

63352

Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral
Département Microbiologie et Phycotoxines (DEL/MP)

Gourmelon M., Derrien A., Crenn I., Loaec S.

Juin 2002 - R.INT.DEL/MP/MIC/02.02/Brest

ifremer

Dénombrement des coliformes thermotolérants ou des *Escherichia coli* dans des sédiments côtiers vaseux



Fiche documentaire

Numéro d'identification du rapport : RST.DEL/02.01/Brest		date de publication : Juin 2002
Diffusion : libre X restreinte: <input type="checkbox"/> interdite : <input type="checkbox"/>		nombre de pages bibliographie: illustration(s): langue du rapport: française
Validé par :		
Titre et sous-titre du rapport : Dénombrement des coliformes thermotolérants ou des <i>Escherichia coli</i> dans des sédiments côtiers vaseux		
Contrat n°	Rapport intermédiaire <input type="checkbox"/> N°	Rapport définitif X
Auteur(s) principal(aux) : nom, prénom Gourmelon M., Derrien A., Crenn I., Loaec S. – DEL/MP/MIC		Organisme / Direction / Service, laboratoire IFREMER Direction de l'Environnement et de L'Aménagement Littoral Département Microbiologie et Phycotoxines Laboratoire de Microbiologie
Collaborateur(s) : nom, prénom Le Mennec C., Caprais M.P., Hervio-Heath D., Pommepuy M., Cann P., Bassoullet Ph., Philippon X.		Organisme / Direction / Service, laboratoire Ifremer DEL/MP/MIC Ifremer DEL/EC
Cadre de la recherche :		
Programme :		Convention :
Projet :		Autres (préciser) :
Campagne océanographique : (nom de campagne, année, nom du navire)		
Résumé :		
<p>Des bactéries fécales telles que les <i>Escherichia coli</i> ou les coliformes thermotolérants ont été recherchées dans des sédiments côtiers vaseux (prélevés sur deux sites différents : Morlaix et St Pol de Léon ; Finistère). Ces vases, sous influence de rejets polluants, de par leur richesse en matière organique et en particules de faible taille sont susceptibles d'héberger ces bactéries. Une partie de l'étude a consisté à comparer différentes techniques de relargage des bactéries des particules de sédiment décrites dans la littérature. L'agitation au vortex à vitesse maximale pendant 5 minutes s'est avérée être la technique la plus adéquate pour la recherche des bactéries cultivables dans les sédiments analysés. L'utilisation des ultrasons, l'homogénéisation par un broyeur ou l'incubation dans un mélange de différentes substances chimiques telles qu'un détergent, le désoxycholate de sodium, et une résine échangeuse d'ions, la chelex 100, ont conduit à des concentrations plus faibles ou variables d'un sédiment à l'autre. Une autre partie de l'étude a consisté à comparer les techniques de dénombrement des bactéries : techniques NPP classique ou miniaturisée, techniques sur milieu gélosé par étalement ou filtration sur membrane. Parmi ces techniques, la technique NPP miniaturisée semble être la plus intéressante. En effet, cette technique est la plus rapide et a donné des résultats plus reproductibles que la technique NPP en tubes. Si l'analyse a lieu directement sur les suspensions totales, le seuil de détection est toutefois de 150 ou 400 <i>E. coli</i> par 100 g de sédiment humide par la technique NPP en microplaque contre seulement 2 à 20 bactéries par la technique NPP classique. Pour des sédiments suffisamment contaminés (10^3 bactéries dans 100 g de sédiment humide), l'utilisation de la gélose TBX conduisant à des résultats reproductibles est également une technique à retenir. Enfin, des analyses ont eu lieu également sur des surnageants (obtenus après centrifugation à 500 g pendant 2 minutes des suspensions de sédiment) afin de faciliter les dénombrements et de diminuer les seuils de détection sur milieu gélosé ou sur microplaque. Des résultats généralement plus reproductibles mais parfois inférieurs aux résultats obtenus par l'analyse des suspensions totales ont été alors observés.</p>		

Abstract :

Faecal bacteria as the *Escherichia coli* or the faecal coliforms have been enumerated in coastal muddy sediments (collected from two sites : Morlaix and St Pol de Léon, Finistère). These muds, near polluting outfalls, by their organic matter and small-sized particles contents could be contaminated by these bacteria. One part of this present study has been concerned by a comparison of techniques applied in order to release bacteria from sediment particles described in published literature. The 5 min-vortex agitation at max speed has been found to be the most appropriate technique to homogenise sediment suspension before enumerating culturable bacteria in ours experiments. The sonication, the blender homogenisation or the incubation with chemical agents as a sodium desoxycholate and chelex 100 a cation exchanger detergent. In a second part, the efficiency of bacterial enumeration techniques such as 5-tube most-probable-number (MPN) or miniaturized MPN techniques, plate count or membrane filtration methods have been investigated. Among these techniques, the miniaturized MPN technique have the most advantages. In fact, this technique is quicker and more precise MPN estimates of *E. coli* numbers are yielded. However, if the analyses have been performed on total suspensions, the limit of detection was less than 150 or 400 *E. coli* per 100 grams of wet sediment by using microplate and less than 2 or 20 bacteria by conventional MPN technique. For sediments contaminated by more than $1 \cdot 10^3$ bacteria per 100 g of wet sediment, the TBX medium could also be use. In order to facilitate the enumerations and to decrease the limit of detection on solid medium and on microplate, some analyses have been also performed on supernatants (obtained by a sediment suspensions 2 min- centrifugation at 500 g). The results obtained were generally more reproducible but sometimes inferior to the ones yielded by total suspension analyses.

Mots-clés : Sédiment, *Escherichia coli*, coliformes thermotolérants, dénombrement

Key-word : Sediment, *Escherichia coli*, faecal coliforms, enumeration.

1.	INTRODUCTION.....	2
2.	REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
2.1.	GÉNÉRALITÉS SUR LE PHÉNOMÈNE D'ADHÉSION.....	3
2.2.	DÉFINITION DES COLIFORMES THERMOTOLÉRANTS ET DES <i>ESCHERICHIA COLI</i>	4
2.2.1.	<i>Les coliformes thermotolérants</i>	4
2.2.2.	<i>Escherichia coli</i>	4
2.3.	TECHNIQUES DE MISE EN ÉVIDENCE DES BACTÉRIES DANS LES SÉDIMENTS.....	4
2.3.1.	<i>Techniques de décrochage</i>	5
2.3.2.	<i>Techniques de numération</i>	6
3.	ETUDE D'OPTIMISATION D'UNE TECHNIQUE DE MISE EN ÉVIDENCE DES BACTÉRIES FÉCALES DANS LES SÉDIMENTS.....	8
3.1.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	8
3.1.1.	<i>Collecte du sédiment</i>	8
3.1.2.	<i>Préparation des dilutions</i>	8
3.1.3.	<i>Les traitements de décrochage</i>	8
3.1.4.	<i>Analyses sur la suspension totale ou le surnageant</i>	9
3.1.5.	<i>Dénombrement des bactéries</i>	9
3.1.6.	<i>Description des différentes expérimentations</i>	10
3.1.7.	<i>Caractérisation sédimentologique et chimique des sédiments</i>	16
3.1.8.	<i>Analyse des données</i>	17
3.2.	RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	17
3.2.1.	<i>Les techniques de décrochage</i>	17
3.2.2.	<i>Les techniques de numération</i>	29
4.	CONCLUSION	47
5.	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
6.	REMERCIEMENTS	52
7.	ANNEXES	53

Photographies en couverture : Morlaix (écluse) et St Pol de Léon (sortie de la station d'épuration)
 © Jean Claude Le Saux , Ifremer

1. Introduction

A leur arrivée en mer, les bactéries d'origine fécale sont diluées dans la colonne d'eau. Une partie de ces bactéries, fixées à des particules, se dépose sur les sédiments vaseux. De nombreuses études ont montré que la charge microbienne de ces sédiments était plus importante que celle de l'eau surnageante (Irvine et Pettibone, 1993 ; Martinez-Manzanares *et al.*, 1992) et d'autant plus importante que des zones urbaines ou agricoles se trouvaient à proximité. Les bactéries survivent dans les sédiments un certain temps et peuvent être remises en suspension lors des phénomènes de marées, lors de certaines conditions météorologiques (tempêtes, fortes pluies, vents violents...), ou lors d'opérations de dragages. Ces remises en suspension peuvent être préjudiciables pour la qualité microbienne des eaux conchylicoles ou de baignade. Ceci explique l'intérêt de rechercher les coliformes thermotolérants (CTT) ou les *Escherichia coli* (*E. coli*), indicateurs de contamination fécale, dans les sédiments.

Contrairement à l'eau et aux coquillages, il n'existe pas de technique normalisée (norme ISO ou Afnor) pour dénombrer les *E. coli* ou les CTT dans les sédiments. Divers protocoles sont, toutefois, décrits dans la littérature. Deux étapes semblent primordiales pour obtenir une bonne quantification de ces bactéries : un décrochage des bactéries des particules sans les endommager et une optimisation de leur dénombrement.

L'objet de cette étude était de déterminer la technique la mieux adaptée pour dénombrer les bactéries fécales telles que les *E. coli* ou les CTT dans des sédiments vaseux. Une partie du travail a consisté à tester des techniques de décrochage des bactéries du sédiment, une autre à comparer l'efficacité de différentes techniques de numération. Au cours de cette étude, des sédiments de deux localisations (Morlaix et St Pol de Léon, Finistère) ont été analysés.

2. Revue bibliographique

Cette partie consiste en une description du phénomène d'adhésion des bactéries, une présentation des bactéries recherchées (coliformes thermotolérants ou *Escherichia coli*) et une description de différentes techniques de décrochage des bactéries des particules et de dénombrement des CTT et des *E. coli* dans les sédiments publiées.

2.1. Généralités sur le phénomène d'adhésion

L'adhésion des bactéries à diverses surfaces a fait l'objet de nombreuses études dont les principaux résultats ont été repris dans les articles de Costerton *et al.* (1978), Maki et Mitchell (1986), Le Guyader (1989), Gilbert *et al.*, 1993, An et Friedman, 1998, Dalton et March, 1998 et Morton *et al.*, (1998).

Dans l'environnement, les bactéries peuvent être rencontrées libres ou fixées à des particules. L'adhésion permet à la bactérie d'être à proximité immédiate de nutriments assimilables, de se protéger des prédateurs, et d'éviter d'être emportée par des facteurs physiques tels que les courants.

L'adhésion de la bactérie à une particule est une interaction complexe entre la bactérie, la particule et l'eau environnante. L'adhésion peut être réversible ou irréversible.

Au cours de la phase initiale réversible et instantanée, la bactérie se maintient à proximité de la surface de la particule concernée. L'adhésion est, tout d'abord, réalisée par l'intermédiaire des forces de longue portée (distances > 150 nm, interactions non spécifiques) : forces attractives de London - Van der Waals et forces répulsives électriques. La répulsion se produit quand une cellule chargée négativement entre en contact avec une surface de charge négative (condition normale de la plupart des surfaces solides de l'environnement). Puis, les forces de faible portée telles que les liaisons chimiques (liaison hydrogène) et les interactions hydrophobes interviennent pour de plus faibles distances entre la bactérie et la surface (distances < 3 nm) (An et Friedman, 1998).

Cette phase est rapide et la désorption facile. La bactérie peut facilement être détachée de son support, par exemple par un simple lavage. Elle peut ensuite éventuellement être attachée de façon irréversible.

Au cours de la phase irréversible, un pont entre la cellule bactérienne et la surface de la particule est mis en place à partir de plusieurs types de polymères extracellulaires tels que les exopolymères, *pili*, *fimbriae* et flagelles. La production du glycocalyx, constitué de fibres de polysaccharides (molécules de sucre ramifiées) autour des éléments de la membrane externe des bactéries à gram négatif, permet à la bactérie d'adhérer et d'établir un gradient de diffusion des nutriments. Cette production qui nécessite de l'énergie est maximale quand les bactéries se trouvent dans un milieu hostile. Ce type d'adhésion est stable dans le temps et la bactérie ne peut plus être arrachée de son support par lavage.

L'adhésion des cellules bactériennes à des surfaces inertes dépend également de l'état physiologique des cellules. Ainsi, des expériences sur des cultures de *E. coli* en

milieu minimum ont montré que l'adhésion, la mobilité électrophorétique et l'hydrophobicité des cellules augmentaient au cours de la phase de latence et de la phase stationnaire et diminuaient pendant la phase exponentielle (Gilbert *et al.*, 1993).

2.2. Définition des coliformes thermotolérants et des *Escherichia coli*

Au cours de cette étude, les coliformes thermotolérants et les *Escherichia coli* ont été les deux types de bactéries fécales recherchés dans les sédiments. Une brève description de leurs caractères est présentée ci-dessous.

2.2.1. Les coliformes thermotolérants

Les coliformes thermotolérants sont des microorganismes en bâtonnets, ne formant pas de spores, Gram négatifs, oxydase négatifs, aérobies ou anaérobies facultatifs, capables de croître en présence de sels biliaires, ou autres agents de surface ayant des propriétés inhibitrices de croissance analogues et capables de fermenter le lactose avec production d'acide (ou d'aldéhyde) et de gaz en 48 heures à la température de 44 °C.

Au plan taxonomique, les coliformes thermotolérants constituent un groupe hétérogène qui comporte plusieurs genres comprenant des espèces d'origine fécale et des espèces d'origine non fécale.

Les méthodes utilisées pour dénombrer les CTT reposent en particulier sur leur thermotolérance et comportent une incubation à 44 - 45 °C. Cependant, de nombreuses données montrent que *Klebsiella pneumoniae* d'origine non obligatoirement fécale (cette bactérie peut être retrouvée dans les déchets de papeterie par exemple) se développe bien à 44 - 45 °C. Au contraire, des coliformes d'origine fécale tels que certains *Enterobacter cloacae* et *Klebsiella oxytoca* par exemple ne cultivent pas à ces températures élevées.

2.2.2. *Escherichia coli*

Les *Escherichia coli* sont des coliformes thermotolérants produisant de l'indole à partir du tryptophane à 44 °C. Ils donnent un résultat positif à l'essai au rouge de méthyle. Ces bactéries ne peuvent pas produire de l'acétyl-méthyl-carbinol ni utiliser le citrate comme unique source de carbone.

Ils sont également capables de croître en aérobiose à 44 °C en milieu liquide et d'hydrolyser le 4-méthyl-umbelliféryl- β -D-glucuronide (MUG).

2.3. Techniques de mise en évidence des bactéries dans les sédiments

Divers protocoles permettant de décrocher les bactéries des particules de sédiment et de les dénombrer sont décrits dans la littérature. Deux étapes semblent indispensables pour obtenir une bonne quantification de ces bactéries : un décrochage des bactéries des particules sans altération des cellules et une optimisation de leur dénombrement.

2.3.1. Techniques de décrochage

Classiquement, les bactéries présentes dans les sédiments peuvent être dénombrées soit par une observation directe au microscope à épifluorescence après coloration par un fluorochrome tel que le Dapi ou l'acridine orange (bactéries totales) soit par une mise en évidence de leur capacité à cultiver (bactéries cultivables).

2.3.1.1. Techniques étudiées lors du dénombrement des bactéries totales

L'observation au microscope des bactéries présentes dans les sédiments n'est possible qu'après une séparation des cellules des particules de sédiments (afin d'éviter le masquage des cellules par ces particules sur les champs du microscope). Aussi, de nombreuses équipes se sont attachées à optimiser le décrochage des bactéries avant leur observation et ont ainsi comparé différents procédés physiques ou chimiques. La technique la plus efficace était l'homogénéisation par broyeur dans les travaux de Dale (1974), de Montagna (1982), de Dye (1983) et de Lindahl et Bakken (1995). Par contre, dans d'autres études, le traitement par ultrasons appliqué seul (Mac Daniel et Capone, 1985) ou en association avec des composés chimiques (Velji et Albright, 1986 et 1993 ; Epstein et Rossel, 1995 ; Lucas *et al.*, 1996 ; Kuwae et Hosokawa, 1999) était plus efficace. Une plus ample description de ces techniques est présentée dans le tableau en annexe I.

2.3.1.2. Techniques étudiées lors du dénombrement des bactéries cultivables

De nombreux travaux portant sur le dénombrement de bactéries cultivables dans des sédiments ont été publiés. Cependant, très peu d'études ont comparé les résultats obtenus par l'application de différentes techniques de décrochage.

Les techniques ci-après ont été appliquées lors des dénombrements des bactéries cultivables telles que les *E. coli* ou les CTT dans les sédiments :

- traitement par sonde à ultrasons par West (1988), Davies *et al.* (1995) et Ferguson *et al.* (1996),
- passage dans une cuve à ultrasons (2 minutes) par Albinger (1993),
- homogénéisation par broyeur pendant 20 s (Erkenbrecher, 1981 ; Shiaris *et al.*, 1987 ; Pettibone, 1992) ou pendant plusieurs minutes (UNEP/WHO, 1995 ; Crabill *et al.*, 1999 ; Skanavi et Yanko, 2001),
- agitation magnétique pendant 2 minutes (Watkins et Burkhart, 1996), agitation vigoureuse pendant 30 minutes sur plaque agitante (Grimes, 1980), ou au vortex pendant 1 minute (Bergstein-Ben Dan et Koppel, 1991 et Bergstein-Ben Dan et Stone, 1992),
- utilisation de composés chimiques : apport de Tween 80 avant homogénéisation par broyeur Waring blender (UNEP/WHO, 1995 ; Skanavis et Yanko, 2001), apport de sodium métaphosphate (Valiela *et al.*, 1991).

L'efficacité de traitements physiques et de composés chimiques pour optimiser le dénombrement de bactéries cultivables dans des sédiments (vases ou vases sableuses) a été également abordée au laboratoire lors d'une précédente étude (Derrien *et al.*, 1992). Au cours de ce travail, seul un composé chimique (le

laurylsulfate de sodium) avait permis d'augmenter légèrement les numérations bactériennes (d'un demi-log) et ceci seulement sur un des sédiments testés.

Cette revue bibliographique souligne **la diversité des protocoles et des temps d'application des traitements décrits dans la littérature** pour décrocher les bactéries des particules avant un dénombrement des bactéries totales ou cultivables dans les sédiments. Elle souligne par ailleurs le manque de consensus sur une méthode efficace pour décrocher les bactéries.

2.3.2. Techniques de numération

Plusieurs techniques permettant de dénombrer les CTT ou les *E. coli* dans les sédiments sont décrites dans la littérature : la technique dite du nombre le plus probable (NPP) en tubes (généralement 3 x 5 tubes), la technique par filtration sur membrane de la suspension de sédiment ou du surnageant obtenu après sédimentation des plus grosses particules et la technique par inclusion en gélose.

2.3.2.1. Technique NPP en tubes

La technique NPP consiste à inoculer un volume donné de l'échantillon à analyser dans un milieu de culture permettant la croissance des bactéries recherchées. Si la bactérie cible est présente, un signal positif est obtenu après le temps d'incubation adéquat et ceci quelque soit le nombre initial de bactéries. L'inoculation de différents volumes de l'échantillon en réplicats permet d'estimer statistiquement la concentration initiale des bactéries dans l'échantillon.

La recherche des CTT par cette technique est réalisée en deux étapes :

- a) par un ensemencement et une incubation d'un milieu présomptif tel que le bouillon à la tryptose et au lauryl sulfate, le bouillon Mac Conkey, ou le bouillon bilié lactosé au vert brillant pendant 48 heures à une température de 35 °C à 37 °C,
- b) puis, par repiquage des tubes positifs dans un milieu confirmatif tel que le bouillon EC incubé pendant 24 h à 44°C (Babinchak *et al.*, 1977 ; Grimes, 1980 ; Erkenbrecher, 1981 ; Doyle *et al.*, 1992 ; Martinez-Manzanares *et al.*, 1992 ; Pettibone, 1992 ; Watkins et Burkhart, 1996 ; Weiskel *et al.*, 1996 ; Skanavis et Yanko, 2001).

Pour la recherche plus spécifique des *E. coli*, certains auteurs apportent du méthylumbelliféryl-glucuronide (MUG, composé devenant fluorescent lors de sa lyse par des bactéries possédant la β -glucuronidase) dans le milieu confirmatif (Watkins et Burkhart, 1996 ; Weiskel *et al.*, 1996). Pettibone (1992) décrit une méthode en une étape permettant d'obtenir les concentrations en *E. coli* en 48 heures en ensemençant directement du bouillon lauryl tryptose contenant du MUG et en l'incubant 48 h à 35 °C.

2.3.2.2. Filtration sur membrane

Cette méthode consiste à filtrer un volume d'échantillon déterminé (suspension de sédiment après décantation ou non des plus grosses particules) à travers une membrane de cellulose stérile de porosité de 0,22 μm ou 0,45 μm . Le filtre sur lequel

les bactéries ont été retenues est ensuite déposé sur un milieu de culture solide spécifique de la bactérie recherchée. Après une incubation à la température souhaitée et pendant un temps donné, les colonies formées sont comptées.

Les suspensions de sédiment peuvent être analysées directement ; dans ce cas, la limite de détection est de $1 \cdot 10^4$ bactéries par 100 g de sédiment fin (vase, argile) et de $1 \cdot 10^3$ bactéries par 100 g de sédiment grossier (sable) (Albinger, 1993). L'analyse peut se faire également après une sédimentation des plus grosses particules pendant un temps variable : 30 secondes (Crabill *et al.*, 1999), 5 à 10 minutes (Ferguson *et al.*, 1996), 10 minutes (Davies *et al.*, 1995 ; Ghinsberg *et al.*, 1991), 30 minutes (Valiela *et al.*, 1991), 1 heure (Grimes, 1980) ou après une centrifugation à 2000 rpm (Marino et Gannon, 1991).

Les CTT sont mis en évidence par filtration sur membrane et dépôt du filtre sur milieu solide tel que la gélose mFC avec ou sans acide rosolique, ou la gélose TTC Tergitol, incubé pendant un temps de 18 à 24 heures à 44 °C (Grimes, 1980 ; Shiaris *et al.*, 1987 ; West, 1988 ; Bergstein-Ben Dan et Koppel, 1991 ; Gauthier *et al.*, 1991, Ghinsberg *et al.*, 1991 ; Bergstein-Ben Dan et Stone, 1992 ; Marino et Gannon, 1991 ; Davies *et al.*, 1995 ; Ferguson *et al.*, 1996).

Certains auteurs recommandent, au préalable, une incubation des bactéries sur milieu riche non sélectif (trypticase soja avec 0,1 % d'extrait de levure) pendant 3 heures à 37 °C (West, 1988) ou 4 heures à 35 °C (Davies *et al.*, 1995).

Pour la recherche spécifique de *E. coli*, la détection de la β -glucuronidase à partir des colonies de CTT sur le milieu mFC a été retenue par Gauthier *et al.* (1991) et Ghinsberg *et al.* (1991). Cette technique consiste à incuber les filtres sur un milieu contenant du méthylumbelliféryl-glucuronide (MUG) pendant 3 à 4 heures à 36 °C et à mesurer ensuite la fluorescence émise par la méthylumbelliférone produite lors de la lyse du MUG.

2.3.2.3. Incorporation en gélose

Une autre technique décrite pour l'analyse des CTT dans les sédiments consiste à placer un millilitre de la dilution appropriée de la suspension de sédiment dans une boîte de Pétri puis à le recouvrir de milieu mFC liquéfié. Le milieu gélosé est ensuite incubé pendant 24 heures à 44 °C (UNEP/WHO, 1995).

2.3.2.4. Autres techniques

D'autres techniques sont utilisées pour dénombrer les *E. coli* dans les eaux telles que la technique NPP miniaturisée (Hernandez *et al.*, 1991) mais aucune étude, à notre connaissance, n'a décrit l'utilisation de cette technique pour l'analyse bactérienne des sédiments.

Cette revue bibliographique montre la diversité des protocoles existants pour dénombrer les bactéries fécales dans les sédiments aussi bien au niveau des techniques de décrochage que des techniques de numération.

3. Etude d'optimisation d'une technique de mise en évidence des bactéries fécales dans les sédiments

Dans cette étude, nous nous sommes attachés à optimiser la mise en évidence et le dénombrement des *E. coli* ou des CTT dans des sédiments vaseux.

