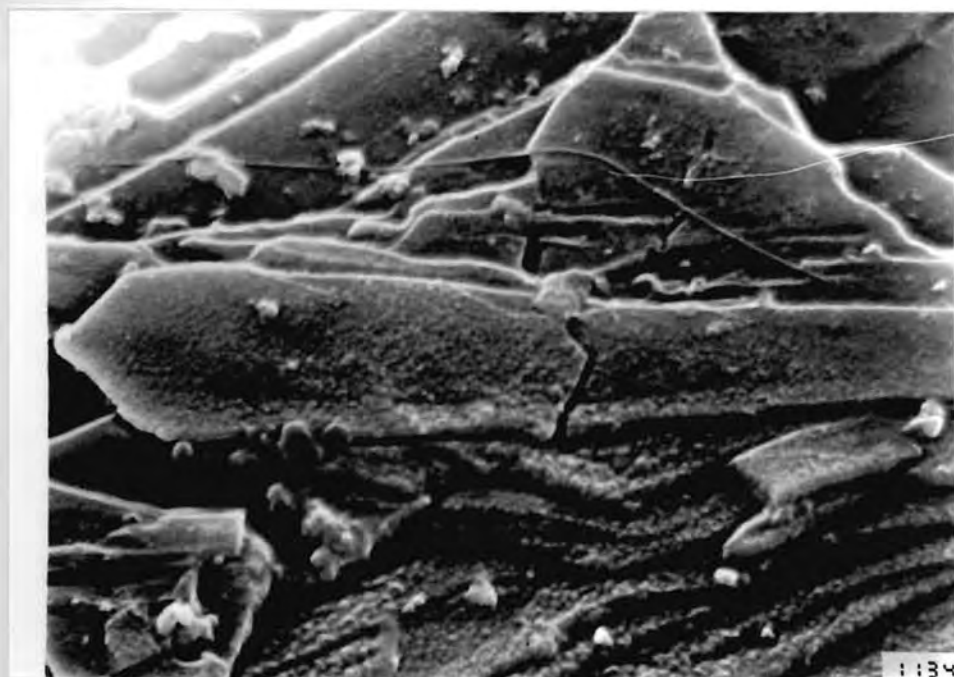
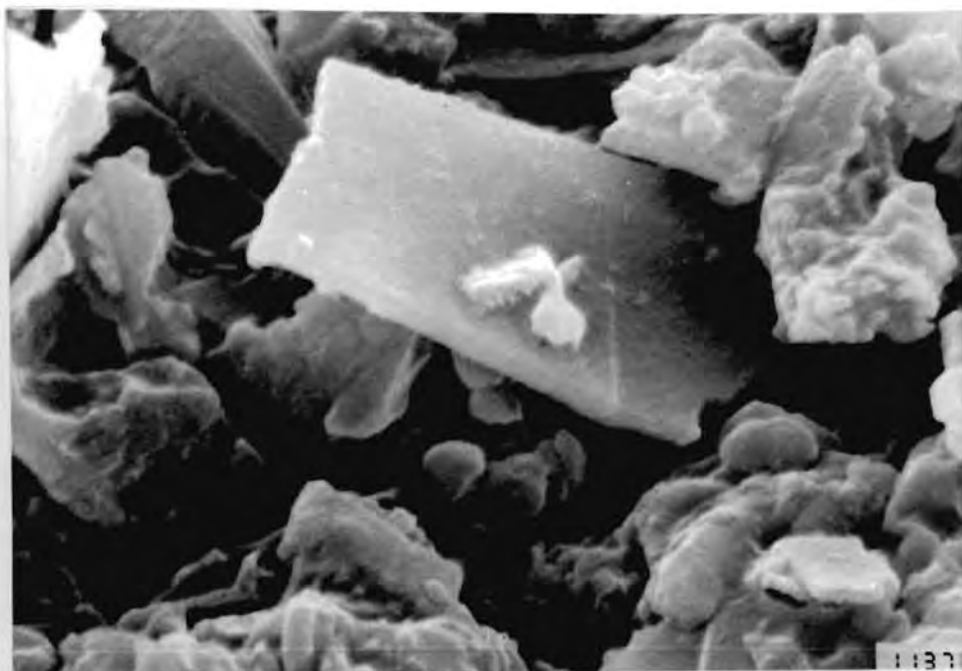




3) Prélèvements de l'exutoire du Moulin Blanc (ruisseau du Costour - E x 4)

- 1 130 : (x 7 500) bacilles et cocci sur une particule.
- 1 132 : (x 7 500) vue d'une plaquette argileuse.
- 1 133 : (x 7 500) surface d'une particule. Cocci sur amas de cellules mortes (?).
- 1 137 : (x 7 500) grains de quartz et plaquettes argileuses.
- 1 134 : (x 5 000) feuillets de mica.
- 1 140 : (x 7 500) feuillets de mica supportant un bacille en voie de multiplication.





1) Echantillon de la station d'épuration (ZIP)

1. (x 50) vue générale du filtre.
2. (x 500) grossissement des amas présents sur le filtre.
3. (x 2 500) détail de la photo précédente. On distingue les colonies bactériennes agglomérées.
4. (x 5 000) chaîne de colonies bactériennes au périmètre de l'amas précédent.
5. (x 25 000) détail des photos 2 et 3. A ce grossissement, on distingue très nettement des bacilles en multiplication.
6. (x 25 000) idem 5. L'analyse à la microsonde de l'amas lui donne une origine organique.

2) Echantillon du ruisseau du Vallon

- 7 (x 12 500) bactéries sur des débris de phytoplancton.
- 9 (x 20 000) idem. On distingue des filaments autour de la bactérie.

3) Echantillon du point 6

- 8 (x 25 000) bactérie entourée de plaquettes argileuses ou débris coquillers.