3.1. Matériels et méthodes

3.1.1. Collecte du sédiment

Les principaux sédiments étudiés étaient des sédiments vaseux superficiels (0 - 2 cm) de la rivière de Morlaix (Finistère) près de l'écluse ou de la Penzé (Finistère) en sortie de la station d'épuration de Saint-Pol de Léon. Ils ont été prélevés à marée basse lorsqu'ils étaient découverts. D'autres sédiments provenaient d'endroits différents de la rivière de Morlaix (St François, Lannuguy) ou du bassin à flot de Morlaix. Les sédiments découverts ont été prélevés au moyen de spatules ou de cuillères stériles et les sédiments immergés par carottage. Ces prélèvements ont été placés dans des récipients stériles et transportés vers le laboratoire dans une glacière. Les analyses ont été effectuées dans les 24 heures qui ont suivies les prélèvements.

On fait l'hypothèse de départ que les bactéries sont réparties de façon homogène dans la couche superficielle de sédiment échantillonnée.

3.1.2. Préparation des dilutions

Les sédiments ont été homogénéisés par agitation manuelle à l'aide d'une spatule stérile avant leur utilisation.

Pour la comparaison des différentes techniques de décrochage, les sédiments ont été dilués au 1/2 dans du tryptone sel (tryptone 1 g l⁻¹, NaCl 8,5 g l⁻¹) ou dans un mélange chimique (voir ci-après pour sa composition). Le choix d'une dilution au 1/2 (plutôt qu'une dilution au 1/10) a été retenu afin de diminuer le seuil de détection des bactéries sur milieu solide.

Pour la comparaison des techniques de numération, les sédiments ont été dilués au 1/2 dans le diluant stérile approprié (tryptone sel, eau distillée ou diluant spécial pour microplaque, DSM) ou au 1/10 dans du tryptone sel pour la technique NPP en tubes.

3.1.3. Les traitements de décrochage

Lors de la comparaison des techniques de décrochage, les procédés suivants ont été testés :

- agitation au vortex à la vitesse maximale pendant 30 s (témoin) ou 5 minutes,
- homogénéisation par broyeur Waring blender à la vitesse de 22 000 tours min⁻¹ pendant 1 minute (3 cycles de 20 s avec des arrêts d'une minute pour éviter l'échauffement) ou 3 minutes (3 cycles d'une minute avec des arrêts de 5 minutes à 4 °C),

- utilisation d'une sonde à ultrasons (20 kHz, diamètre de la sonde : 17,5 mm) à la puissance de 200 W en mode alternatif avec des pulses de 50 % pendant 1, 3 ou 6 minutes (en présence de glace),
- incubation dans un mélange chimique. Le sédiment a été, dans ce cas, dilué au 1/2 dans un mélange contenant 1 g l⁻¹ de désoxycholate de sodium, détergent non dénaturant, 25 g l⁻¹ de polyéthylène glycol (PEG 8000) et de 200 g l⁻¹ de chelex 100, résine échangeuse d'ions qui permet de remplacer les ions polyvalents par des ions sodium et augmente ainsi la dispersion (protocole adapté de Herron et Wellington, 1990 et de Lucas *et al.*, 1996). La suspension a été homogénéisée à température ambiante sous agitation magnétique pendant 30 minutes. Des essais ont été également réalisés avec le même mélange chimique mais avec une concentration en chelex 10 fois plus faible ou avec une incubation de 2 heures à 4 °C (temps susceptible de permettre une action dispersante plus complète de la chelex ; Mac Donalds, 1986) au lieu de 30 minutes à température ambiante,
- incubation dans le mélange chimique décrit ci-dessus puis traitement aux ultrasons (en mode alternatif) pendant 3 minutes.

Lors de la comparaison des techniques de numération, les suspensions de sédiment ont été homogénéisées par une agitation de 5 minutes au vortex à la vitesse maximale.

3.1.4. Analyses sur la suspension totale ou le surnageant

L'efficacité des différents traitements de décrochage a été étudiée sur la suspension totale de sédiment ou sur le surnageant obtenu après une centrifugation à 500 g pendant 2 ou 5 minutes, ou après une sédimentation d'une heure. Le but de ces opérations était d'éliminer les plus grosses particules par décantation et donc de faciliter la lecture tout en limitant la perte en bactéries.

L'efficacité des techniques de numération a été évaluée sur la suspension de sédiment totale ou sur le surnageant obtenu après une centrifugation à 500 g de 2 minutes.

3.1.5. Dénombrement des bactéries

Pour évaluer l'efficacité des techniques de décrochage, les bactéries présentes dans les sédiments ont été dénombrées sur milieu solide (gélose Mac Conkey). Cette technique de numération, retenue en raison de sa facilité d'utilisation, de sa rapidité de mise en œuvre, et de son coût, a permis de comparer un plus grand nombre de techniques et de réaliser des réplicats.

La gélose Mac Conkey incubée à 44,5 °C permet de dénombrer les coliformes thermotolérants. Un volume de 0,2 ml de la dilution au demi (suspension totale ou surnageant après centrifugation) (limite de détection : 1 10³ /100 g de sédiment) ou de 0,1 ml de la dilution au 1/10 (limite de détection : 1 10⁴ /100 g) a été étalé sur cette gélose. Les boîtes ont été incubées 24 heures à 44,5 °C et lues en comptabilisant les colonies rouges lactose positif.

Pour évaluer l'efficacité des techniques de numération, les techniques ci-dessous ont été appliquées :

- Etalement sur géloses solides Mac Conkey, TTC Tergitol (d'après la norme NF T90-414 pour les eaux) ou TBX et incubation 24 heures à 44,5 °C. Les bactéries fermentant le lactose sont dénombrées sur les géloses Mac Conkey et TTC Tergitol. Les bactéries possédant la β -glucuronidase sont dénombrées sur la gélose TBX : formation d'un précipité bleu par lyse d'un substrat chromogène, l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronique (BCIG).
- Filtration sur membrane stérile avec une porosité de 0,22 μ m et dépôt du filtre sur gélose Mac Conkey ou TBX incubée 24 heures à 44,5 °C.
- Ensemencement en milieu liquide bilié lactosé au vert brillant (BLBVB) 3 x 5 tubes (d'après la norme NF T90-413 pour les eaux). Le bouillon BLBVB est utilisé comme milieu présomptif avec une incubation de 48 h à 37 °C. Ce même milieu et une eau peptonée ensemencés et incubés 24 heures à 44 °C sont utilisés comme milieux confirmatifs ; la recherche de l'indole se faisant en ajoutant du réactif de Kovacs dans les tubes d'eau peptonée.
- Ensemencement en milieu liquide en microplaque (MU/Ec) (d'après la norme NF T90-433 pour les eaux). Les bactéries possédant l'enzyme β -glucuronidase, pouvant cliver le méthylumbelliféryl- β -glucuronide (MUG), ont été mises en évidence par observation de la formation de 4-méthylumbelliférone (composé fluorescent) à l'obscurité sous lampe UV à 366 nm (Hernandez *et al.*, 1991).

Afin d'avoir un élément comparatif entre les différents essais, les bactéries fécales ont été dénombrées par étalement des suspensions de sédiment sur gélose Mac Conkey lors de chaque expérience.

3.1.6. Description des différentes expérimentations

3.1.6.1. Comparaison des techniques de décrochage

Quatre expérimentations ont été réalisées afin de déterminer la technique de décrochage la plus adaptée pour dénombrer les bactéries dans des sédiments vaseux. Elles sont présentées ci-après sous forme de tableau, les caractères en gras étant les paramètres modifiés par rapport à l'expérimentation précédente.

3.1.6.1.1 Première expérimentation (décrochage 1, Morlaix)

Au cours de cette expérimentation, sept traitements différents ont été appliqués : vortex, broyeur Waring blender (WB, 2 temps d'application), sonde à ultrasons (US, 2 temps d'application), incubation dans le mélange chimique suivie ou non d'un traitement par US. Les concentrations bactériennes ont été déterminées par une analyse des suspensions totales de sédiment (ST) ou des surnageants (surn) obtenus par sédimentation (sédim) ou centrifugation (cent) à 500 g pendant 5 minutes.

Sédiment	Diluant	Traitements	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Technique de numération pour chaque suspension
Morlaix écluse	Trytone sel	Vortex WB 1 min WB 3 min US 3 min US 6 min	ST Surn cent 5 min Surn sédim 1 h	Mac Conkey (x 3)
	Mél chimique	Incub 30 min Incub 30 min + US 3 min		

3.1.6.1.2 Deuxième expérimentation (décrochage 2, Morlaix)

Dans cette expérimentation, huit traitements différents ont été appliqués et chaque traitement a été répliqué trois fois. Les concentrations bactériennes ont également été déterminées par analyse des suspensions totales et des surnageants obtenus cette fois par une centrifugation à 500 g pendant 2 minutes.

Sédiment	Diluant	Traitements	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Technique de numération pour chaque suspension
Morlaix écluse	Trytone sel	Vortex 30s (x 3) Vortex 5 min (x 3) WB 1 min (x 3) WB 3 min (x 3) US 3 min (x 3) US 6 min (x 3)	ST Surn cent 2 min	MacConkey (x 3)
	Mél chimique	Incub 30 min (x 3) Incub 30 min + US 3 min (x 3)		

3.1.6.1.3 Troisième expérimentation (décrochage 3, St Pol de Léon)

Le sédiment étudié au cours de cette expérimentation provenait d'un endroit différent (Saint Pol de Léon, à la sortie de la station d'épuration). Dans cette expérimentation, le traitement chimique a été étudié également avec une concentration 10 fois plus faible en chelex.

Sédiment	Diluant	Traitements	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Technique de numération pour chaque suspension
St Pol de Léon	Trytone sel	Vortex 30s (x 3) Vortex 5 min (x 3) WB 1 min (x 3) WB 3 min (x 3) US 3 min (x 3) US 6 min (x 3)	ST Sum cent 2 min	MacConkey (x 3)
	Mél chimique	Incub 30 min (x 3) Incub 30 min + US 3 min (x 3)		
	Mél chimique avec [chelex] 10 fois + faible	Incub 30 min (x 3) Incub 30 min + US 3 min (x 3)		

3.1.6.1.4 Quatrième expérimentation (décrochage 4, St Pol de Léon)

Au cours de cette expérimentation, des essais ont été conduits également avec un temps plus court d'application des US et une plus longue incubation des sédiments dans le mélange chimique susceptible de permettre une action dispersante plus complète de la chelex.

Sédiment	Diluant	Traitements	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Technique de numération pour chaque suspension
St Pol de Léon	Trytone sel	Vortex 30s (x 3) Vortex 5 min (x 3) WB 1 min (x 3) WB 3 min (x 3) US 1 min (x 3) US 3 min (x 3)	ST Surn cent 2 min	Mac Conkey (x 3)
	Mél chimique	Incub 30 min (x 3) Incub 2 heures (x 3)		

3.1.6.2. Comparaison des techniques de numération

Cinq expérimentations ont été réalisées afin de déterminer la technique de numération la plus adaptée pour dénombrer les bactéries d'origine fécale dans les sédiments étudiés.

3.1.6.2.1 Première expérimentation (numération 1, Morlaix)

Les concentrations en bactéries fécales de quatre sédiments prélevés sur le site de Morlaix ont été déterminées par trois techniques de numération différentes.

Sédiment	Diluant	Traitement	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Techniques de numération pour chaque suspension				
Ecluse	Trytone sel (dilution 1/10)	Vortex 5 minutes	ST	NPP BLBVB (x 3)				
St François								
Lannuguy					Trytone sel (dilution au 1/2)	Vortex 5 minutes	ST	Mac Conkey (x 3)
Bassin					DSM (dilution au 1/2)	Vortex 5 minutes	ST	Microplaque (x 3)

3.1.6.2.2 Deuxième expérimentation (numération 2, Morlaix)

Sédiment	Diluant	Traitement	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Techniques de numération pour chaque suspension
Morlaix écluse (x 3)	Trytone sel (dilution 1/10)	Vortex 5 minutes	ST Surn cent 2 min	NPP BLBVB (x 3)
	Trytone sel (dilution 1/2)	Vortex 5 minutes	ST Surn cent 2 min	Mac Conkey (x 3) TTC Tergitol (x 3)
	DSM (dilution 1/2)	Vortex 5 minutes	ST Surn cent 2 min	Microplaque (x 3)

Au cours de cette expérimentation, trois échantillons d'un même sédiment ont été analysés. Sur chaque d'entre eux, les concentrations bactériennes ont été déterminées par quatre techniques de numération appliquées sur les suspensions totales de sédiment ou sur les surnageants après centrifugation.

3.1.6.2.3 Troisième expérimentation (numération 3, Morlaix)

Trois échantillons d'un sédiment de la même origine que l'expérience précédente ont été analysés. Sur chacun d'entre eux, les concentrations bactériennes ont été déterminées par trois techniques de numération.

Sédiment	Diluant	Traitement	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Techniques de numération pour chaque suspension
Morlaix écluse (x 3)	Trytone sel (dilution au 1/2)	Vortex 5 minutes	ST Surn cent 2 min	Mac Conkey (x 3) TTC Tergitol (x 3)
	DSM (dilution au 1/2)	Vortex 5 minutes	ST Surn cent 2 min	Microplaque (x 3)

3.1.6.2.4 Quatrième expérimentation (numération 4, Morlaix et St Pol de Léon)

Sédiment	Diluant	Traitements	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Techniques de numération pour chaque suspension
Morlaix Ecluse (x 3)	Tryptone sel (dilution au ½)	Vortex 5 minutes	ST	Mac Conkey (x 4) TBX (x 4)
			Surn cent 2 min	
St Pol de Léon (x 3)	DSM (dilution au ½)	Vortex 5 minutes	ST	Microplaque (x 4)
			Surn cent 2 min	

Deux sédiments provenant de Morlaix et de Saint Pol de Léon ont été analysés. Trois techniques de numérations ont été appliquées : étalement sur milieu solide, gélose Mac Conkey (CTT) ou gélose TBX (*E. coli*) et ensemencement de microplaques.

3.1.6.2.5 Cinquième expérience (numérations 5, Morlaix et St Pol de Léon)

Sur des sédiments provenant de Morlaix et de Saint-Pol de Léon, les concentrations bactériennes ont été déterminées par étalement sur milieu solide : gélose Mac Conkey ou gélose TBX, par filtration sur membrane et dépôt des membranes sur ces milieux solides et par ensemencement de microplaques opaques (Biokar) ou transparentes (Biorad).

Sédiment	Diluant	Traitement	Suspensions étudiées pour chaque traitement	Techniques de numération pour chaque suspension
Morlaix écluse	Tryptone sel (dilution au ½)	Vortex 5 minutes	ST	Etalement - Mac Conkey (x 3) - TBX (x 3)
			Surn cent 2 min	
St Pol de Léon	ED ou DSM	Vortex 5 minutes	ST	Filtration sur membrane - Mac Conkey (x 3) - TBX (x 3)
			Surn cent 2 min	

3.1.7. Caractérisation sédimentologique et chimique des sédiments

Pour chaque expérimentation, des aliquots de sédiments ont été séchés pendant 8 jours à 60 °C. Les piluliers ont été pesés vides, remplis de sédiment humide, puis après un séjour de huit jours à 60° C et un refroidissement au dessiccateur. Ce traitement a permis de déterminer le poids sec (Ps) du sédiment et sa teneur en eau (Te).

Le pourcentage de poids sec a été déterminé selon le calcul suivant :

$$\begin{aligned} P_s &= M_{\text{sed sec}} \times 100 / M_{\text{sed humide}} \\ &= M_s \times 100 / M_h \end{aligned}$$

La teneur en eau a été déterminée par l'équation suivante :

$$T_e = M_e \times 100 / M_s$$

avec M_e : masse de l'eau évaporée et M_s : masse du matériel solide

La concentration des dépôts (ρ_d) a été établie en se rapportant au sédiment humide total selon l'équation suivante :

$$\rho_d = (M_s + M_e) / V$$

avec V : volume du pilulier (24,5 ml)

Des analyses granulométriques ont été réalisées sur des sédiments conservés à 4 °C. La répartition des particules des surnageants ou des culots obtenus après une centrifugation à 500 g pendant 2 minutes des suspensions de sédiment au 1/2 a également été déterminée au cours de certains essais. Une partie des analyses a été réalisée au moyen d'un granulomètre laser Cilas HR 850B (analyse de la fraction inférieure à 500 μm). Dans ce cas, les sédiments ont été préfiltrés à 500 μm (tamisage par voie humide) afin d'éliminer les fragments organiques (végétaux, fibres...) ou métalliques millimétriques, puis remis en suspension par agitation durant 15 minutes. Afin d'évaluer la fraction supérieure à 500 μm , les derniers sédiments (numération 5, Morlaix et St Pol de Léon) ont été tamisés à 500 μm et séchés à l'étuve avant leur analyse par granulomètre laser. Dans ce cas, la fraction supérieure à 500 μm (refus de tamis) correspondait à 2,93 % de la masse sèche totale pour le sédiment provenant de Morlaix et à 2,2 % pour le sédiment de St Pol de Léon.

Une autre partie des analyses a été réalisée sur le granulomètre Beckman Coulter (décrochage 3 et 4, St Pol de Léon ; granulomètre laser non disponible). Dans ce cas, l'analyse granulométrique a eu lieu sur la fraction de 0 à 2000 μm .

Pour l'analyse du carbone organique total, des aliquots de sédiment ont été congelés à - 20 °C puis lyophilisés. Le carbone organique a été dosé par la méthode de Cauwet (1975) avec une décarbonatation des échantillons par l'acide orthophosphorique avant dosage au CHN.

3.1.8. Analyse des données

Chaque traitement et chaque analyse ont été réalisés 3 fois sauf indication contraire. Les dilutions au 1/2 ou au 1/10 ont été obtenues en prenant x g de sédiment pour x ml de tryptone sel, d'eau distillée ou de DSM (dilution 1/2, poids / volume) ou pour 9 x ml de tryptone sel (dilution au 1/10, poids / volume). Pour les dilutions successives de sédiment, des volumes appropriés de suspension de sédiment ont été prélevés.

Pour connaître la concentration de bactéries par 100 g de sédiment humide, un facteur correcteur est appliqué pour tenir compte de la différence de poids volumique entre le sédiment et le diluant. Toutefois, l'influence sur la numération est faible (environ de 0,03 à 0,07 U. Log pour les dilutions au 1/2).

Les résultats ont été exprimés par 100 g de sédiment humide et transformés en unités logarithmiques. Des analyses de variance ont permis de montrer si les concentrations en bactéries fécales obtenues après application des techniques de décrochage ou de numération étaient significativement différentes. Une procédure de comparaison multiple (multiple range test) a été utilisée pour déterminer les méthodes significativement différentes. Les traitements statistiques ont été effectués au moyen du logiciel Statgraphics Plus 3.1 (Manugistics Inc., Rockville, USA).

L'équivalence entre le poids humide et le poids sec du sédiment ayant été déterminée, les résultats peuvent également être exprimés par 100 g de sédiment sec après conversion du nombre de bactéries par 100 g de sédiment humide.

3.2. Résultats et discussion

3.2.1. Les techniques de décrochage

La première partie du travail a consisté à comparer l'efficacité de différentes techniques, décrites dans la littérature, susceptibles de décrocher les bactéries des particules de sédiment.

La capacité de la technique étudiée à améliorer le dénombrement des coliformes dans la suspension de sédiment dépend, à la fois, de sa propriété à décrocher les bactéries et de son absence de toxicité sur la cellule bactérienne. Ainsi, lors du dénombrement des bactéries dans les sédiments, une sous-estimation de la population présente peut être observée par la présence à la fois de bactéries endommagées par les traitements et de bactéries non suffisamment détachées des particules.

L'efficacité des techniques de décrochage a été comparée sur quatre sédiments différents selon deux critères : les plus fortes concentrations bactériennes obtenues et la plus faible variabilité des résultats.

3.2.1.1. Analyse chimique et granulométrique des sédiments

Ces sédiments provenaient de deux localisations différentes, soit de St Pol de Léon soit de Morlaix.

Les sédiments de St Pol de Léon étaient relativement pauvres en matière organique pour leur localisation (en sortie de station d'épuration) ; la teneur en carbone

organique total (COT) variait de 2,26 à 2,28 % (tab. I). La teneur en eau était faible (de 68 à 77 %).

La concentration des dépôts était importante (de 1482 à 1541 kg.m⁻³).

L'analyse granulométrique de la fraction de 0 à 2 mm (spectres en annexe II) a montré un diamètre médian des particules d'environ 62 µm pour ces sédiments avec la répartition suivante :

- 4,9 et 5,3 % des particules inférieures à 4 µm : argiles granulométriques,
- 48,9 et 49,1 % des particules comprises entre 4 et 63 µm : silts (de très fins à grossiers),
- 46,2 et 45,65 % des particules supérieures à 63 µm : sables.

Les sédiments de Morlaix étaient plus riches en matière organique. Une concentration en COT de 4,22 % a été obtenue pour l'un d'entre eux (tab. I). La teneur en eau était beaucoup plus importante (179 et 184 %) et la concentration des dépôts plus faible (de 1192 à 1277 kg. m⁻³).

Des analyses ont eu lieu également sur des surnageants obtenus par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes des suspensions de sédiment. Cette opération a ainsi permis d'obtenir des suspensions moins riches en particules. Une analyse granulométrique des particules présentes dans les surnageants (sédiments de St Pol de Léon, voir spectres en annexe II) a montré un diamètre médian des particules variant de 1,7 à 4,15 µm avec aucune particule de diamètre supérieur à 63 µm dans ces surnageants (tab. I).

Expérience	COT (%)	Poids sec (%)	Teneur en eau (% / sec)	Concentration (kg.m ⁻³)	Diamètre médian (µm)	Diamètre maximum (µm)	Localisation
Sédiment 1	ND	35,80	179	1192	ND	ND	Morlaix
Sédiment 2	4,22	35,23	184	1277	ND	ND	Morlaix
Sédiment 3 Surn. 3	2,28	56,45	77	1482	61,99 4,15	63	St Pol de Léon
Sédiment 4 Surn. 4	2,26	59,48	68	1541	62,82 1,71	< 60	St Pol de Léon

Tableau I : Caractéristiques des sédiments utilisés lors des essais de comparaison des techniques de décrochage. Surn : surnageant obtenu après agitation au vortex pendant 5 minutes de la suspension au ½ et centrifugation à 500 g pendant 2 minutes ; COT : teneur en carbone organique total ; les diamètres médians et maximaux ont été obtenus lors d'une analyse granulométrique de la fraction des particules inférieures à 2 mm ; ND : non déterminé.

3.2.1.2. Première expérimentation (décrochage 1, Morlaix)

Les résultats obtenus sur le premier sédiment analysé sont présentés sur la figure 1. La concentration moyenne en CTT du sédiment (Morlaix, écluse) était de $7 \cdot 10^4/100$ g de sédiment humide (moyenne géométrique, vortex, $n = 3$).

Lors de l'analyse des suspensions totales de ce sédiment, aucune technique n'a permis d'augmenter sensiblement le nombre de bactéries mis en évidence dans le sédiment par rapport à la simple agitation au vortex. La plus faible variation entre les concentrations obtenues par chaque traitement a été observée lors de l'application des ultrasons (3 minutes).

Lors de l'analyse des surnageants obtenus par une centrifugation de 5 minutes à 500 g ou une sédimentation d'une heure des suspensions, des concentrations généralement plus faibles ont été obtenues. L'utilisation du mélange chimique a conduit aux plus fortes concentrations mais qui restent cependant inférieures à celles obtenues sur les suspensions totales. Ce traitement chimique a permis, toutefois, de diminuer la variabilité des résultats.

La décantation de la suspension de sédiment, dans le cas présent (dilution au demi, sédiment vaseux), ne s'est pas avérée être une technique adéquate pour ce sédiment (Morlaix, écluse). Les particules ont sédimentées très lentement ; au bout d'une heure, seule une faible quantité de surnageant était obtenue. La centrifugation à 500 g avec un temps court, 2 minutes (au lieu de 5), pourrait être un meilleur compromis entre l'élimination des particules de sédiment et la limitation de la perte en bactéries.

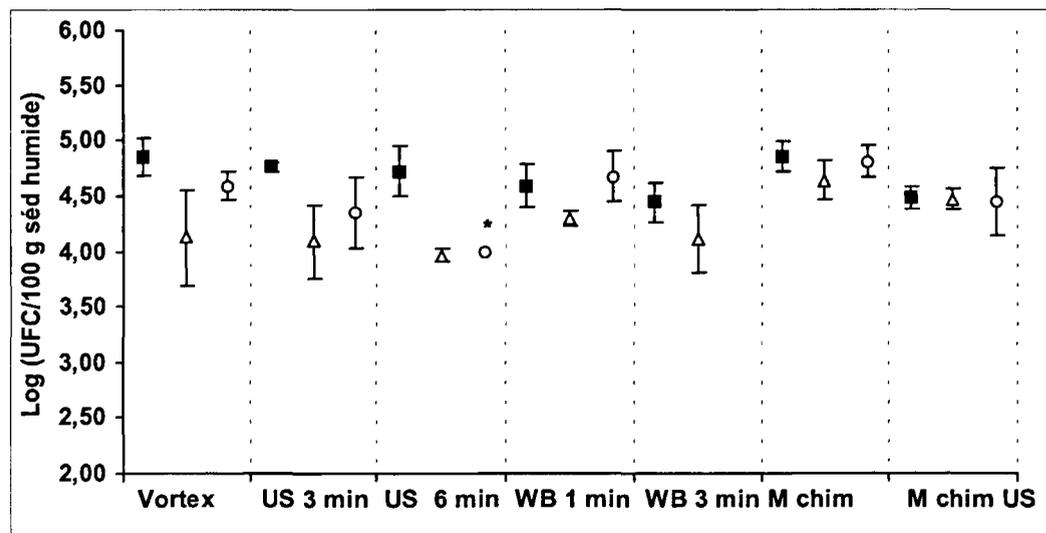


Figure 1 : Influence de la technique de décrochage sur les concentrations en CTT du sédiment de Morlaix obtenues sur gélose Mac Conkey (décrochage 1, Morlaix) : analyse à partir des suspensions totales (■), des surnageants après centrifugation 5 minutes à 500 g (Δ), des surnageants après sédimentation d'une heure (○) ; moyenne de 3 analyses et écart-type, * moyenne de 2 valeurs ; US : traitement par sonde à ultrasons, WB : traitement par broyeur Waring Blender, M chim : traitement chimique (incubation pendant 30 minutes).

3.2.1.3. Deuxième expérimentation (décrochage 2, Morlaix)

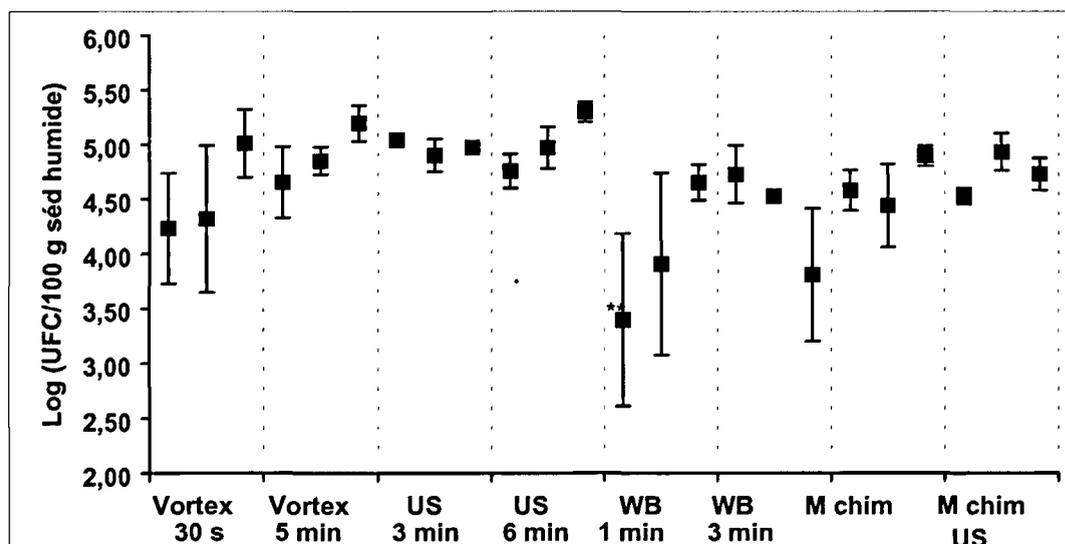
Au cours de cette expérimentation, un sédiment provenant du même endroit a été analysé après application des mêmes techniques que précédemment mais cette fois chaque procédé a été testé trois fois.

Lors de l'analyse des suspensions totales de sédiment, les plus fortes concentrations ont été obtenues par les traitements par ultrasons et par vortex (5 minutes) (moyennes de 5 à 4,9 U. Log). Les plus faibles variations sur les résultats ont été observées pour les suspensions traitées aux US (3 minutes) en présence ou non de composés chimiques (fig. 2a).

Lors des analyses à partir des surnageants, les plus fortes concentrations ont été également obtenues par les traitements aux US et au vortex (5 minutes) (moyenne de 5,1 à 4,9 U. Log). Sans diminuer sensiblement les concentrations bactériennes obtenues, l'analyse des surnageants a permis, ici, de diminuer la variabilité des résultats, les plus faibles variations étant observées pour les traitements par US et par incubation dans les mélanges chimiques (fig 2b).

La centrifugation à 500 g pendant 2 minutes semble donc être une technique intéressante pour limiter la charge particulaire sans diminuer sensiblement la charge bactérienne.

a) suspension totale de sédiment



b) surnageant après centrifugation à 500 g pendant 2 minutes

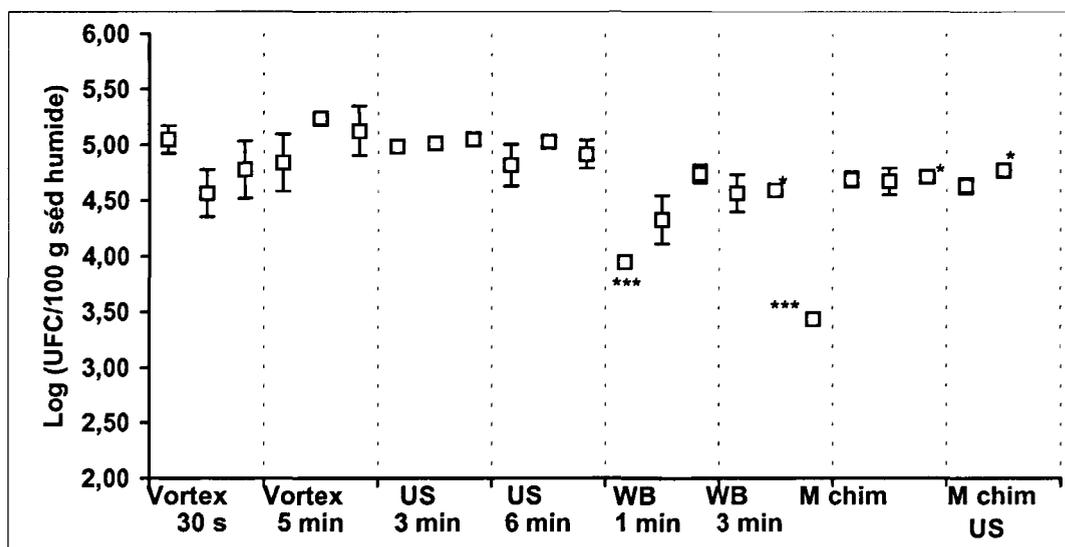
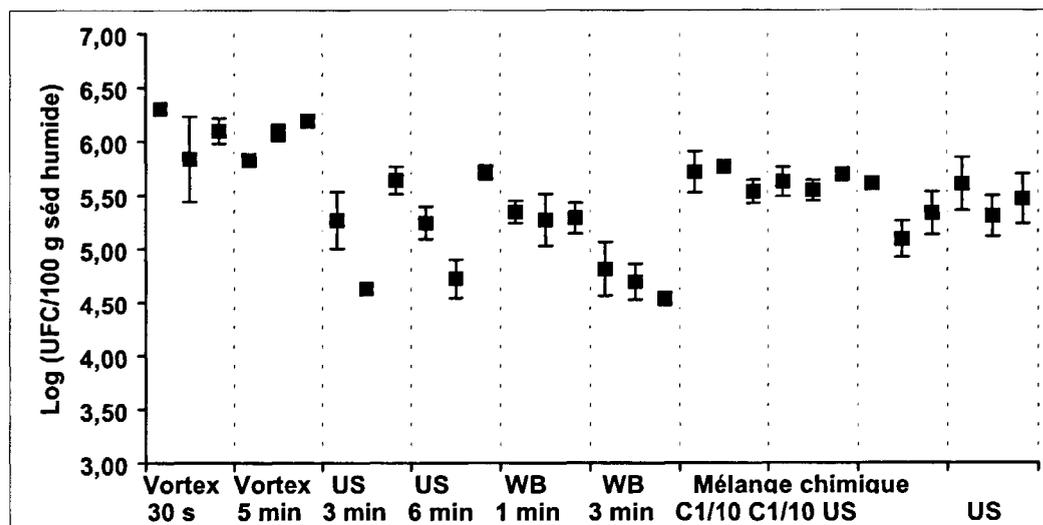


Figure 2 : Influence de la technique de décrochage sur les concentrations en CTT du sédiment de Morlaix obtenues sur gélose Mac Conkey (décrochage 2, Morlaix) : a) analyse sur la suspension totale, b) sur le surnageant après centrifugation 2 minutes à 500 g ; moyenne de 3 analyses et écart-type, * moyenne de 2 valeurs ; ** 3 valeurs dont 2 < limite de détection, *** 3 valeurs dont 1 < limite de détection ; US : traitement par sonde à ultrasons, WB : traitement par broyeur Waring Blender, M chim : incubation pendant 30 minutes dans le mélange chimique.

3.2.1.4. Troisième expérimentation (Décrochage 3, St Pol de Léon)

Au cours de cette expérimentation, le sédiment étudié provenait de St Pol de Léon. Il était plus contaminé en CTT que les sédiments analysés précédemment : la concentration moyenne était de $1 \cdot 10^6$ / 100 g de sédiment humide (moyenne géométrique, vortex, n = 9).

a) suspension totale de sédiment



b) surnageant après centrifugation 500 g 2 minutes

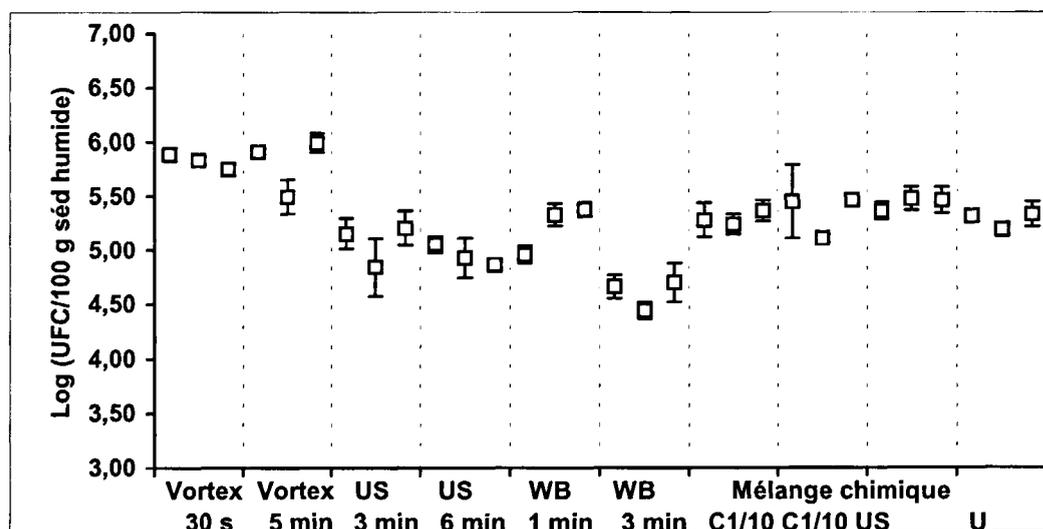


Figure 3 : Influence de la technique de décrochage sur les concentrations en CTT du sédiment de St Pol de Léon obtenues sur gélose Mac conkey (décrochage 3, St Pol de Léon) : a) analyse sur la suspension totale, b) sur le surnageant après centrifugation 2 minutes à 500 g ; moyenne de 3 analyses et écart-type ; US : traitement par sonde à ultrasons, WB : traitement par broyeur Waring Blender, le mélange chimique a été testé à deux concentrations de chelex : C, concentration habituelle, C1/10, concentration dix fois plus faible, et en présence ou non d'US.

Lors de l'analyse des suspensions totales, les plus fortes concentrations ont été obtenues par les traitements par vortex (30 secondes et 5 minutes, moyennes respectivement de 6,1 et 6 U. Log). Le fait de diminuer la concentration en chelex (d'un facteur de 1 à 1/10) n'a pas augmenté sensiblement les concentrations bactériennes obtenues par le mélange chimique mais a toutefois permis de diminuer la variabilité des résultats. Une faible variabilité a été également obtenue par les traitements par WB (1 minute) et par vortex (5 minutes).

L'analyse à partir des surnageants montre une efficacité similaire des traitements avec toutefois des concentrations légèrement inférieures et une plus faible variabilité des résultats (fig. 3b). Les plus fortes numérations ont été obtenues par agitation au vortex (30 secondes et 5 minutes ; moyenne 5,8 U. Log) et les plus faibles variations par l'application du vortex (30 secondes) et par l'utilisation des mélanges chimiques (les plus concentrés en chelex).

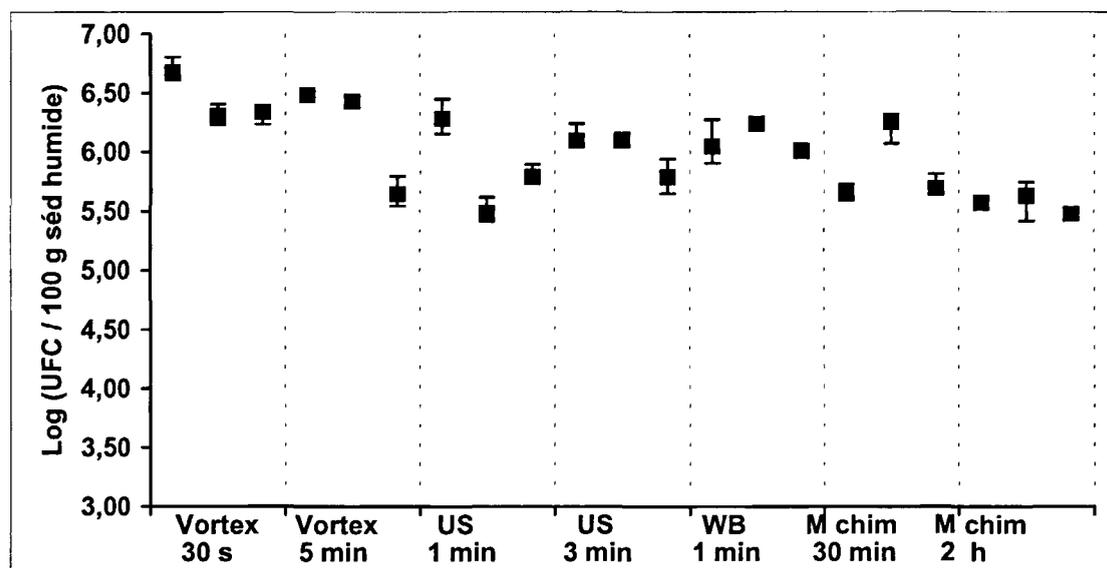
3.2.1.5. Quatrième expérimentation (décrochage 4, St Pol de Léon)

Dans cette expérimentation, seuls les traitements précédents les plus efficaces ont été retenus : vortex, broyeur WB (1 minute), US (3 minutes) et mélange chimique. Un plus faible temps d'application des ultrasons (1 minute) et une plus longue incubation du sédiment dans le mélange chimique ont été également testés.

Lors de l'analyse des suspensions totales, les plus fortes concentrations ont été obtenues par les traitements par vortex (30 secondes et 5 minutes, moyennes respectivement de 6,35 et 6,1 U. Log) et par broyeur WB (1 minute) (moyenne de 6 U. Log). Les plus faibles variabilités ont été observées lors de l'incubation des sédiments dans le mélange chimique pendant 2 heures et lors de l'utilisation du vortex (30 secondes) ou du broyeur WB (1 minute).

Lors de l'analyse à partir des surnageants, des concentrations plus faibles ont été obtenues avec également les numérations les plus élevées par les traitements au vortex et au broyeur WB (1 minute) (moyennes de 6 à 5,9 U. Log). Les plus faibles variations ont été obtenues par l'utilisation des US (1 et 3 minutes), du vortex (5 minutes) et du WB (1 minute).

a) suspension totale de sédiment



b) surnageant après centrifugation 500 g 2 minutes

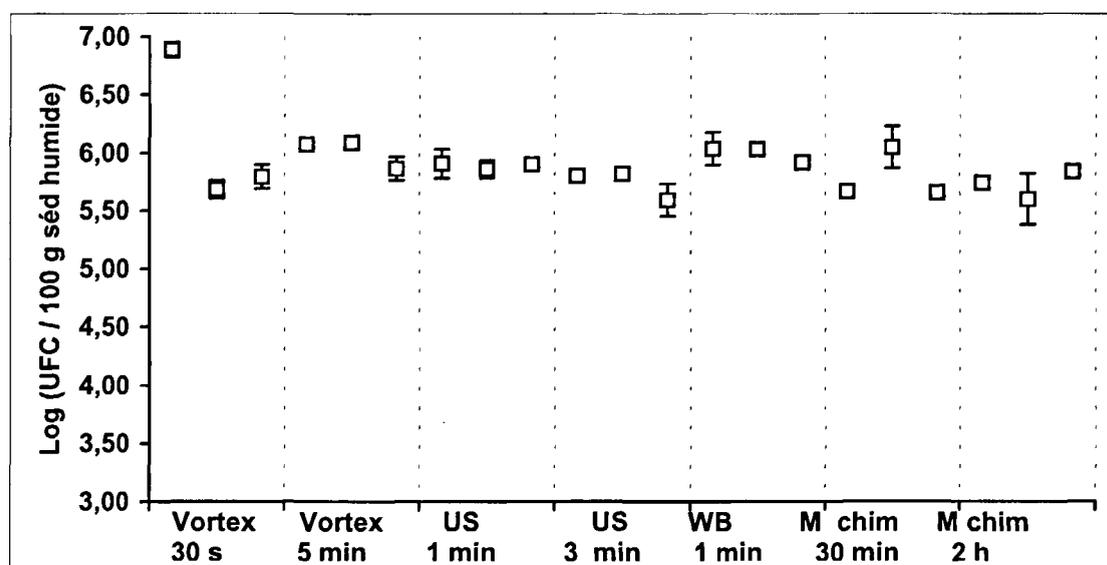


Figure 4 : Influence de la technique de décrochage sur les concentrations en CTT du sédiment de St Pol de Léon obtenues sur gélose Mac Conkey (décochage 4, St Pol de Léon) : a) analyse sur la suspension totale, b) sur le surnageant après centrifugation 2 minutes à 500 g ; moyenne de 3 analyses et écart-type ; US : traitement par sonde à ultrasons, WB : traitement par broyeur Waring Blender, M chim : incubation dans le mélange chimique pendant 30 minutes ou pendant 2 heures.

3.2.1.6. Synthèse des différentes expérimentations et discussion sur les techniques de décrochage

Les résultats obtenus dans cette partie de l'étude ont montré que les techniques de décrochage appliquées sur les suspensions de sédiment avaient une influence importante sur les concentrations bactériennes obtenues et qu'il est difficile de disposer d'une technique qui permette, à la fois, d'obtenir les plus fortes concentrations bactériennes et les résultats les plus reproductibles sur différents sédiments.

Lors d'une analyse des suspensions totales, la technique par vortex (surtout pour un temps d'application de 5 minutes) a permis d'obtenir, le plus souvent, les plus fortes numérations (tab. II). Le mélange chimique (exp. 1), les traitements par US (3 et 6 minutes ; exp. 2) et le traitement par broyeur WB (1 minute ; exp. 4) ont conduit également aux concentrations parmi les plus élevées mais seulement pour une expérimentation sur les quatre.

L'analyse des surnageants, obtenus après une centrifugation à faible vitesse (500 g, 2 minutes) des suspensions, où seules les particules fines de diamètre inférieur à 63 µm étaient présentes, a montré des résultats sensiblement identiques (tab. II), la technique par vortex conduisant également le plus souvent aux plus fortes concentrations.

Le critère consistant à prendre en compte la plus faible variabilité des résultats ne nous a pas permis, par contre, de choisir plus spécifiquement une technique plutôt qu'une autre ; en effet, les résultats obtenus étaient différents d'une expérimentation à l'autre aussi bien lors d'une analyse des suspensions totales que lors de celle des surnageants. De plus, au cours de chaque expérimentation, des variations dans les concentrations ont été observées lors de l'application de traitements différents mais également lors de l'application de traitements identiques, les plus faibles étant le plus souvent obtenues par les traitements par US (3 minutes) et par les composés chimiques, appliqués séparément ou ensemble (tab. II). Cette variabilité des résultats lors des analyses des sédiments peut être expliquée par leur nature hétérogène (ils sont constitués de particules de taille et de nature différentes) et par l'hétérogénéité de leur contamination bactérienne (les bactéries pouvant être libres, associées à des particules de faible diamètre ou à des particules plus grosses et ceci de façon récente ou plus ancienne).

L'influence des traitements dans les différentes expérimentations a été confirmée par les résultats de l'analyse de variance à plusieurs facteurs (traitement, nature de la suspension, opérateur) réalisée sur les données obtenues (tab. II et annexe III). La comparaison des moyennes deux à deux (multiple range test) a montré plusieurs groupes de concentrations bactériennes pour les traitements dans les différentes expérimentations avec le plus souvent le traitement par vortex dans le groupe avec les plus fortes concentrations. L'analyse de variance a mis en évidence, en plus de l'effet traitement, un effet de la nature de la suspension dans deux des trois expérimentations où les concentrations ont été obtenues à partir des suspensions totales et des surnageants résultant d'une centrifugation (500 g, 2 minutes) des suspensions. La comparaison des moyennes deux à deux a montré, dans ces deux

expérimentations, des concentrations plus élevées lors des analyses sur les suspensions totales que sur les surnageants. Enfin, lorsqu'il a pu être pris en compte (deux expérimentations sur les quatre), un effet opérateur a été également mis en évidence par l'analyse de variance. Dans deux expérimentations, des interactions entre les facteurs (traitement/opérateur et nature de la suspension/opérateur, exp. 2 ; traitement/opérateur et traitement /nature de la suspension, exp. 3) ont été observées. Les carrés moyens étant plus faibles que ceux obtenus pour les effets principaux, on a pu considérer les effets des trois facteurs comme réellement significatifs.

Bien qu'aucune technique testée n'ait augmenté sensiblement les concentrations bactériennes et à la fois, diminué la variabilité des résultats dans les quatre expérimentations, la technique la plus efficace semble être **l'homogénéisation au vortex à vitesse maximale (5 minutes)** pour les deux types de sédiments vaseux testés (Morlaix et St Pol de Léon). Ce procédé avait également été retenu pour homogénéiser les suspensions de sédiment avant dénombrement bactérien dans d'autres études (Bergstein-Ben Dan et Koppel, 1991 ; Bergstein-Ben Dan et Stone, 1992 ; Jude, 1998 ; Le guyader *et al.*, 1991).

Un des autres procédés testés dans cette étude a consisté à homogénéiser les suspensions de sédiment dans un broyeur WB (pendant 1 minute, en 3 applications successives de 20 secondes et pendant 3 minutes, en 3 applications de 1 minute). Les résultats ont montré, sur ces sédiments, le plus souvent une absence d'amélioration du dénombrement bactérien et généralement des concentrations plus faibles (pour le temps d'application le plus long) ; seule l'application pendant une minute a conduit à de bons résultats dans une expérimentation (exp. 4, Morlaix). Dye (1979, 1983) recommande ce traitement par broyeur pour des sédiments riches en particules fines et en carbone organique (et un traitement par sonde à US pour des sédiments sableux). Ce traitement permet de casser les particules organiques et d'obtenir, ainsi, de plus fortes concentrations bactériennes (Dye, 1983). Cette technique a été retenue pour le dénombrement bactérien sur de nombreux sédiments avec différents temps d'application soient inférieurs à 1 minute (Irvine et Pettibone, 1993, Pettibone, 1992, Shiaris *et al.*, 1987), soient supérieurs (Crabill *et al.*, 1999, Erkenbrecher 1981, Lindahl et Bakken, 1995, Skanavis et Yanko, 2001).

Plusieurs auteurs s'accordent à dire que selon la bactérie cible, la technique de numération et le sédiment, des résultats très différents peuvent être obtenus par cette technique et qu'une atteinte des cellules peut se produire par bombardement par les particules en suspension (Dye, 1983 ; Kuwae et Hosokawa, 1999 ; Lindahl et Bakken, 1995). Une atteinte cellulaire pourrait ainsi expliquer les plus faibles numérations obtenues par cette technique dans plusieurs de nos essais.

Un autre traitement physique appliqué au cours de nos expérimentations a consisté à utiliser une sonde à US, à la puissance de 200 W, pour homogénéiser les suspensions de sédiment ; trois temps ont été testés soient 1, 3 et 6 minutes en mode alternatif (correspondant respectivement à 30 s, 90 s et 3 min effectives). Ce procédé a conduit à des résultats variables au cours de nos essais. Par exemple, appliqués pendant 3 minutes (90 s effectives), ils ont donné des résultats intéressants dans le cas du sédiment de Morlaix (exp. 2) mais beaucoup moins bons dans le cas du sédiment de St Pol de Léon (exp. 3). Dye (1979) et Epstein et Rossel (1995) recommandent l'utilisation des US pour des sédiments sableux et pauvres en matière organique.

Cependant, de nombreux auteurs l'ont retenu également lors de dénombrements bactériens sur d'autres sédiments dont ceux de nature vaseuse (Ferguson *et al.*, 1996 ; Kuwae et Hosokawa, 1999 ; Mac Daniel et Capone, 1985 ; West, 1988). Comme lors de l'utilisation du WB, certains temps d'application des US peuvent s'avérer trop longs et conduire à une atteinte cellulaire (Epstein et Rossel, 1995 ; Lindahl et Bakken, 1995) et ceci d'une manière plus ou moins importante selon le sédiment analysé (Mac Daniels et Capone, 1985).

Enfin, un mélange chimique a été également utilisé pour améliorer le dénombrement bactérien. Il comportait une résine échangeuse d'ions (chelex) qui sous la forme de sel sodique, adsorbe préférentiellement les cations polyvalents (le remplacement des polycations par les ions sodium permettant ainsi la dispersion des particules et le relargage des bactéries ; Mac Daniels, 1986). Il était également constitué d'un détergent non dénaturant, le désoxycholate de sodium, supposé rompre les polymères adhésifs des cellules (Mac Daniels, 1986) et de polyéthylène glycol (PEG) susceptible de renforcer l'action du détergent (Herron et Wellington, 1990). Même si, le plus souvent, la variabilité des résultats a diminué, ces mélanges (testés à deux concentrations en chelex et deux temps d'incubation) ont conduit à des concentrations toujours inférieures à celles obtenues après homogénéisation des suspensions au vortex. Lindahl et Bakken (1995) ont observé également sur des bactéries indigènes du sol des concentrations plus faibles avec ce mélange (que par le traitement par WB dans leurs expérimentations). D'après ces auteurs, le désoxycholate de sodium pourrait être responsable de cette décroissance par une action néfaste au niveau des membranes cellulaires.

Comme le suggèrent certains auteurs (Lucas *et al.*, 1996), nous avons appliqué, dans certains essais, un traitement physique complémentaire afin d'obtenir une rupture plus drastique des polymères. Cependant, contrairement à leurs résultats, nous n'avons pas obtenu d'amélioration par l'addition d'un traitement aux US au mélange chimique. Des résultats semblables aux nôtres ont été obtenus par Lindahl et Bakken (1995).

Expérimentations	Analyse des suspensions totales			Conc ST/Surn	Analyse à partir des surnageants	
	Concentrations moyennes ¹	Plus fortes concentrations ²	Plus faible variabilité ³		Plus fortes concentrations ²	Plus faible variabilité ³
ED 1 (M)	7 10 ⁴ (4,8 U. Log)	V, m chim	US (3')	>	Centrifugation m chim ± US m chim ± US	
					Sédimentation m chim, V V, m chim	
ED 2 (M)	8 10 ⁴ (4,9 U. Log)	US (6', 3'), V (5')	US (3'), m chim + US	≈	V (5'), US (3')	US (3'') m chim (CH ± US)
ED 3 (S)	1 10 ⁶ (6 U. Log)	V (30'', 5')	m chim (CH 1/10 ± US), WB (1'), V (5')	>	V (30'', 5')	V (30'') m chim (CH ± US)
ED 4 (S)	2 10 ⁶ (6,3 U. Log)	V (30'', 5') WB (1')	m chim 2 h, V(30'), WB (1')	>	V (30'', 5') WB (1')	US (1', 3'), V (5'), WB (1')

¹ moyenne géométrique des concentrations obtenues lors de l'analyse des suspensions totales de sédiment après homogénéisation par vortex (5 minutes),

² techniques conduisant aux plus fortes moyennes de concentration sur l'ensemble des analyses réalisées,

³ techniques conduisant aux plus faibles écart-types entre les différentes concentrations obtenues.

Tableau II : Comparaison des résultats obtenus au cours des expérimentations sur les traitements de décrochage appliqués sur les suspensions de sédiment avant analyse sur gélose Mac Conkey. Abréviations : M : Morlaix, S : St Pol de Léon, ED 1 : première expérimentation de décrochage, ST : suspension totale, Surn : surnageant, m chim : mélange chimique, CH : chelex, V : vortex, WB : Waring blender, US : Ultrasons.

Expériences	Effet traitement (T)	Effet nature de la suspension (N)	Effet opérateur (O)	Interactions
ED 1	+	+	ND	-
ED 2	+	-	+	2 ¹ T/O et N / O
ED 3	+	+	+	2 ¹ T/O et T / N
ED 4	+	+	ND	-

¹ les carrés moyens de ces interactions sont plus faibles que ceux obtenus pour les effets principaux de sorte que l'on peut considérer les trois facteurs principaux comme réellement significatifs.

Tableau III : Résultats de l'analyse de variance à plusieurs facteurs (traitement, nature de la suspension, opérateur) appliquée aux données obtenues par les différents traitements de décrochage. +, effet significatif, -, pas effet significatif, ND : non déterminé.

L'analyse directe des dilutions de sédiment a conduit à dénombrer les bactéries en présence d'une quantité importante de particules qui pouvaient rendre difficile la

lecture. Une partie de ces particules a pu être éliminée par décantation des particules après sédimentation pendant une heure ou centrifugation à 500 g pendant 2 ou 5 minutes. Parmi ces procédés, la centrifugation pendant un temps court (2 minutes) à faible vitesse 500 g (correspondant à un temps effectif d'une minute à la vitesse souhaitée) a semblé être le procédé le plus adapté pour limiter la charge particulaire sans diminuer de façon importante les concentrations bactériennes. La nature du sédiment de Morlaix a conduit à une décantation très lente des particules ; dans le cas d'un autre sédiment plus riche en sables par exemple, la sédimentation pourrait être plus rapide et plus complète. L'étape de centrifugation a permis d'éliminer les particules supérieures à 63 µm (résultats sur 4 sédiments différents provenant de Morlaix ou de Saint Pol de Léon après une homogénéisation de 5 minutes au vortex des suspensions). Les bactéries analysées dans les surnageants pouvaient être des bactéries libres ou associées aux particules en suspension. Une analyse sur les culots de centrifugation a montré qu'une partie des particules fines et des bactéries restaient dans le culot de centrifugation (entraînement par les plus grosses particules, présence au fond du tube avant centrifugation ; annexe III).

Lors de l'analyse des surnageants, les traitements ont montré une efficacité similaire à celle obtenue lors d'une analyse des suspensions totales (généralement meilleurs résultats par utilisation du vortex que par les autres procédés). Les concentrations bactériennes étaient cependant légèrement plus faibles mais de façon significative dans le cas des sédiments de St Pol de Léon et non significativement différentes dans le cas du sédiment de Morlaix (exp. 2) par rapport à une analyse des suspensions totales. L'analyse sur les surnageants a, toutefois, eu l'avantage de diminuer le plus souvent la variabilité des résultats.

Dans la littérature, la plupart des travaux sur les techniques de décrochage ont pour but d'optimiser le dénombrement des bactéries totales par microscopie à épifluorescence (voir revue bibliographique 2.3.1.1.). Ceci explique le fait que les techniques de décrochage ont été ainsi généralement comparées par analyse des surnageants, le plus souvent obtenus par centrifugation : 600 g pendant 10 minutes (Lucas *et al.*, 1996), 500 g pendant 5 minutes (Epstein et Rossel, 1995) ou 100 g pendant 5 minutes (Kuwae et Hosokawa, 1999). Toutefois, d'autres travaux ont testé l'efficacité de ces techniques par une analyse des suspensions totales de sédiment (Derrien *et al.*, 1992). Par contre, à notre connaissance, aucune étude n'a comparé ces procédés, à la fois, sur les suspensions totales et sur les surnageants.

L'agitation au vortex à vitesse maximale pendant 5 minutes a été ainsi retenue pour homogénéiser les suspensions de sédiment dans la comparaison des techniques de numération (deuxième partie de l'étude) ; les concentrations bactériennes étant déterminées dans les suspensions totales et à partir des surnageants après une centrifugation à 500 g de 2 minutes des suspensions.

3.2.2. Les techniques de numération

Dans cette partie de l'étude, l'efficacité de différentes techniques de numération des bactéries fécales (coliformes thermotolérants ou *Escherichia coli*) a été étudiée. Il s'agit de techniques du nombre le plus probable en tubes ou en microplaque et de techniques sur milieux solides (géloses Mac Conkey, TTC Tergitol ou TBX). Elles

ont été comparées selon les deux mêmes critères que précédemment, c'est-à-dire les plus fortes concentrations obtenues et la plus faible variabilité des résultats.

3.2.2.1. Caractérisation chimique et granulométrique des sédiments étudiés

Expérience	COT (%)	Poids sec (%)	Teneur eau (% /sec)	Concentration (kg.m ⁻³)	Diamètre médian (µm)	Diamètre maximum (µm)	Localisation
Sédiments 1	ND	34,71	188	1212			Morlaix, <i>écluse</i> St François Lannuguy bassin
	ND	46,24	116	1393			
	ND	47,21	112	1422			
	ND	24,77	304	1175			
Sédiment 2	3,80	30,6	226	1279			Morlaix, <i>écluse</i>
Sédiment 3	3,13	38,33	161	1304	19,17	175	Morlaix, <i>écluse</i>
Sédiment 4	3,96	45,33	121,56	1269	16,45	250	Morlaix <i>écluse</i>
Surn. 4					9,08	45	
Sédiment 4	2,42	54,21	84,46	1551	27,87	280	St Pol de Léon
Surn. 4					12,87	63	
Sédiment 5	2,65	39,9	150,54	1355	30,11*	250*	Morlaix, <i>écluse</i>
Sédiment 5	2,03	50,93	96,36	1458	46,65*	500*	St Pol de Léon

Tableau IV : Caractérisation des sédiments utilisés lors des essais de comparaison des techniques de numération des bactéries fécales dans les sédiments. Surn. : surnageant obtenu après agitation au vortex de 5 minutes de la suspension au ½ et centrifugation (500 g, 2 minutes), COT, teneur en carbone organique total, diamètres médian et maximal obtenus par analyse granulométrique de la fraction des particules inférieures à 500 µm du sédiment directement, ou * après tamisage par voie humide et séchage du sédiment ; ND : non déterminé.

Les sédiments étudiés dans cette partie de l'étude provenaient également de Morlaix et de St Pol de Léon.

Le principal point de prélèvement à Morlaix se trouvait à proximité de l'écluse. Suivant les prélèvements, des variations dans la composition du sédiment ont été observées (tab. IV). Les teneurs en COT variaient de 2,65 à 3,80 %, les poids secs de 30 à 45 %, les teneurs en eau de 120 à 188 % et les concentrations des dépôts de 1212 à 1355 kg.m⁻³. Les autres sédiments prélevés dans la rivière de Morlaix se caractérisaient par des teneurs en eau plus élevées (304 ; Bassin, sédiment immergé) ou plus faibles (112 et 118 ; St François ou Lannuguy). Ces derniers sédiments étaient plus concentrés (environ 1400 kg m⁻³).

Quant aux sédiments de St Pol de Léon, ils étaient plus pauvres en matière organique, les teneurs en COT variaient de 2 à 2,4 %. Les poids secs étaient de 51 et 54 % et les teneurs en eau de 84 et 96 %. Les concentrations des dépôts étaient de 1458 et de 1551 kg.m⁻³.

L'analyse granulométrique sur la fraction des particules de diamètre inférieur à 500 μm a montré un diamètre médian de 16 à 19 μm pour le sédiment de Morlaix et un diamètre de 28 μm pour le sédiment de St Pol de Léon (sédiments 3 et 4 ; annexe II).

Des analyses ont eu lieu également sur des suspensions, moins riches en particules, obtenues par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes des dilutions au $\frac{1}{2}$ de sédiment. Toutes les particules supérieures à 63 μm environ ont ainsi décantées et se sont retrouvées dans le culot de centrifugation. Une analyse granulométrique des particules présentes dans les surnageants a montré que le diamètre médian des particules était de 9 μm dans le surnageant obtenu à partir du sédiment de Morlaix et de 13 μm dans celui de St Pol de Léon.

3.2.2.2. *Expérimentation 1 (numération 1, Morlaix)*

Les concentrations en bactéries fécales de sédiments provenant de 4 endroits différents ont été déterminées par analyse des suspensions totales de sédiment par les techniques NPP en tubes BLBVB ou en microplaque et par étalement sur milieu solide Mac Conkey. Des variations dans les concentrations bactériennes ont été obtenues suivant l'origine du sédiment et la technique de numération appliquée.

Le sédiment le plus contaminé provenait du bassin à flot et le moins contaminé du point le plus aval de la rivière (Lannuguy). La concentration moyenne en CTT des 4 sédiments était respectivement de $4,4 \cdot 10^4$ pour le sédiment près de l'écluse, de $1,1 \cdot 10^5$ pour celui de St François, de $3,2 \cdot 10^4$ pour celui de Lannuguy et de $1,3 \cdot 10^5$ pour le sédiment immergé du bassin (pour 100 g de sédiment humide, sur gélose Mac Conkey, moyennes géométriques, $n = 3$).

La technique par étalement sur gélose Mac Conkey a donné les plus fortes concentrations, les deux techniques par NPP conduisant à des résultats inférieurs mais non sensiblement différents entre eux. Les plus faibles variations sur les résultats ont été obtenues par les techniques sur gélose Mac Conkey et en microplaque. L'intervalle de confiance sur la valeur donnée par la table NPP était plus faible par la microplaque que par la technique en tubes, le résultat provenant de 16 puits pour 6 dilutions pour la première technique et de 5 tubes pour 3 dilutions pour la seconde (fig. 6).

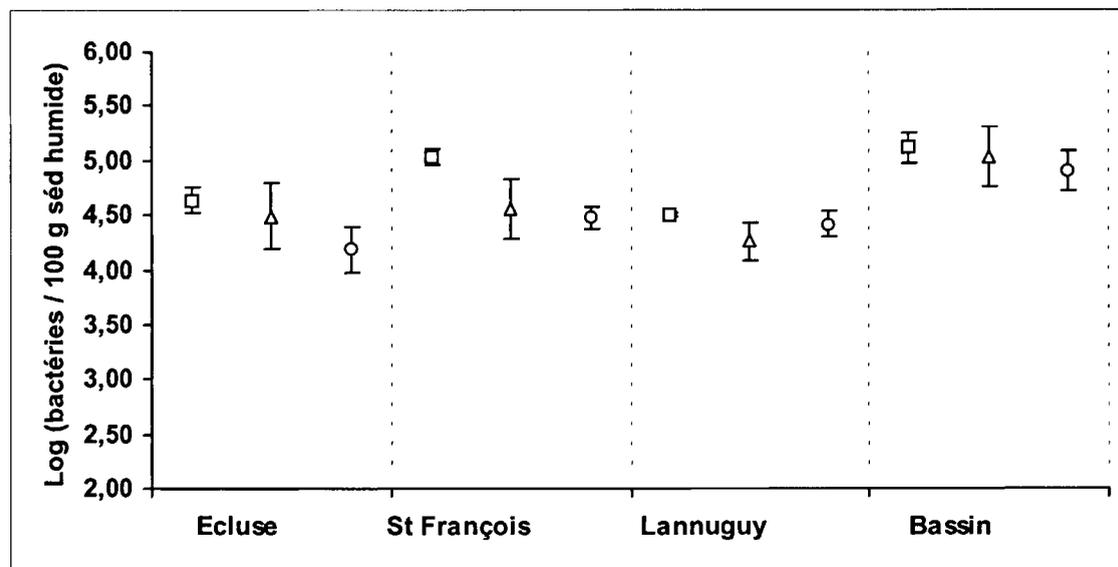


Figure 5 : Influence des techniques de numérations sur les concentrations en CTT ou en *E. coli* de quatre sédiments (numérations 1, Morlaix) : (□) analyse sur la gélose Mac Conkey, (Δ) analyse par la technique NPP 3 x 5 tubes BLBVB, (○) analyse par la technique NPP miniaturisée ; moyenne de 3 analyses et écart-type.

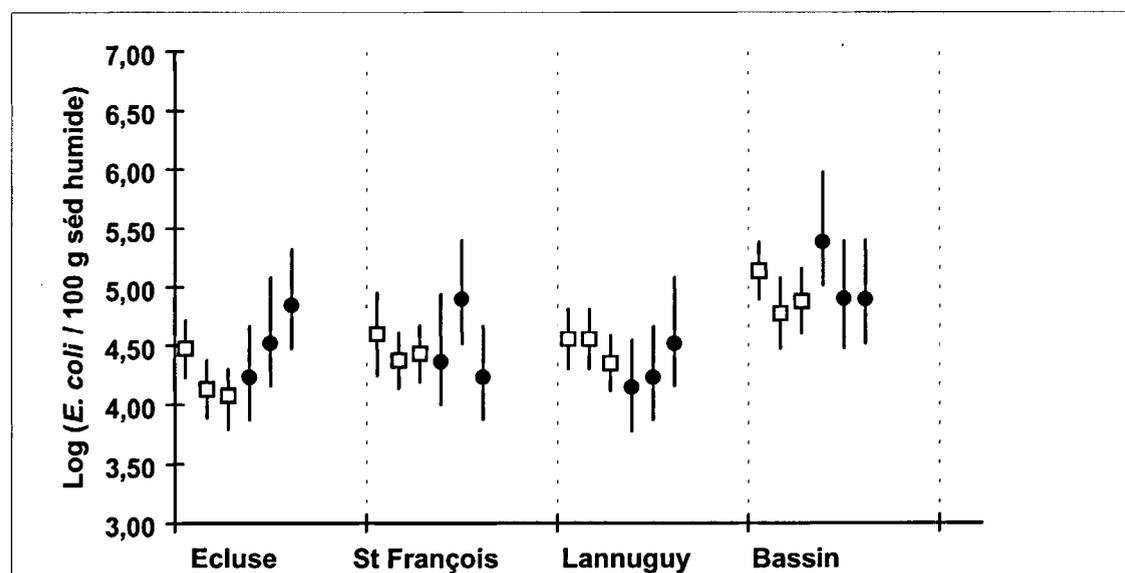


Figure 6 : Influence de la technique de numération des *E. coli* sur l'intervalle de confiance du nombre le plus probable lors de l'analyse de 4 sédiments (numérations 1, Morlaix) : (□) analyse par la technique NPP miniaturisée (6 dilutions x 16 puits) , (●) analyse par la technique NPP 3 x 5 tubes BLBVB.

3.2.2.3. Expérimentation 2 (numération 2, Morlaix)

Les concentrations en bactéries fécales ont été déterminées, ici, dans trois échantillons d'un même prélèvement de sédiment (Morlaix, écluse) par analyse des suspensions totales de sédiment ou des surnageants obtenus après centrifugation.

Lors de l'analyse des suspensions totales, les concentrations bactériennes les plus importantes ont été obtenues par étalement sur la gélose TTC Tergitol (5,6 U. Log) (fig. 7). Les plus faibles variations sur les résultats ont été observées par les microplaques.

Lors des analyses à partir des surnageants, les plus fortes concentrations ont été également obtenues par utilisation de la gélose TTC Tergitol (moyenne de 5,4 U. Log). Sans diminuer sensiblement les concentrations bactériennes obtenues, l'analyse des surnageants a permis de diminuer la variabilité des résultats, les plus faibles variations étant également observées par l'utilisation des microplaques (fig 7).

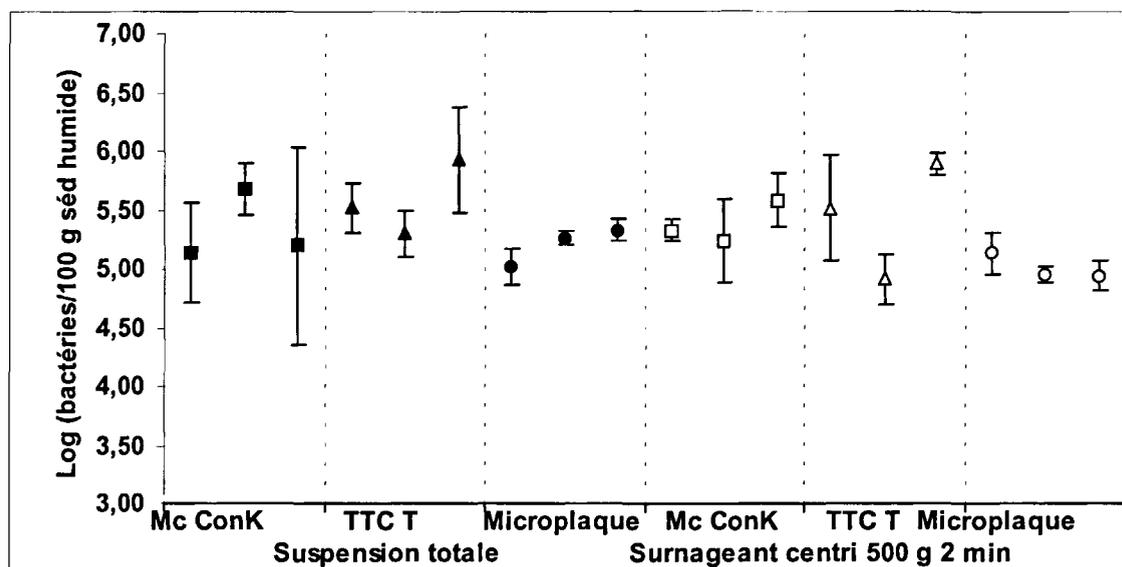


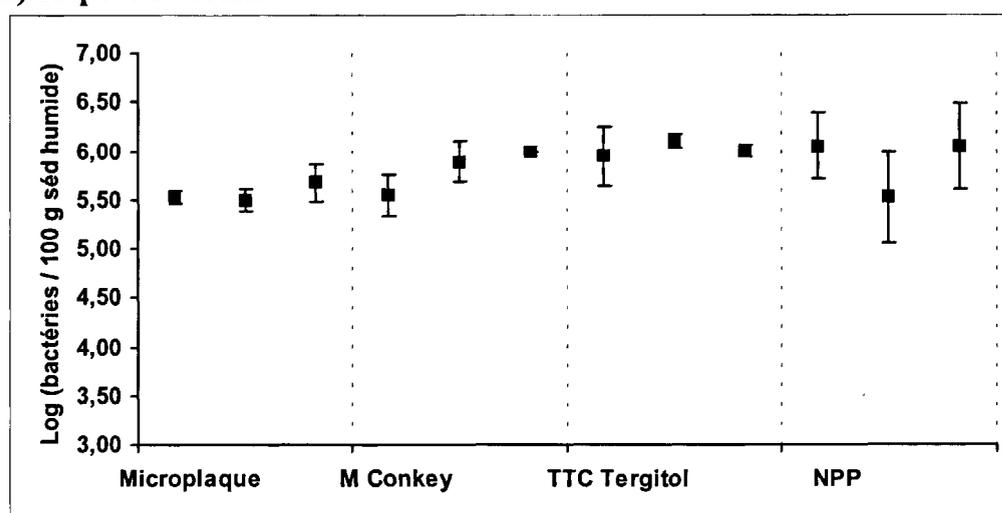
Figure 7 : Influence des techniques de numération sur les concentrations en CTT ou en *E. coli* du sédiment (numération 2, Morlaix) : analyse sur la suspension totale (sigles pleins) et analyse sur le surnageant après centrifugation (sigles vides) ; (□, ###) gélose Mac Conkey, (△,) gélose TTC Tergitol, (○,●) technique NPP par microplaque.

3.2.2.4. Expérimentation 3 (numération 3, Morlaix)

Au cours de cette expérimentation, les bactéries fécales (CTT ou *E. coli*) ont été dénombrées dans un sédiment provenant du même site de prélèvement, par les techniques NPP en tubes et en microplaque et par étalement sur milieu solide : Mac Conkey et TTC Tergitol.

La concentration moyenne en CTT du sédiment était de $6,4 \cdot 10^5$ / 100 g de sédiment humide (sur gélose Mac Conkey, moyenne géométrique, $n = 9$).

a) suspension totale



b) surnageant

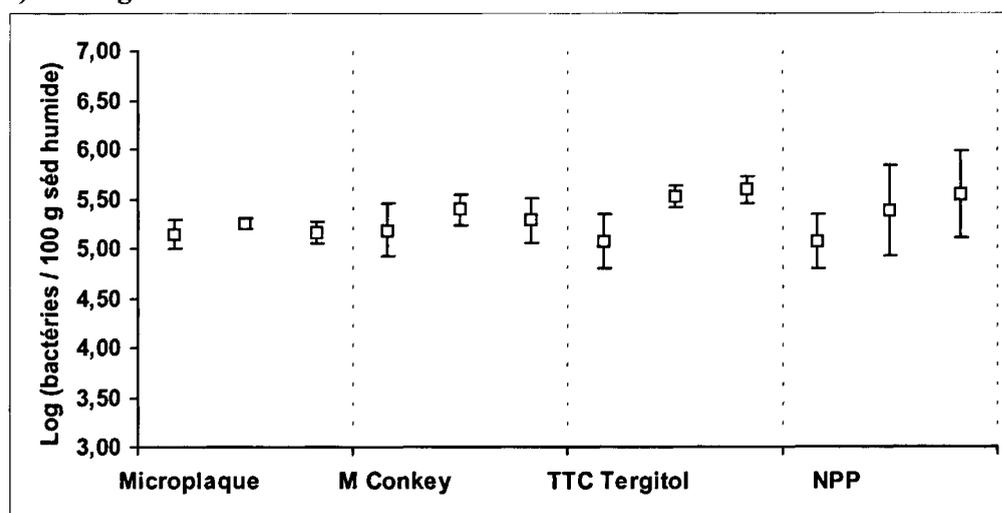


Figure 8 : Influence des techniques de numération sur les concentrations en CTT ou en *E. coli* d'un sédiment (numération 3, Morlaix) : a) analyse de la suspension totale, b) analyse du surnageant après centrifugation à 500 g pendant 2 minutes, sur les géloses Mac Conkey ou TTC Tergitol, par les techniques NPP 3 x 5 tubes BLBVB ou miniaturisée ; moyenne de 3 analyses et écart-type.

Lors de l'analyse des suspensions totales de sédiment, les plus fortes numérations ont été obtenues par étalement sur gélose TTC Tergitol (moyenne 6 U. Log). La plus faible variabilité entre les réplicats a été obtenue par la microplaque (fig. 8). Si les résultats sont donnés avec leurs limites de confiance inférieure et supérieure selon la table NPP, l'intervalle de confiance est beaucoup plus faible avec la technique NPP miniaturisée qu'avec la technique en tubes, les résultats NPP provenant de 24 puits pour 4 dilutions dans le premier cas et de 5 tubes pour 3 dilutions dans le second (fig. 9).

L'analyse à partir des surnageants a conduit à des concentrations également différentes selon la technique de numération et plus faibles que celles obtenues à partir d'une analyse des suspensions totales (fig. 8 et 9). Les concentrations les plus fortes ont été obtenues par la technique sur gélose TTC Tergitol (moyenne 5,4 U. Log) et les plus faibles variations par la microplaque.

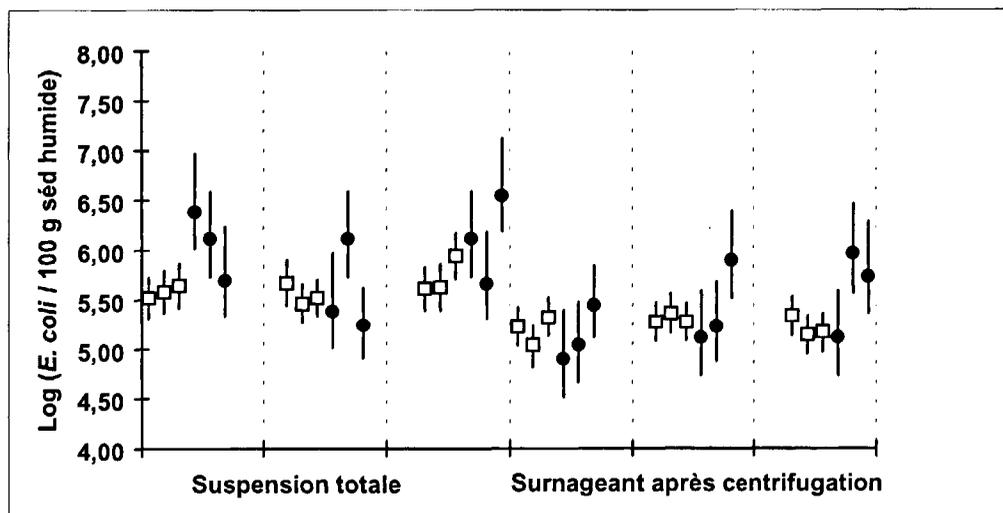


Figure 9 : Influence de la technique de numération sur l'intervalle de confiance du nombre le plus probable de *E. coli* lors de l'analyse d'un sédiment (numération 3, Morlaix) : (□) analyse par la technique NPP miniaturisée (4 dilutions x 24 puits) , (●) analyse par la technique NPP 3 x 5 tubes BLBVB.

3.2.2.5. Expérimentation 4 (numérations 4, Morlaix et St Pol de Léon)

Les concentrations en bactéries fécales de deux sédiments (Morlaix et St Pol de Léon) ont été déterminées par deux techniques utilisées précédemment : l'étalement sur gélose Mac Conkey et la technique NPP en microplaque. Un milieu solide permettant de dénombrer plus spécifiquement les *E. coli* (détection de l'activité β -glucuronidase bactérienne) a été également utilisé.

La concentration moyenne en CTT du sédiment était de $5,9 \cdot 10^4$ / 100 g de sédiment humide (sur gélose Mac Conkey, moyenne géométrique, n=12) pour le sédiment de Morlaix et de $5,6 \cdot 10^4$ / 100 g de sédiment humide (moyenne géométrique, n = 12) pour celui de St Pol de Léon.

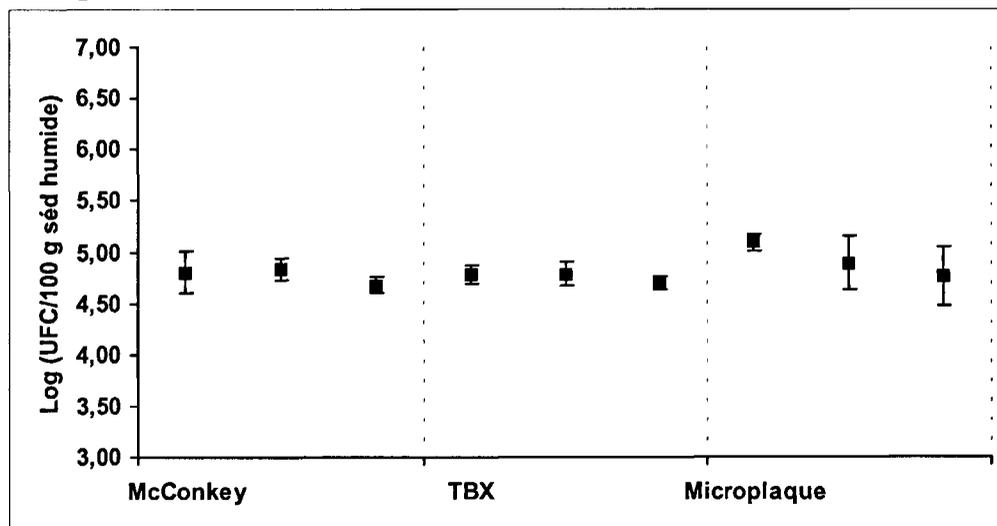
Lors de l'analyse des suspensions totales, les concentrations en bactéries fécales étaient du même ordre sur les géloses Mac Conkey et TBX pour les sédiments de Morlaix (moyennes respectivement de 4,72 U. Log et de 4,71 U. Log) et de St Pol de Léon (moyennes respectivement de 4,65 U. Log et de 4,71 U. Log). Les concentrations étaient légèrement supérieures par la technique en microplaque pour le sédiment de Morlaix (moyenne 4,87 U. Log) (fig. 10a et fig. 11a). Les deux milieux solides ont conduit aux plus faibles variations sur les résultats.

Lors de l'analyse à partir des surnageants, les géloses Mac Conkey et TBX ont conduit, à la fois, aux plus fortes concentrations et aux plus faibles variations observées sur les résultats pour les deux sédiments.

Les concentrations obtenues par ces deux milieux solides, étaient équivalentes à celles obtenues à partir des suspensions totales dans le cas du sédiment de Morlaix (fig. 10b) et supérieures dans le cas du sédiment de St Pol de Léon (fig. 11b).

Dans cette expérimentation, l'utilisation des microplaques a conduit à une plus grande variabilité des résultats (tout particulièrement lors de l'analyse des surnageants des suspensions de sédiments de Morlaix). De plus, la lecture des microplaques a été fastidieuse, surtout pour le sédiment de St Pol de Léon : un bruit de fond ou une fluorescence parasite était observé dans de très nombreux puits. L'ensemencement d'une gélose TBX (permettant de mettre en évidence également les *E. coli* possédant la β -glucuronidase) à partir des suspensions des puits douteux a conduit à des résultats négatifs (présence seulement de colonies blanches, signe de bactéries β -glucuronidase négative). Une possible explication de cette fluorescence parasite serait la présence de plancton en quantité importante principalement dans le sédiment de St Pol de Léon (prélèvement en juin, propice à des blooms planctoniques) ; certains organismes planctoniques possèdent, en effet, une activité β -glucuronidase (Davies *et al.*, 1994).

a) suspension totale



b) surnageant

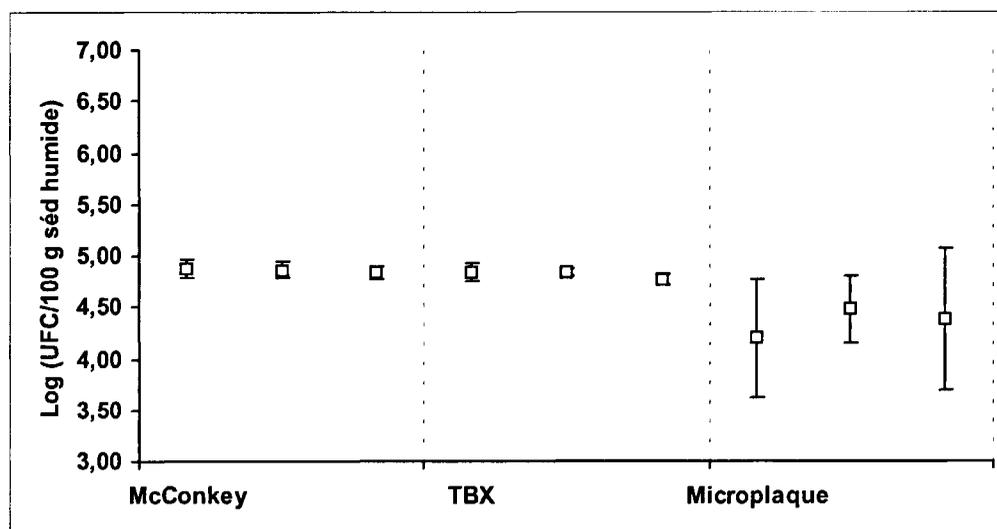
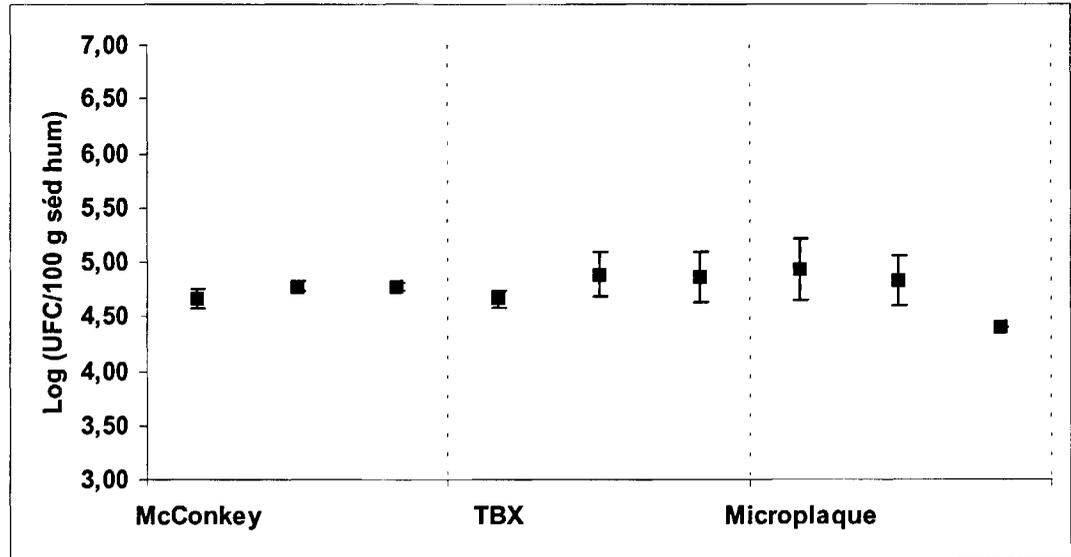


Figure 10 : Influence des techniques de numération sur les concentrations en CTT ou en *E. coli* d'un sédiment (numération 4, Morlaix) : a) analyse de la suspension totale, b) analyse du surnageant après centrifugation à 500 g pendant 2 minutes, par étalement sur les géloses Mac Conkey ou TBX, ou par la technique NPP miniaturisée ; moyenne de 4 analyses et écart-type.

a) suspension totale



b) surnageant

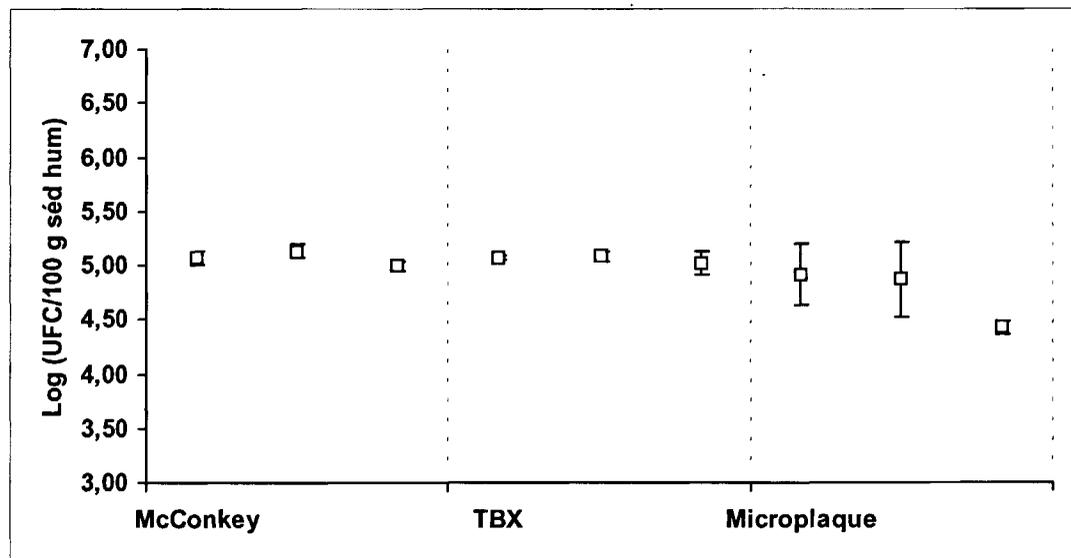


Figure 11 : Influence des techniques de numération sur les concentrations en CTT ou en *E. coli* d'un sédiment (numération 4, St Pol de Léon) : a) analyse de la suspension totale, b) analyse du surnageant après centrifugation à 500 g pendant 2 minutes, par étalement sur les géloses Mac Conkey ou TBX, ou par la technique NPP miniaturisée ; moyenne de 4 analyses et écart-type.

3.2.2.6. Expérimentation 5 (numération 5, Morlaix et St Pol de Léon)

Le but de cette expérience était de déterminer la cause des difficultés de lecture et des résultats médiocres obtenus par la technique NPP miniaturisée lors de l'expérience précédente. Aussi, des microplaques de deux types (opaques et transparentes) ont été comparées aux milieux gélosés Mac Conkey et TBX. Deux sédiments, provenant des mêmes localisations que précédemment, ont été prélevés deux mois plus tard. Les concentrations en CTT étaient de $1,2 \cdot 10^5$ /100 g de sédiment humide pour le sédiment de Morlaix et de $6,6 \cdot 10^5$ pour le sédiment de St Pol de Léon (moyennes géométriques, $n = 3$).

Les microplaques

Les problèmes de lecture des microplaques n'ont pas été rencontrés cette fois-ci et l'éventuelle interférence du plancton dans la détection de l'activité β -glucuronidase bactérienne n'a donc pas pu être appréhendée.

La comparaison des microplaques opaques (Biokar, utilisées dans l'expérience précédente, intérêt : lecture facile de la fluorescence) et transparentes (Biorad, intérêt : visualisation des troubles bactériens), sur le sédiment de St Pol de Léon, a montré des concentrations équivalentes par ces 2 types de microplaque aussi bien dans le cas d'une analyse des suspensions totales que des surnageants (tab. V).

Certaines microplaques, juste après leur ensemencement, ont été placées sous lampe UV pendant une très courte période afin de détecter une éventuelle fluorescence dans les puits avant toute croissance bactérienne (apparaissant lors de l'incubation à 44 °C). Aucune fluorescence n'a été observée et le résultat obtenu après la période d'incubation n'a pas été affecté par ce passage rapide sous lampe UV.

L'addition du réactif de Kovacs dans les puits après incubation de la microplaque à 44 °C et lecture de la fluorescence a permis de mettre en évidence les *E. coli* par une autre propriété : la production d'indole. Lors de cette expérience, les concentrations obtenues dans les sédiments ont été sensiblement les mêmes que l'on s'intéresse aux *E. coli* β -glucuronidase positive ou aux *E. coli* indole positif. Toutes les bactéries rencontrées dans ce sédiment n'étaient pas cependant à la fois β -glucuronidase positive et indole positif ; quelques bactéries étaient β -glucuronidase positive et indole négatif, et d'autres β -glucuronidase négative et indole positif.

Les géloses Mac Conkey et TBX

Les concentrations en bactéries des sédiments ont également été mesurées par les techniques sur milieu solide (géloses Mac Conkey et TBX), soit par étalement direct des suspensions sur la gélose, soit par filtration sur membrane et dépôt de celle-ci sur le milieu solide. Ces procédés (étalement direct ou filtration sur membrane) ont conduit à des résultats équivalents pour les deux milieux utilisés, et pour les deux types de suspension analysée (suspension totale ou surnageant) (tab. V).

Lors de l'analyse des suspensions totales par la technique de filtration sur membrane, pour les suspensions les plus concentrées (soit 1 ml de la dilution au 1/10 du sédiment), le nombre de colonies présentes sur la membrane doit être faible en raison de la présence de particules rendant difficile la lecture. Le comptage des colonies sur les membranes placées sur les géloses TBX s'est avéré être plus facile que sur les membranes déposées sur les géloses Mac Conkey.

Comparaison des microplaques, géloses TBX et Mac Conkey

La comparaison des résultats obtenus par les techniques de numération sur les suspensions totales de sédiment met en évidence les plus fortes concentrations bactériennes par gélose Mac Conkey et des concentrations plus faibles et équivalentes entre elles sur gélose TBX et microplaque pour les 2 types de sédiments.

Lors de l'analyse à partir des surnageants, les concentrations étaient plus faibles pour le sédiment de Morlaix et équivalentes pour le sédiment de St Pol de Léon. La gélose Mac Conkey a conduit aux numérations les plus élevées, la gélose TBX et la microplaque conduisant à des concentrations plus faibles mais équivalentes entre elles.

	Concentrations bactériennes en log (bactéries/100 g sédiment humide) ± écart-type	
	Suspension totale	Surnageant
St Pol de Léon		
Microplaque opaque	5,38 ± 0,18	5,28 ± 0,14
Microplaque transparente	5,48 ± 0,21	5,40 ± 0,04
Etalement sur TBX	5,36 ± 0,25	5,37 ± 0,10
FM TBX	5,46 ± 0,08	5,17 ± 0,15
Etalement sur Mac Conkey	5,82 ± 0,02	5,62 ± 0,10
FM Mac Conkey	5,84 ± 0,06	5,17 ± 0,31
Morlaix		
Microplaque	4,88 ± 0,10	4,53 ± 0,10
Etalement sur TBX	4,79 ± 0,20	4,43 ± 0,18
FM TBX	4,88 ± 0,15	4,48 ± 0,05
Etalement sur Mac Conkey	5,08 ± 0,27	4,69 ± 0,09
FM Mac Conkey	5,27 ± 0,19	4,66 ± 0,01

Tableau V : Concentrations bactériennes obtenues par les techniques de numération appliquées sur les suspensions totales de sédiment ou les surnageants (centrifugation 500 g, 2 minutes) à partir des sédiments de Morlaix et de St Pol de Léon. FM : filtration sur membrane.

3.2.2.7. Synthèse des expérimentations sur les techniques de numération et discussion

Expériences	Analyse des suspensions totales			Conc ST/surn	Analyse à partir des surnageants	
	Concentrations moyennes ¹	Plus fortes concentrations ²	Plus faible variabilité ³		Plus fortes concentrations ²	Plus faible variabilité ³
EN 1 (M) (4 sites ≠)	de 3,2 10 ⁴ à 1,3 10 ⁵ (4,5 à 5,1 U. Log)	Mac Conkey (E)	Mac Conkey, microplaque	ND	ND	ND
EN 2 (M)	2 10 ⁵ (5,3 U. Log)	TTC Tergitol (E)	microplaque	≈	TTC Tergitol (E)	microplaque
EN 3 (M)	6,4 10 ⁵ (5,8 U. Log)	TTC Tergitol (E)	microplaque	>	TTC Tergitol (E)	microplaque
EN 4 (M)	5,9 10 ⁴ (4,8 U. Log)	microplaque	TBX, Mac Conkey	≈	Mac Conkey, TBX	TBX, Mac Conkey
EN 4 (S)	5,6 10 ⁴ (4,7 U. Log)	TBX, Mac Conkey	Mac Conkey	<	Mac Conkey, TBX	TBX, Mac Conkey
EN 5 (M)	1,2 10 ⁵ (5,1 U. Log)	Mac Conkey	microplaque	>	Mac Conkey	Mac Conkey TBX
EN 5 (S)	6,6 10 ⁵ (5,8 U. Log)	Mac Conkey (E, FM)	Mac Conkey (E, FM)	≈	Mac Conkey (E)	microplaque

¹ moyenne géométrique des concentrations obtenues lors de l'analyse des suspensions totales de sédiment après homogénéisation par vortex (5 minutes),

² techniques conduisant aux plus fortes moyennes de concentration sur l'ensemble des analyses réalisées,

³ techniques conduisant aux plus faibles écart-types entre les différentes concentrations obtenues.

Tableau VI : Comparaison des résultats obtenus au cours des expérimentations sur les techniques de numération appliquées sur les suspensions de sédiment.
Abréviations : M : Morlaix, S : St Pol de Léon, EN 1 : première expérimentation de comparaison de techniques de numération, ST : suspension totale, Surn : surnageant, E : étalement sur gélose, FM : filtration sur membrane.

Expériences	Effet technique de numération (T)	Effet nature de la suspension (N)	Effet origine du sédiment (S)	Interactions
EN 1	+	ND	+	-
EN 2	+	-	-	-
EN 3	+	+	-	-
EN 4	-	+	+	1 : N/S

Tableau VII : Résultats de l'analyse de variance à plusieurs facteurs (technique de numération, nature de la suspension, origine du sédiment) appliquée aux données obtenues par les différentes techniques de numération. +, effet significatif, -, pas effet significatif, ND : non déterminé. Dans l'expérimentation 4 (EN 4), seuls les résultats sur géloses ont été pris en compte dans l'analyse de variance.

Au cours de cette partie de l'étude, les concentrations en bactéries fécales ont été déterminées par des techniques, ayant en commun la sélection de bactéries résistant à une température de 44 °C, et mettant en évidence les coliformes thermotolérants pour les techniques Mac Conkey et TTC Tergitol et plus spécifiquement les *E. coli* pour les techniques NPP en tubes BLBVB, en microplaque et sur gélose TBX. Le dénombrement des *E. coli* a eu lieu par recherche de la production d'indole pour la technique NPP en tubes et de la présence de β -glucuronidase pour la microplaque et la gélose TBX.

Les résultats obtenus ont montré que le choix de la technique de numération avait une influence importante sur les concentrations bactériennes obtenues (tab VI, VII).

Lors d'une analyse des suspensions totales, les techniques sur géloses TTC Tergitol et Mac Conkey ont conduit le plus souvent aux plus fortes numérations (tab. VI). L'analyse des surnageants a montré des résultats sensiblement identiques (tab. VI). Les plus faibles variations dans les concentrations ont été obtenues par la microplaque aussi bien lors d'une analyse des suspensions totales que lors de celle des surnageants. La gélose TBX, utilisée dans les expérimentations 4 et 5, a conduit à de bons résultats.

L'influence des techniques de numération dans les différentes expérimentations a été confirmée par les résultats de l'analyse de variance à plusieurs facteurs (technique de numération, nature de la suspension, origine du sédiment) réalisée sur les données obtenues (tab. VII et annexe III). La comparaison des moyennes deux à deux (multiple range test) a montré plusieurs groupes de concentrations bactériennes pour les techniques de numération dans les différentes expérimentations avec le plus souvent les techniques de dénombrement des CTT dans le groupe avec les plus fortes concentrations et des résultats plus faibles mais non sensiblement différents entre eux par les techniques dénombant les *E. coli*. L'analyse de variance a mis en évidence également un effet de la nature de la suspension dans deux des trois expérimentations où les concentrations avaient été obtenues à partir des suspensions totales et des surnageants résultant d'une centrifugation (500 g, 2 minutes) des suspensions. La comparaison des moyennes deux à deux a montré, dans ces deux expérimentations, des concentrations plus élevées lors des analyses sur les suspensions totales que sur les surnageants. Un effet de l'origine du sédiment a été observé dans le cas de sédiments provenant d'endroits différents (et non dans les cas où ils étaient issus d'un même prélèvement). Pour une expérimentation (exp. 4), une interaction entre la nature de la suspension et l'origine du sédiment a été observée. Elle était due au fait que les résultats entre les suspensions totales et les surnageants étaient significativement différents pour les sédiments de St Pol de Léon et non pour ceux de Morlaix.

Les plus fortes concentrations ont généralement été obtenues par les techniques recherchant les coliformes thermotolérants (plutôt que les *E. coli*), la gélose TTC Tergitol conduisant à de plus fortes numérations que la gélose Mac Conkey. De nombreux auteurs ont également recherchés les CTT dans des sédiments par utilisation de milieux gélosés principalement par la technique de filtration sur membrane (Albinger, 1993 ; Crabill *et al.*, 1999 ; Ferguson *et al.*, 1996 ; Valiela *et al.*, 1991).

Au cours de nos essais, lors de l'analyse des suspensions totales, la lecture sur ces géloses était souvent difficile. Dans le cas des suspensions les plus concentrées, des particules de sédiment pouvaient masquer certaines colonies et conduire éventuellement à une sous-estimation (faux-négatifs). Cependant, une sur-estimation était le plus souvent susceptible d'être observée en raison de la présence d'une flore interférente pas toujours facile à différencier (présence de faux-positifs). Dans certains cas, des variations importantes entre réplicats ont été observées. Ces milieux avaient également le désavantage de rechercher un groupe hétérogène de bactéries comprenant plusieurs espèces bactériennes (les coliformes thermotolérants) et donc moins bien défini que les *Escherichia coli*.

Un dénombrement de ces derniers a été réalisé sur un autre milieu solide : la gélose TBX par la recherche de la capacité des bactéries à se développer en présence de sels biliaires et à cliver un substrat chromogène, le BCIG (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique), grâce à leur β -glucuronidase. Plusieurs études ont montré que 94 à 97 % des *E. coli* d'origine humaine ou de l'environnement possédaient cette enzyme. Cependant, elle est absente chez certaines souches telles que les *E. coli* entérohémorragiques : *E. coli* O157 : H7 (Vernozy-Rozand et Montet, 2001) et présente chez des bactéries autres que *E. coli* telles que *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia* mais toutefois dans un nombre réduit de souches (Manafi, 2000). L'utilisation de géloses permettant de mettre en évidence les *E. coli* par la présence de la β -glucuronidase a été décrite dans des études antérieures (Gauthier *et al.*, 1991 ; Ghinsberg *et al.*, 1991). Les colonies possédant cette enzyme étaient mises en évidence par visualisation d'une fluorescence résultant de la lyse du MUG inclus dans ces milieux solides.

L'utilisation de la gélose TBX, dans nos expérimentations, a permis d'obtenir des résultats plus reproductibles et plus faciles à lire que sur les géloses mettant en évidence les CTT : en effet, les colonies bleues (*E. coli* β -glucuronidase positive) se distinguent facilement des autres colonies (blanches pour les bactéries β -glucuronidase négative) et des particules de sédiment.

Ces milieux ont été utilisés soit par étalement direct des suspensions sur les géloses soit par la technique de filtration sur membrane. Ces deux procédés ont donné des résultats comparables et reproductibles surtout pour la gélose TBX. Pour la technique par filtration sur membrane, dans le cas de la dilution la plus chargée (1 ml de suspension de sédiment au 1/10), le nombre de colonies doit être toutefois inférieur à 50 environ pour pouvoir effectuer une lecture correcte.

Le seuil de détection sur milieu solide est élevé : 1 10^3 bactéries pour 100 g de sédiment humide. L'utilisation du milieu TBX par incorporation en gélose n'a pas été testée au cours de cette étude mais pourrait être une technique à envisager pour diminuer le seuil de détection. Des essais sont à réaliser afin de connaître la dilution appropriée à retenir permettant d'obtenir une bonne lecture sachant que 1 ml de la dilution est inclus dans la gélose.

Les *Escherichia coli* peuvent également être recherchés par des techniques en milieu liquide dites du nombre le plus probable. La technique en 3 x 5 tubes BLBVB dénombre les *E. coli* présumés par mise en évidence des bactéries qui fermentent le lactose avec production de gaz en présence d'inhibiteurs (sels biliaires et vert brillant) et qui produisent de l'indole. La technique en microplaque, quant à elle,

sélectionne les *E. coli* par la mise en évidence de l'activité β -glucuronidase en milieu sélectif.

Des concentrations comparables à celles obtenues sur gélose TBX, ont été mesurées par les techniques NPP en tubes (5 tubes par dilution) ou en microplaque (96 puitsensemencés avec 200 μ l des dilutions appropriées des suspensions de sédiment). Ces techniques ont l'avantage de diminuer le seuil de détection à 2 ou 20 bactéries par 100 g de sédiment humide pour la technique NPP en tubes (dans le cas d'un apport de 10 g ou 1 g de sédiment dans les tubes de milieu présomptif) et à 150 ou 400 bactéries par 100 g de sédiment humide pour la technique en microplaque (selon que la microplaque soitensemencée avec 2 dilutions (1/20 et 1/200) ou 4 dilutions de 1/20 à 1/20000).

La microplaque possède plusieurs avantages par rapport à la technique NPP en tubes. Elle conduit généralement à une meilleure sélectivité (nos résultats ; sur les eaux, Dupont, 1995) que la technique en tubes. Sur des eaux de mer, cette technique a montré également une plus grande spécificité (moins de 5 % de faux positifs) par rapport à la technique par filtration sur membrane avec la gélose TTC Tergitol et la technique par incorporation en gélose lactosée au lauryl-sulfate (Hernandez *et al.*, 1991). Elle permet donc d'éviter tout repiquage (Hernandez *et al.*, 1991). Cette technique est aussi plus précise que la méthode NPP classique (plus faibles variations sur 3 répliquats d'analyse sur le sédiment ; Dupont, 1995).

De plus, les estimations NPP sont données avec des intervalles de confiance plus faibles en raison du plus grand nombre de puits que de tubes par dilution (16 ou 24 puits contre 5 tubes). L'intervalle de confiance peut encore être réduit par l'ensemencement de la microplaque avec simplement deux dilutions (64 puits pour la dilution 1/20 et 32 puits pour la dilution 1/200).

Cette technique est rapide et permet d'obtenir les résultats après une incubation de 36 à 48 heures contre 72 heures pour la technique en tubes.

Cependant, dans un cas, nous avons été confronté à des difficultés de lecture des microplaques. La cause des fluorescences parasites observées n'a pu être identifiée mais certains constituants du sédiment tels que le plancton pourraient être éventuellement incriminés. En effet, certaines espèces planctoniques possèdent, également une β -glucuronidase (Davies *et al.*, 1995). Certains tests tels que l'observation sous lampe UV des microplaques dès l'ensemencement (l'incubation de 48 heures à 44 °C étant plutôt néfaste aux espèces planctoniques) et la recherche de la production d'indole dans les puits après lecture des microplaques, pourraient permettre de confirmer si la fluorescence observée est bien due à une croissance de bactéries β -glucuronidase positive.

La plupart des études dénombrant les bactéries fécales dans les sédiments les recherchent par des techniques NPP en tubes en 2 étapes (présomptive et confirmative) utilisant ou non du MUG (Erkenbrecher, 1981 ; Grimes, 1980 ; Palmer, 2000 ; Skanavis et Yanko, 2001 ; Weiskel *et al.*, 1996). Cependant, comme nous l'avons observé dans cette étude, le manque de précision de cette technique est également souligné par différents auteurs (Dupont, 1995 ; Palmer, 2000). Des techniques NPP en une étape utilisant du MUG ont été également décrites pour dénombrer les *E. coli* dans des sédiments (Pettibone, 1992). La microplaque, utilisée

dans notre étude, est également une technique en une étape, avec détection des bactéries par hydrolyse du MUG. Cette technique couramment utilisée pour dénombrer les *E. coli* dans les eaux et tout particulièrement les eaux de baignade (Hernandez *et al.*, 1991, 1993 ; norme Afnor T90-433) n'avait cependant pas été utilisée, à notre connaissance, pour des sédiments.

Pour des sédiments faiblement contaminés, une analyse par d'autres techniques de numération ou sur une suspension moins riche en particules, obtenue par centrifugation par exemple, doit être envisagée.

La technique NPP en tube peut être utilisée pour des sédiments trop faiblement contaminés pour être analysés par les techniques NPP en microplaque ou par gélose TBX. Cependant, il faut bien garder en mémoire que cette technique sera beaucoup moins précise et nécessitera donc la réalisation des analyses en réplicats.

La lecture étant difficile sur les géloses et dans les puits les plus concentrés des microplaquesensemencés par les suspensions totales de sédiment, il peut s'avérer intéressant d'analyser plutôt les surnageants obtenus après décantation de ces suspensions (contenant des grosses particules). Dans nos essais, la centrifugation à 500 g pendant 2 minutes a permis ainsi d'éliminer les particules ayant les diamètres les plus importants.

Les résultats obtenus étaient variables : dans certains cas, les concentrations obtenues étaient significativement différentes (exp. 3, exp. 4 : St Pol de Léon, exp.5 : St Pol de Léon) et dans d'autres, elles ne l'étaient pas (exp. 2, exp. 4 : Morlaix, exp. 5 : Morlaix).

L'analyse à partir des surnageants permet d'abaisser le seuil de détection dans le cas de l'utilisation de la microplaque et des milieux gélosés, respectivement à 15 ou 40 bactéries (microplaquesensemencées avec 2 dilutions, $\frac{1}{2}$ et $\frac{1}{20}$, ou avec 4 dilutions, de $\frac{1}{2}$ à $\frac{1}{2000}$) et à 10 bactéries (filtration de 20 ml de la dilution au $\frac{1}{2}$) par 100 g de sédiment humide.

Dans la plupart des études publiées, les dénombrements des CTT ou des *E. coli* dans les sédiments ont été réalisés de préférence sur des surnageants obtenus par décantation des suspensions de sédiment ou par centrifugation de celles-ci lorsque la technique de numération retenue était la technique sur milieu gélosé (Davies *et al.*, 1995 ; Ferguson *et al.*, 1996 ; Valiela *et al.*, 1991). Cependant, dans quelques études, les suspensions de sédiment ont été analysés directement par filtration sur membrane ou étalement sur des milieux solides (Albinger *et al.*, 1993 ; Derrien *et al.*, 1992). Les suspensions de sédiment sont également analysées directement lorsque les CTT ou les *E. coli* sont recherchés par les techniques NPP en tubes (Grimes, 1980 ; Irvine *et al.*, 1995 ; Martinez-Manzanares *et al.*, 1992 ; Shiaris *et al.*, 1987 ; Skanavis et Yanko, 2001).

Parmi les différentes techniques de numération étudiées dans cette partie de l'étude, la technique par microplaque semble donc la technique la plus adaptée pour dénombrer les *E. coli* dans des sédiments vaseux pour des concentrations bactériennes supérieures à 150 ou 400 bactéries pour 100 g de sédiment humide. Cette technique étant couramment utilisée pour analyser les *E. coli* dans les eaux telles que les eaux de baignade, l'utilisation de cette technique pour les sédiments permet de rechercher les *E. coli* par la même propriété dans ces deux compartiments.

Pour des concentrations supérieures à $1 \cdot 10^3$ bactéries pour 100 g de sédiment humide, la gélose TBX s'est avérée également être une technique intéressante.

Le seuil de détection de la technique en microplaque ou sur gélose solide peut être abaissé en analysant les surnageants obtenus après centrifugation à 500 g pendant 2 minutes des suspensions de sédiment plutôt que celles-ci directement. Les résultats obtenus pourront cependant varier selon le sédiment étudié.

4. Conclusion

Les sédiments analysés au cours de cette étude étaient des **sédiments superficiels** susceptibles d'être contaminés par des bactéries d'origine fécale de par leur localisation : à la sortie du bassin à flot pour les sédiments de Morlaix et à la sortie de la station d'épuration pour les sédiments de St Pol de Léon. Ces sédiments, prélevés lorsqu'ils étaient découverts, se caractérisent par leur **richesse en particules fines** (le diamètre médian des particules étant généralement inférieur à 20 μm pour les sédiments de Morlaix et d'environ 30 μm pour ceux de St Pol de Léon) et leur **teneur en matière organique** (des teneurs en carbone organique total variant de 2,6 à 4,2 % pour ceux de Morlaix et des teneurs plus faibles variant de 2 à 2,4 % pour les sédiments de St Pol de Léon ont été ainsi observées).

Des **concentrations relativement importantes en bactéries fécales** ont été obtenues tout au long de l'étude ; les concentrations en CTT variaient de $3 \cdot 10^4$ à $4 \cdot 10^5$ / 100 g de sédiment humide pour les sédiments provenant de Morlaix et de $6 \cdot 10^4$ à $2 \cdot 10^6$ pour ceux de St Pol de Léon. Ceci a permis d'être au dessus du seuil de détection pour les différentes techniques testées.

L'une des principales difficultés rencontrées lors de l'analyse des sédiments est de dénombrer les bactéries adhérentes aux particules ; les traitements permettant de les décrocher peuvent, en effet, altérer leurs fonctions cellulaires et tout particulièrement leur capacité à cultiver, propriété utilisée pour leur dénombrement. **L'agitation au vortex de 5 minutes à la vitesse maximale** a permis, ici, d'obtenir de meilleurs résultats (généralement plus fortes concentrations et plus faibles variabilités) que les autres traitements (ultrasons, homogénéisation par un broyeur, traitement chimique). Aussi, ce procédé a été retenu pour homogénéiser les sédiments de Morlaix et de St Pol de Léon.

Différentes techniques de numération en milieu liquide ou solide ont été ensuite appliquées pour dénombrer les bactéries fécales. La recherche des *E. coli* par leur activité β -glucuronidase sur **gélose TBX** a donné les résultats les plus reproductibles et les plus faciles à lire parmi les milieux solides testés. Le seuil de détection de cette technique est toutefois de $1 \cdot 10^3$ bactéries par 100 g de sédiment.

Parmi les différentes techniques permettant de dénombrer les *E. coli* dans les sédiments, la **technique NPP par microplaque** semble la plus intéressante. Cette technique a conduit aux résultats les plus reproductibles au cours des principaux essais (écart-types les plus faibles) ; cette technique est, de plus, rapide, sensible et précise. Elle permet de détecter de 150 à 400 bactéries / 100 g de sédiment pour une microplaqueensemencée respectivement par 2 ou 4 dilutions de la suspension de sédiment. Il faut toutefois signaler que dans un des essais, une fluorescence parasite a été observée et a rendu difficile la lecture des microplaques ; des composés présents dans les sédiments tels que les planctons pourraient être éventuellement à l'origine de cette interférence. Cette technique repose sur la détection de la β -glucuronidase bactérienne et la présence de cette enzyme a été également décrite chez des espèces planctoniques potentiellement présentes dans les sédiments (Davies *et al.*, 1996). Il faut toutefois relativiser cette interférence en raison de la nécessité d'une concentration importante en espèces planctoniques possédant cette enzyme et de l'action néfaste de l'incubation prolongée à 44 °C sur ces espèces.

Les concentrations bactériennes peuvent également être déterminées à partir des **surageants** obtenus par décantation des plus grosses particules des suspensions de sédiment. L'analyse des surageants permet de diminuer le seuil de détection des techniques sur milieux solides et par microplaques. La **centrifugation pendant 2 minutes à faible vitesse (500 g)** semble être le procédé le plus adapté pour limiter la charge particulaire sans diminuer de façon importante les concentrations bactériennes. Cependant, des résultats variables peuvent être obtenus selon les sédiments.

En conclusion, cette étude met en évidence l'intérêt de l'utilisation de la technique NPP en microplaque et de la gélose TBX pour dénombrer les *E. coli* dans des sédiments vaseux (relativement riches en particules fines et en matière organique). Les sédiments peuvent être analysés soit directement après dilution, soit après sédimentation des plus grosses particules par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes. Les concentrations sont généralement plus reproductibles dans ce dernier cas mais peuvent être légèrement plus faibles.

Cependant, du fait de la grande variabilité de contamination des sédiments, l'application de ces techniques de numération et des techniques de décrochage des bactéries des particules de sédiment testées dans cette étude peut conduire à des résultats différents sur d'autres sédiments. Il est donc nécessaire de réaliser des essais pour définir le protocole le plus adéquat pour un sédiment particulier.

D'autres techniques telles que l'inclusion en gélose et la technique par impédancemétrie (système Malthus, par exemple) qui n'ont pas été testées dans le cadre de cette étude pourraient être des techniques à envisager dans de futurs essais d'analyse de la contamination bactérienne de sédiments.

5. Références bibliographiques

- Albinger O., 1992. Bacteriological investigations of water and sediment of the river Danube between streamkilometers 16 and 1868 from March, 3rd-17th, 1988. Archives of Hydrobiology Supplement, 84, 115-130.
- Albinger O., 1993. Relationship between number of saprophytic and faecal coliform bacteria and particle size of river sediment. Archives of Hydrobiology Supplement, 101, 23-34.
- An Y. H., Friedman R. J., 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. Journal of Biomedical Materials Research, 43, 338-348.
- Auer M. T., Niehaus S. L., 1993. Modeling fecal coliform bacteria- I. Field and laboratory determination of loss kinetics. Water Research, 27, 693-701.
- Babinchak J. A., Graikoski J. T., Dudley S., Nitkowski M. F., 1977. Distribution of faecal coliforms in bottom sediments from the New York Bight. Marine Pollution Bulletin, 8, 150-153.
- Begstein-Ben Dan T., Stone L., 1991. The distribution of fecal pollution indicator bacteria in lake Kinneret. Water Research, 25, 263-270.
- Begstein-Ben Dan T., Koppel F., 1992. Indicator bacteria for fecal pollution in the littoral zone of lake Kinneret. Water Research, 26, 1457-1469.
- Costeron J. W., Geesey G. G., Cheng K. J., 1978. Comment collent les bactéries ? Pour la Science, 5, 100-110.
- Crabill C., Donald R., Snelling J., Foust R., Southam G., 1999. The impact of sediment fecal coliform reservoirs on seasonal water quality in Oak Creek, Arizona. Water Research, 33, 2163-2171.
- Dale N. G., 1974. Bacteria in intertidal sediments : Factors related to their distribution. Limnology and Oceanography, 19, 509-518.
- Dalton H. M., March P. E., 1998. Molecular genetics of bacterial attachment and biofouling. Current Opinion in Biotechnology, 9, 252-255.
- Davies C. M., Apte S. C., Peterson S. M., Stauber J. L., 1994. Plant and algal interference in bacteria B-D-galactosidase and B-D-glucuronidase assays. Applied and Environmental Microbiology, 60, 3959-3964.
- Davies C. M., Long J. A. H., Donald M., Ashbolt N. J., 1995. Survival of fecal microorganisms in marine and freshwater sediments. Applied and Environmental Microbiology, 61, 1888 -1896.

- Doyle J. D., Tunnicliff B., Kramer R., Kuehl R., Brickler S. K., 1992. Instability of fecal coliform populations in waters and bottom sediments at recreational beaches in Arizona. *Water Research*, 26, 979-988.
- Dupont J., 1995. Performance des méthodes de dénombrement des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux pour le contrôle des eaux de baignade. Programme BCR, 1-54.
- Dye A. H., 1983. A method for the quantitative estimation of bacteria from mangrove sediments. *Estuarine, Coastal and shelf Science*, 17, 207-212.
- Epstein S. S., Rossel J., 1995. Enumeration of sandy sediment bacteria : search for optimal protocol. *Marine Ecology Progress Series*, 117, 289-298.
- Erkenbrecher C. W., 1981. Sediment bacterial indicators in an urban shellfishing subestuary of the lower Chesapeake Bay. *Applied and Environmental Microbiology*, 42, 484-492.
- Ferguson C. M., Coote B. G., Ashbolt N. J., Stevenson I. M., 1996. Relationships between indicators, pathogens and water quality in an estuarine system. *Water Research*, 30, 2045-2054.
- Gauthier M. J., Torregrossa V. M., Babelona M. C., Cornax R., Borrego J. J., 1991. An intercalibration study of the use of 4-methylumbelliferyl-B-D-glucuronide for the specific enumeration of *Escherichia coli* in seawater and marine sediments. *System. Appl. Microbiol.*, 14, 183-189.
- Ghinsberg R. C., Bar Dov L., Rogol M., Sheinberg Y., Nitzan Y., 1994. Monitoring of selected bacteria and fungi in sand and seawater along the Tel Aviv coast. *Microbios*, 77, 29-40.
- Gilbert P., Evans D. J., Brown M. R. W., 1993. Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ. *Journal of Applied Bacteriology Symposium Supplement*, 74, 67-78.
- Grimes D. J., 1980. Bacteriological water quality effects of hydraulically dredging contaminated upper Mississippi river bottom sediment. *Applied and Environmental Microbiology*, 39, 782-789.
- Hernandez J. F., Guibert J. M., Delattre J. M., Oger C., Charriere C., Hughes B., Serceau R., Sinigre F., 1991. Evaluation d'une méthode miniaturisée de dénombrement des *Escherichia coli* en eau de mer, fondée sur l'hydrolyse du 4-méthylumbelliféryl B-D-glucuronide. *Water Research*, 25, 1073-1078.
- Hernandez J. F., Kaspar C. W., Hartman P. A., Colwell R. R., 1993. Microtitration plate most-probable-number tests for the enumeration of *Escherichia coli* in estuarine and marine waters. *Journal of Microbiological Methods*, 18, 11-19.

- Herron P.R., E.M.H. W., 1990. New method for extraction of streptomycete spores from soil and application to the study of lysogeny in sterile amended and nonsterile soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1406-1412.
- Irvine K. N., Pettibone G. W., 1993. Dynamics of indicator bacteria populations in sediment and river water near a combined sewer outfall. *Environmental Technology*, 14, 531-542.
- Kuwae T., Hosokawa Y., 1999. Determination of abundance and biovolume of bacteria in sediments by dual staining with 4', 6-diamidino-2-phenylindole and acridine orange : relationship to dispersion treatment and sediment characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 3407-3412.
- Lindahl V., Bakken L. R., 1995. Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 16, 135-142.
- Lucas F., Meziane T., Bertru G., Retière C., 1996. Bactéries du sédiment : extraction et distribution sur un estran (baie du Mont-Saint-Michel). *C.R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie/Life sciences*, 319, 537-542.
- Mac Daniel J. A., Capone D. G., 1985. A comparison of procedures for the separation of aquatic bacteria from sediments for subsequent direct enumeration. *Journal Of Microbiological Methods*, 3, 291-302.
- Mac Donalds R. M., 1986. Sampling soil microfloras : dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms from suspension by elutriation. *Soil Biology and Biochemistry*, 18, 399-406.
- Manafi M., 2000. New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology*, 60, 205-218.
- Marino R. P., Gannon J. J., 1991. Survival of fecal coliforms and fecal Streptococci in storm drain sediment. *Water Research*, 25, 1089-1098.
- Martinez Manzanares E., Morinigo M. A., Castro D., Balebona M. C., Sanchez J. M., Borrego J. J., 1992. Influence of the faecal pollution of marine sediments on the microbial content of shellfish. *Marine Pollution Bulletin*, 24, 342-349.
- Montagna P. A., 1982. Sampling design and enumeration statistics for bacteria extracted from marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 43, 1366-1372.
- Morton L. H. G., Greenway D. L. A., Gaylarde C. C., Surman S. B., 1998. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 41, 247-259.
- Pettibone G. W., 1992. The use of lauryl tryptose broth containing 4-methylumbelliferyl- beta -D-glucuronide (MUG) to enumerate *Escherichia coli* from freshwater sediment. *Letter in Applied Microbiology*, 15, 190-192.

- Schallenberg M., Kalff J., 1993. The ecology of sediment bacteria in lakes and comparisons with other aquatic ecosystems. *Ecology*, 74, 919-934.
- Shiaris M. P., Rex A. C., Pettibone G. W., Keay K., Mac Manus P., Rex M. A., Ebersole J., Gallagher E., 1987. Distribution of indicator bacteria and *Vibrio parahaemolyticus* in sewage-polluted intertidal sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 1756-1761.
- Skanavis C., Yanko W. A., 2001. *Clostridium perfringens* as a potential indicator for the presence of sewage solids in marine sediments. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 31-35.
- UNEP/WHO, 1995. Determination of faecal coliforms in sediments by the pour plate (PP) method. Reference methods for marine pollution studies, UNEP, Geneva, 47 (Rev. 1),
- Valiela I., Alber M., La Montagne M., 1991. Fecal coliform loadings and stocks in Buttermilk Bay, Massachusetts, USA, and management implications. *Environmental Management*, 15, 659-674.
- Velji M. I., Albright L. J., 1986. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter, and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. *Canadian Journal of Microbiology*, 32, 121-126.
- Vernozy-Rozand C., Montet M.P., 2001. *Escherichia coli* O157:H7. Monographies de microbiologie. Editions Tec & Doc, Lavoisier, 135 p.
- Weiskel P. K., Howes B. L., Heufelder G. R., 1996. Coliform contamination of a coastal embayment: Sources and transport pathways. *Environmental Science and Technology*, 30, 1872-1881.
- West P. A., 1988. An improved procedure for shipboard enumeration of faecal indicator bacteria in marine sediments from sewage sludge disposal areas. *Journal of Applied Bacteriology*, 64, 345-353.

6. Remerciements

Nous remercions les différentes personnes du laboratoire DEL/MIC qui ont participé aux analyses microbiologiques et Denise Guillerm pour la mise en pages du rapport. Nous remercions également Philippe Cann pour la réalisation des analyses granulométriques, Xavier Philippon pour les analyses de COT et Philippe Bassoullet pour ses conseils et commentaires sur la granulométrie des sédiments. Enfin, un grand merci à Martial Catherine, Jacques Dupont et Laurence Miossec pour la relecture du rapport et les remarques apportées.

7. Annexes

Annexe I

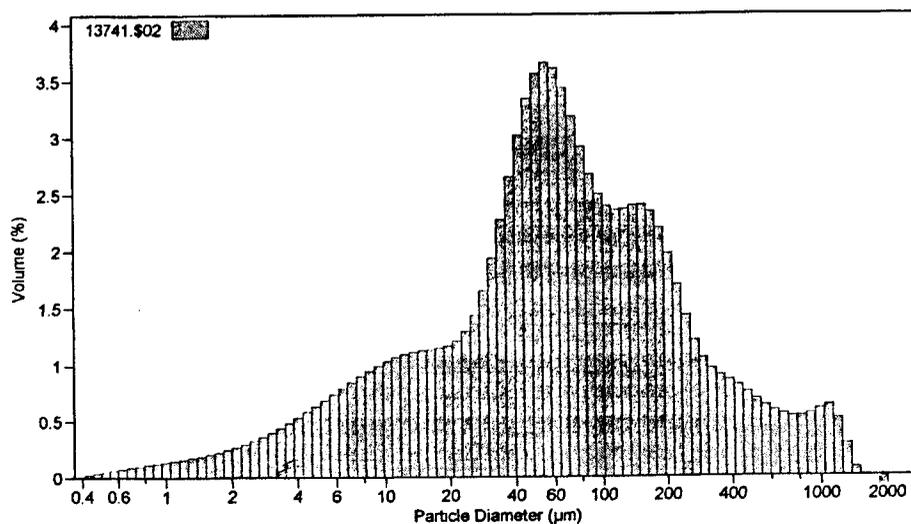
Techniques de décrochage	Suspensions analysées	Fluoro chromes	Types de sédiment	Références
Broyeur WB, 23000 rpm, 5 minutes	Simple dilution	AO	Sédiments (estran) diamètre moyen : 8 à 211 µm	Dale, 1974
- Broyeur Sorval, 16000 rpm, 30, 60, 90 et 120 s - US, 24 kHz, 30 à 120 s	Simple dilution	AO	Vases	Dye, 1983
Broyeur WB, 23000 rpm, 1 à 16 min : 10 min	Simple dilution	AO	Vases Sables	Montagna, 1982
- Agitation magnétique - Triton X100 (0,1 mM, surfactant) - Sodium periodate (50 mM, oxydant) + sodium pyrophosphate (50 mM, chélateur) - Broyeur, 20000 rpm, 1 min - Sonde à US, 20 kHz, 900 W, 1 min.	Simple dilution	AO	Vases (estran)	Mc Daniel et Capone, 1985
Tétrasodium pyrophosphate (0,01 M, dispersant), avec ou sans Tween 80 (5 à 10 mg l ⁻¹), 15 à 30 minutes + sonde à US, 100 W, 30 à 60 s	Simple dilution	Dapi	Sédiments marins	Velji et Albright, 1986, 1993
- Broyeur WB, vitesse maximale, 3 x 1min (grands volumes) ou Drill-gun, 2600 rpm, 3 x 1 min (petits volumes) - Sonde à US, 40 ou 55 W, 15 à 45 s - Mélange chimique, 2 h à 4 °C : chelex (200 g l ⁻¹), désococholate de sodium (1 g l ⁻¹), polyéthylène glycol (25 g l ⁻¹)	Surnageant sédimentation 30 s centrifugation 1000 g, 10 min centrifugation 9000 g, 6 min (Nycodenz 1,3 g l ⁻¹)	AO	Sol	Lindahl et Bakken, 1995

Techniques de décrochage	Suspensions analysées	Fluoro chromes	Types de sédiment	Références
1) Pré-traitement, 15 min : - Tween 80, (1 mg l ⁻¹), - sodium pyrophosphate (0,266 g l ⁻¹) 2) Traitement (x 3 ; entre 2 : sédimentation 1 min et remplacement du surnageant) - broyeur WB, 16000 rpm, 30 s à 480 s - cuve à US, 80 W, 3 à 90 min - sonde à US, 5 mm, 100 W, 3 à 390 s : 180 s	Surnageant centrifugation 500 g, 5 min	Dapi	Sable marin (180 µm)	Epstein et Rossel, 1995
- Agitation magnétique 30 min, 150 rpm dans * tampon phosphate, * mélange chimique : désoxycholate de sodium (1 g.l⁻¹) polyéthylène glycol (25 g l⁻¹) et chelex 100 (20 g l⁻¹), * solution de hexamétaphosphate de sodium, 2 g l ⁻¹ (calgon) ou * Triton X 100 1 g l ⁻¹ , - US, 47 kHz, 20 min * dans du tampon phosphate ou * dans du pyrophosphate de tétrasodium (0,1 M).	Surnageant centrifugation 600 g, 15 min	AO	Sédiments Diamètre moyen 78 à 195 µm	Lucas <i>et al.</i> , 1996
1) pré-traitement : Tween 80 1 mg l ⁻¹ , > 15 minutes 2) traitement - Cuve à US 5 à 60 min - Sonde à US, 100 W, 0,5 à 8 min - Broyeur, 20000 rpm, 0,5 à 8 min.		Dapi AO	Sables Vases	Kuwaie et Hosokawa, 1999

Tableau AI : Techniques de décrochage des bactéries des particules appliquées avant dénombrement de ces cellules au microscope à épifluorescence (bactéries totales) dans différentes études. En gras, les techniques les plus efficaces dans l'étude citée. Abréviations : AO : acridine orange, WB : Waring blender.

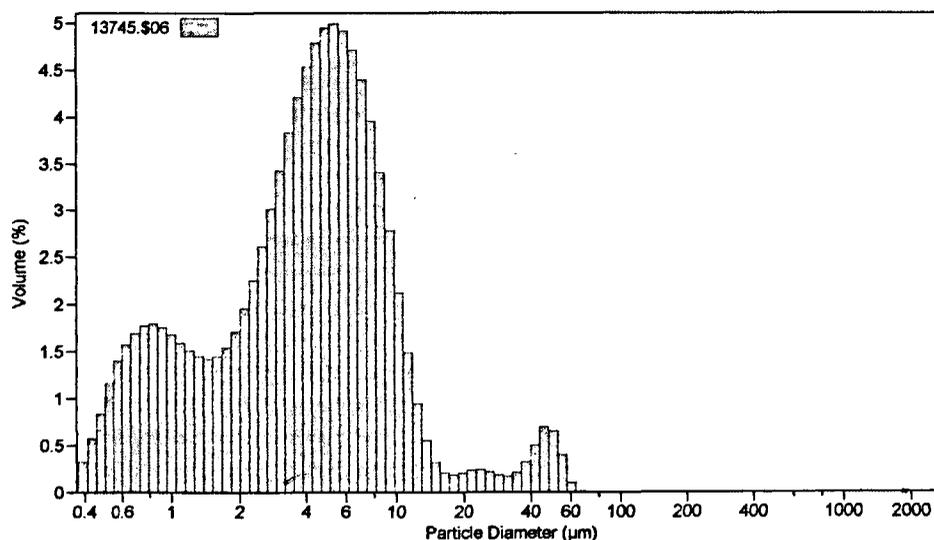
Annexe II

1) Spectres granulométriques des sédiments étudiés dans la partie 321 : les techniques de décrochage des bactéries des particules de sédiment



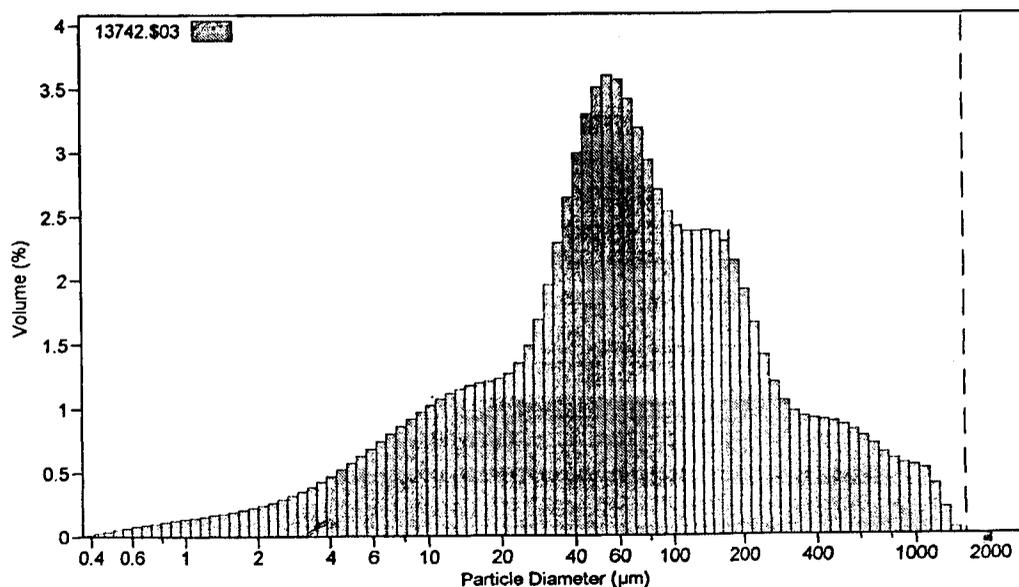
Volume Statistics (Arithmetic) 13741.S02
 Calculations from 0.375 µm to 2000 µm
 Volume : 100 %
 Mean : 136.3 µm S.D. : 212.1 µm
 Median : 61.99 µm C.V. : 156 %
 Mode : 55.13 µm

Figure A1 : Spectre granulométrique du sédiment de St Pol de Léon (décrochage 3)



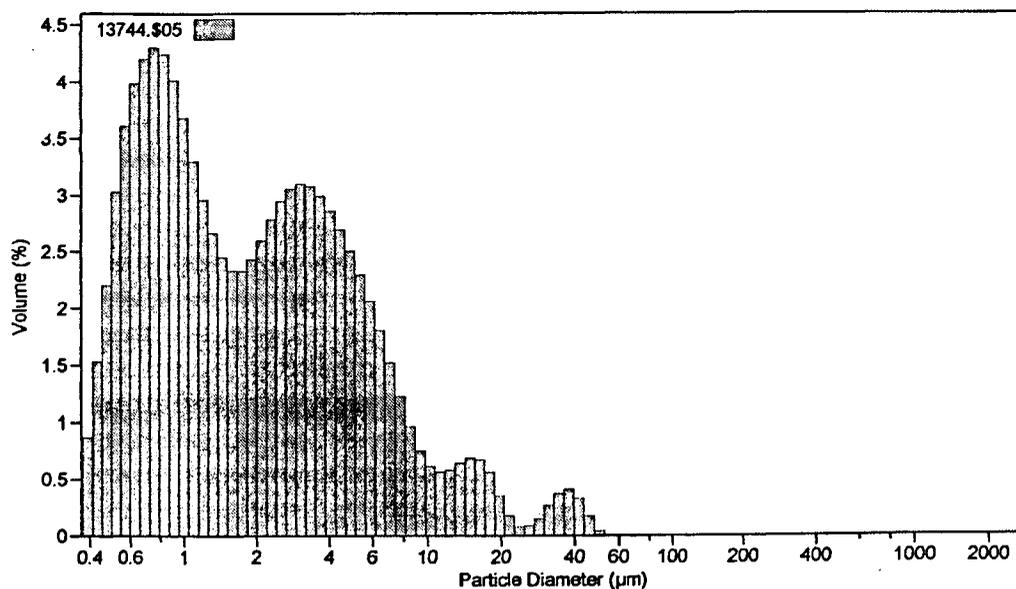
Volume Statistics (Arithmetic) 13745.S06
 Calculations from 0.375 µm to 2000 µm
 Volume : 100 %
 Mean : 5.910 µm S.D. : 8.032 µm
 Median : 4.147 µm C.V. : 136 %
 Mode : 5.354 µm

Figure A2 : Spectre granulométrique du surnageant obtenu par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes à partir d'une dilution au 1/2 du sédiment de St Pol de Léon (décrochage 3).



Volume Statistics (Arithmetic) 13742.S03
 Calculations from 0.375 µm to 2000 µm
 Volume : 100 %
 Mean : 137.6 µm S.D. : 206.9 µm
 Median : 62.82 µm C.V. : 150 %
 Mode : 55.13 µm

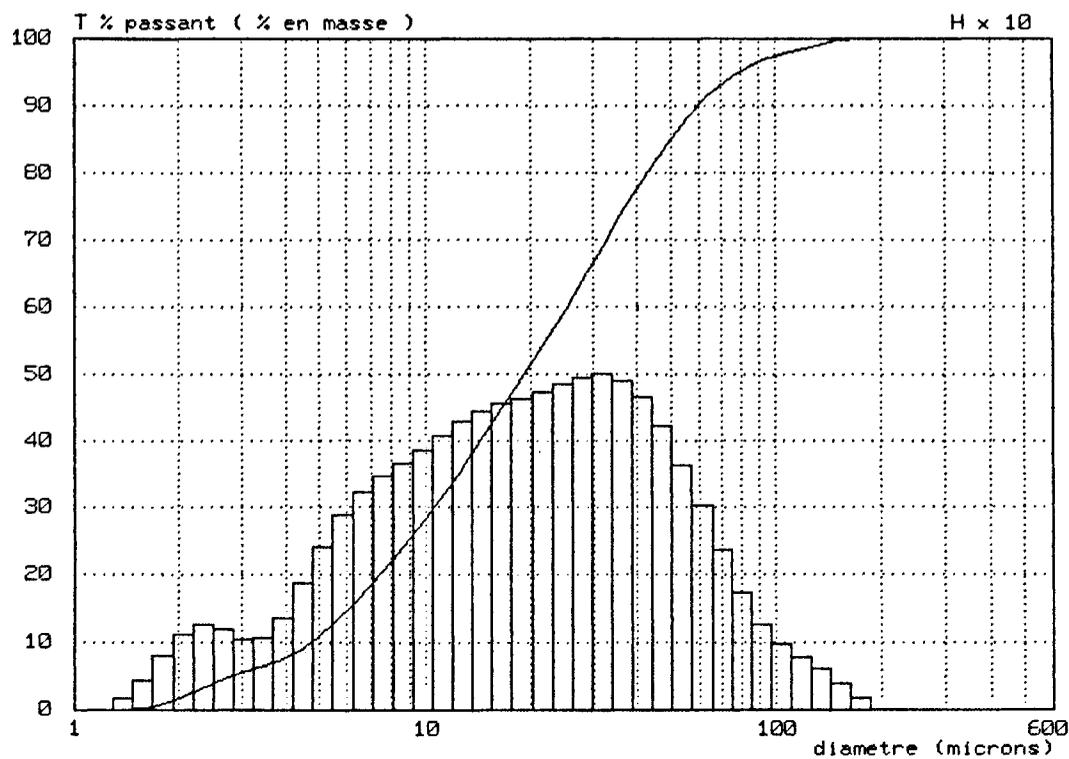
Figure A3 : Spectre granulométrique du sédiment de St Pol de Léon (décrochage 4)



Volume Statistics (Arithmetic) 13744.S05
 Calculations from 0.375 µm to 2000 µm
 Volume : 100 %
 Mean : 3.567 µm S.D. : 5.695 µm
 Median : 1.715 µm C.V. : 160 %
 Mode : 0.755 µm

Figure A4 : Spectre granulométrique du surnageant obtenu par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes à partir d'une dilution au 1/2 du sédiment de St Pol de Léon (décrochage 4).

2) Spectres granulométriques des sédiments étudiés dans la partie 322 : les techniques de numérations



Diamètre médian : 19.17 microns
 Diamètre à T = 25 % : 8.92 microns et T = 75 % : 37.40 microns

Figure A5 : Spectre granulométrique du sédiment de St Pol de Léon (numération 3)

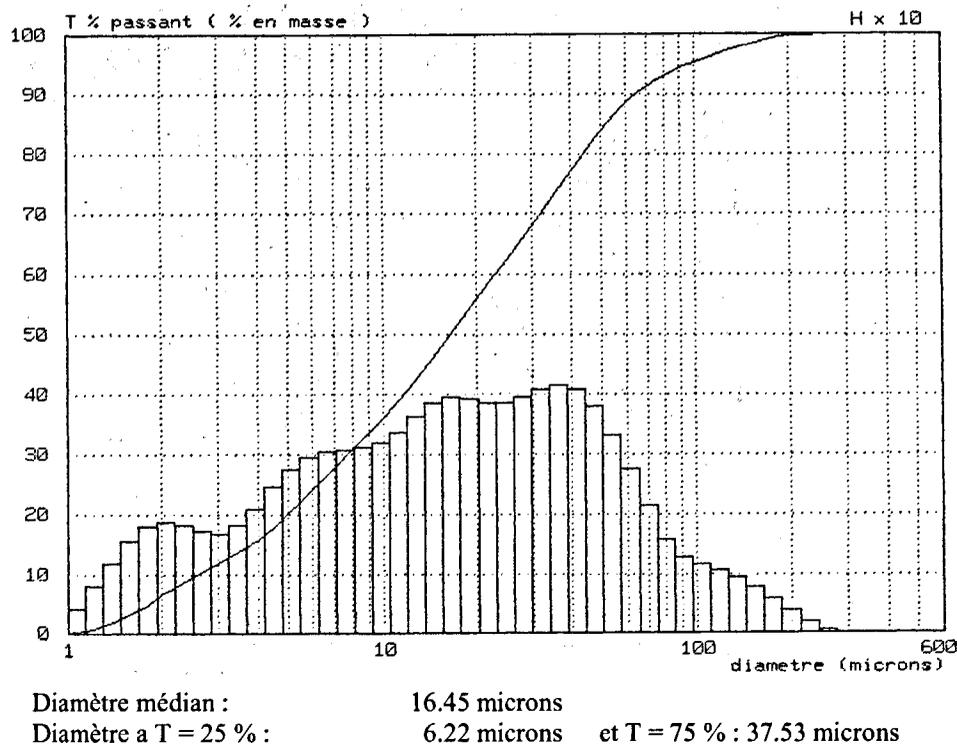


Figure A6 : Spectre granulométrique du sédiment de Morlaix (numération 4)

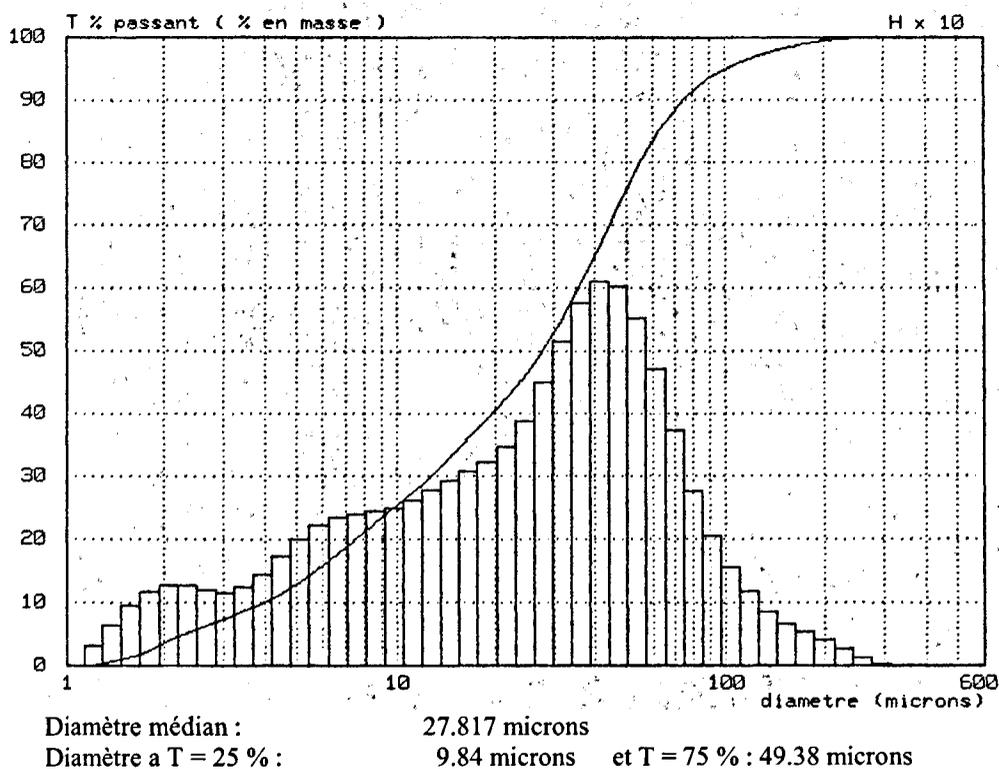


Figure A7 : Spectre granulométrique du sédiment de St Pol de Léon (numération 4)

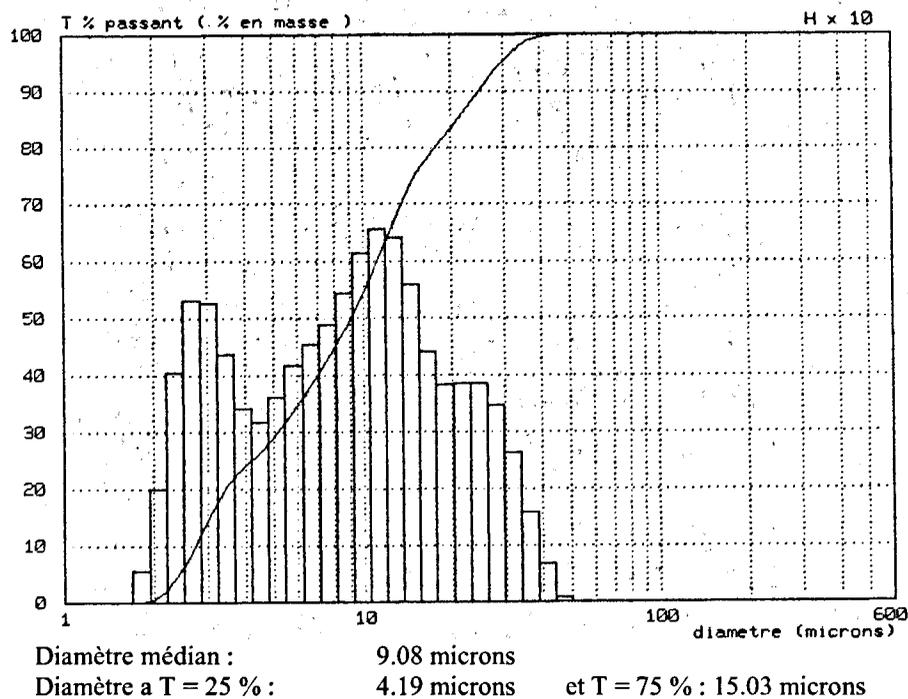


Figure A8 : Spectre granulométrique du surnageant obtenu par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes à partir d'une dilution au 1/2 du sédiment de Morlaix (numération 4).

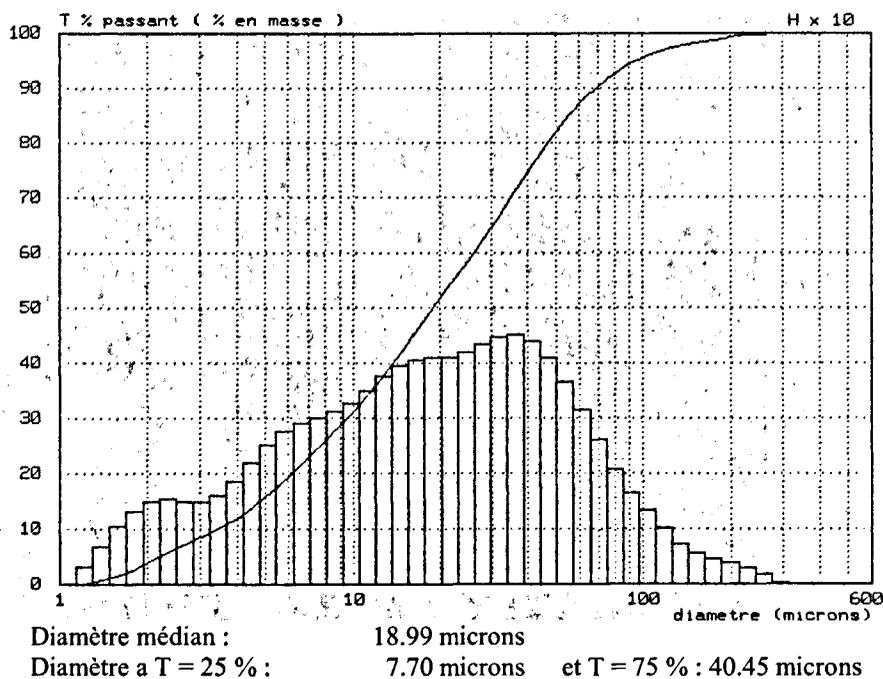


Figure A9 : Spectre granulométrique du culot obtenu par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes à partir d'une dilution au 1/2 du sédiment de Morlaix (numération 4).

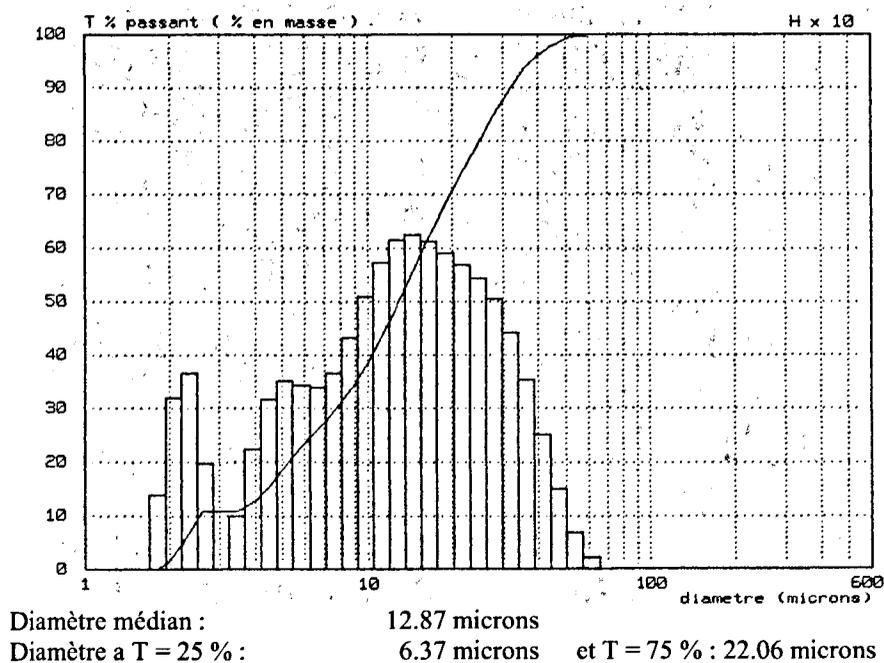


Figure A10 : Spectre granulométrique du surnageant obtenu par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes à partir d'une dilution au 1/2 du sédiment de St Pol de Léon (numération 4).

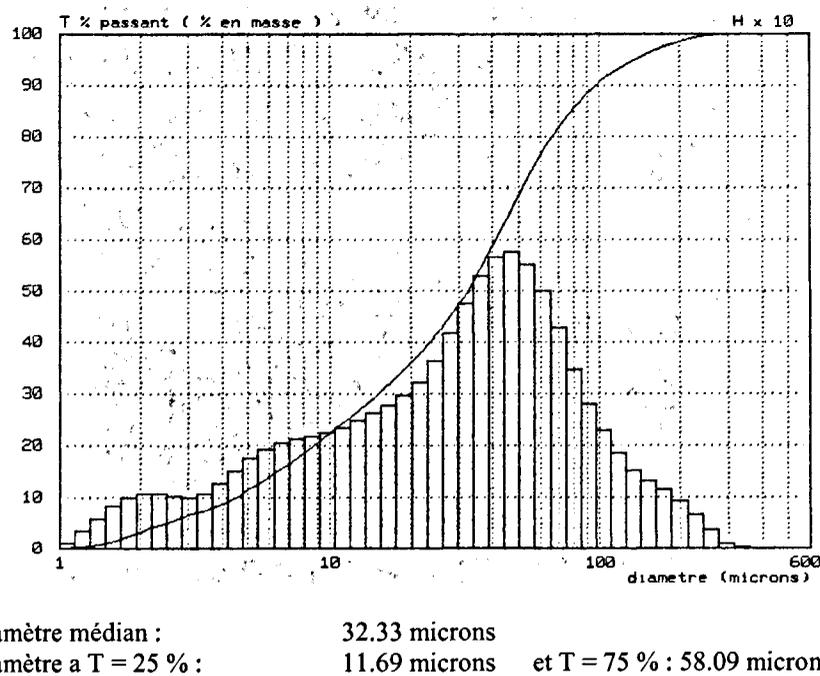
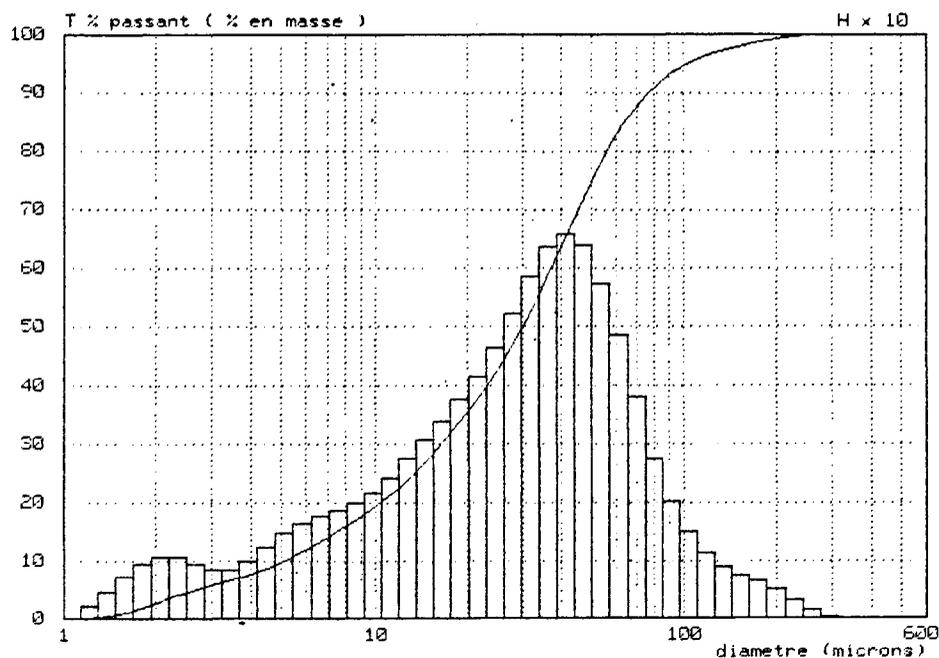
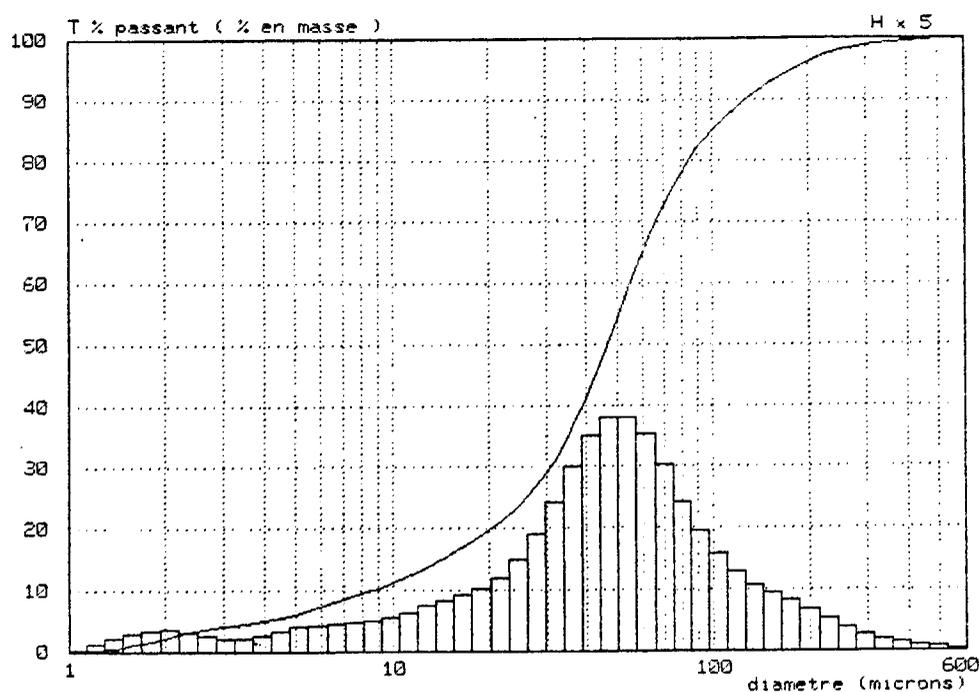


Figure A11 : Spectre granulométrique du culot obtenu par centrifugation à 500 g pendant 2 minutes à partir d'une dilution au 1/2 du sédiment de St Pol de Léon (numération 4).



Diamètre médian : 30.11 microns
 Diamètre a T = 25 % : 13.33 microns et T = 75 % : 50.19 microns

Figure A12 : Spectre granulométrique du sédiment de Morlaix (numération 5).



Diamètre médian : 46.65 microns
 Diamètre a T = 25 % : 26.19 microns et T = 75 % : 73.48 microns

Figure A13 : Spectre granulométrique du sédiment de St Pol de Léon (numération 5).

Annexe III : Résultats des analyses de variance

3.2.1 Les techniques de décrochage des bactéries

Première expérimentation (décrochage 1, Morlaix ; 3.2.1.2)

Analysis of Variance for log N - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:traitements	1,3319	5	0,266381	4,86	0,0018
B:susp. tot./ surnageant	1,78737	2	0,893683	16,31	0,0000
INTERACTIONS					
AB	1,06041	10	0,106041	1,93	0,0732
RESIDUAL	1,91813	35	0,0548038		
TOTAL (CORRECTED)	6,00395	52			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of log N into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on log N at the 95,0% confidence level.

Deuxième expérimentation (décrochage 2, Morlaix ; 3.2.1.3)

Analysis of Variance for log N - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:traitements	1,72301	4	0,430751	16,44	0,0000
B:susp. tot./surnageant	0,00326233	1	0,00326233	0,12	0,7254
C:opérateurs	0,469909	2	0,234955	8,97	0,0004
INTERACTIONS					
AB	0,19564	4	0,04891	1,87	0,1273
AC	0,706176	8	0,088272	3,37	0,0028
BC	0,295621	2	0,147811	5,64	0,0056
RESIDUAL	1,65068	63	0,0262012		
TOTAL (CORRECTED)	5,19737	84			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of log N into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 4 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on log N at the 95,0% confidence level.

Troisième expérimentation (décrochage 3, St Pol de léon ; 3.2.1.4)

Analysis of Variance for log N - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:traitements	24,1297	9	2,68107	74,55	0,0000
B:susp. tot. / surnageant	1,43291	1	1,43291	39,85	0,0000
C:opérateurs	1,51365	2	0,756824	21,05	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,738491	9	0,0820546	2,28	0,0204
AC	1,82711	18	0,101506	2,82	0,0003
BC	0,130474	2	0,0652372	1,81	0,1669
RESIDUAL	4,96273	138	0,0359618		
TOTAL (CORRECTED)	34,735	179			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of log N into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 5 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on log N at the 95,0% confidence level.

Quatrième expérimentation (décrochage 4, St Pol de Léon ; 3.2.1.5)

Analysis of Variance for log N - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:traitements	4,84143	6	0,806904	12,44	0,0000
B:susps. tot. / surnageant	0,359467	1	0,359467	5,54	0,0203
INTERACTIONS					
AB	0,670316	6	0,111719	1,72	0,1222
RESIDUAL	7,26562	112	0,0648716		
TOTAL (CORRECTED)	13,1368	125			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of log N into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on log N at the 95,0% confidence level.

3.2 .2 Techniques de numération

Première expérimentation (numération 1, Morlaix ;3.2.2.2)

Analysis of Variance for log N - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:méthodes	0,699717	2	0,349858	10,03	0,0007
B:sédiments	2,19108	3	0,730358	20,93	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,335417	6	0,0559028	1,60	0,1898
RESIDUAL	0,837467	24	0,0348944		
TOTAL (CORRECTED)	4,06367	35			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of log N into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on log N at the 95,0% confidence level.

Deuxième expérimentation (numération 2, Morlaix ; 3.2.2.3)

Analysis of Variance for log N - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:méthodes	2,2854	2	1,1427	9,29	0,0005
B:susp. tot. / surnageant	0,120417	1	0,120417	0,98	0,3285
C:sédiments	0,38827	2	0,194135	1,58	0,2191
INTERACTIONS					
AB	0,1591	2	0,07955	0,65	0,5293
AC	0,634119	4	0,15853	1,29	0,2909
BC	0,515078	2	0,257539	2,09	0,1366
RESIDUAL	4,92242	40	0,123061		
TOTAL (CORRECTED)	9,02481	53			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of log N into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since one P-value is less than 0,05, this factor has a statistically significant effect on log N at the 95,0% confidence level.

Troisième expérimentation (numération 3, Morlaix ; 3.2.2.4)

Analysis of Variance for log N - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:méthodes	1,58388	3	0,527961	7,49	0,0003
B:susp; tot./surnageant	4,54511	1	4,54511	64,52	0,0000
C:sédiments	0,289675	2	0,144837	2,06	0,1379
INTERACTIONS					
AB	0,179604	3	0,0598681	0,85	0,4728
AC	0,365247	6	0,0608745	0,86	0,5272
BC	0,191725	2	0,0958625	1,36	0,2651
RESIDUAL	3,80404	54	0,0704452		
TOTAL (CORRECTED)	10,9593	71			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of log N into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 2 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on log N at the 95,0% confidence level.

Quatrième expérimentation (numération 4, Morlaix et St Pol de Léon ; 3.2.2.5)

Analysis of Variance for log N - Type III Sums of Squares

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
MAIN EFFECTS					
A:méthodes	0,0000260417	1	0,0000260417	0,00	0,9623
B:sédiments	0,146484	1	0,146484	12,63	0,0006
C:susp. tot./surnageant	0,812176	1	0,812176	70,01	0,0000
INTERACTIONS					
AB	0,016801	1	0,016801	1,45	0,2320
AC	0,0142594	1	0,0142594	1,23	0,2706
BC	0,280584	1	0,280584	24,19	0,0000
RESIDUAL	1,03247	89	0,0116008		
TOTAL (CORRECTED)	2,3028	95			

All F-ratios are based on the residual mean square error.

The StatAdvisor

The ANOVA table decomposes the variability of log N into contributions due to various factors. Since Type III sums of squares (the default) have been chosen, the contribution of each factor is measured having removed the effects of all other factors. The P-values test the statistical significance of each of the factors. Since 3 P-values are less than 0,05, these factors have a statistically significant effect on log N at the 95,0% confidence level.

Annexe IV : Complément sur les sédiments

L'ensemble des résultats obtenus sur la caractérisation des sédiments est présenté ci-dessous.

Expérience	COT (%)	Poids sec (%)	Teneur en eau (% / sec)	Concentration (kg.m ⁻³)	Diamètre médian (µm)	Diamètre maximum (µm)	Localisation
Partie décrochage							
Sédiment 1	ND*	35,80	179	1192	ND	ND	Morlaix
Sédiment 2	4,22	35,23	184	1277	ND	ND	Morlaix
Sédiment 3 Surn. 3	2,28	56,45	77	1482	61,99+ 4,15	63	St Pol de Léon
Sédiment 4 Surn. 4	2,26	59,48	68	1541	62,82+ 1,71	<60	St Pol de Léon
Partie numérations							
Sédiments 1	ND	34,71	188	1212			Morlaix <i>Ecluse</i> <i>St François</i>
	ND	46,24	116	1393			<i>Lannuguy</i> <i>Bassin</i>
	ND	47,21	112	1422			
	ND	24,77	304	1175			
Sédiment 2	3,80	30,6	226	1279			Morlaix <i>Ecluse</i>
Sédiment 3	3,13	38,33	161	1304	19,17	175	Morlaix <i>Ecluse</i>
Sédiment 4 Surn. 4 Culot 4	3,96	45,33	121,56	1269	16,45 9,08 18,99	250 45	Morlaix <i>Ecluse</i>
Sédiment 4' Surn. 4' Culot 4'	2,42	54,21	84,46	1551	27,87 12,87 32,33	280 63	St Pol de Léon
Sédiment 5	2,65	39,9	150,54	1355	30,11*	250*	Morlaix <i>Ecluse</i>
Sédiment 5	2,03	50,93	96,36	1458	46,65*	500*	St Pol de Léon

Tableau A2 : Caractéristiques des sédiments analysés. Surn : surnageant obtenu après agitation au vortex de 5 minutes de la suspension au 1/2 et centrifugation à 500 g pendant 2 minutes, COT, teneur en carbone organique total, diamètre médian et maximal obtenu lors de l'analyse granulométrique de la fraction des particules inférieures à 500 µm ; ND : non déterminé, * analyse granulométrique après tamisage par voie humide et séchage des sédiments, + analyse granulométrique de la fraction inférieure à 2 mm.

Les différents sédiments prélevés à Morlaix et à St Pol de Léon étaient des sédiments superficiels. Ces sédiments ont été prélevés principalement à marée basse lorsqu'ils étaient découverts et à des périodes différentes de l'année. Les sédiments testés se distinguaient principalement par le fait qu'ils provenaient de deux localisations différentes : Morlaix en aval du bassin à flot et St Pol de Léon à la sortie de la station d'épuration.

Les sédiments de Morlaix étaient généralement plus riches en matière organique : les valeurs en COT étaient plus élevées. Ces sédiments étaient plus riches en eau : la teneur pouvant toutefois varier d'un prélèvement à l'autre et étaient moins concentrés que les sédiments de St Pol de Léon. Les variations observées dans la composition des sédiments peuvent être expliquées par le fait que les prélèvements ont été réalisés à des périodes différentes de l'année et sous des conditions météorologiques différentes. Les sédiments de Morlaix étaient plus sujets à des lessivages par les pluies que ceux de St Pol de Léon.

L'analyse granulométrique a montré une distribution des particules différente selon l'origine des sédiments : la distribution des sédiments de Morlaix avait tendance à suivre une courbe bimodale avec un pic argileux (particules inférieures à 4 μm) ; la distribution des sédiments de St Pol de Léon plutôt à suivre une courbe unimodale décalée vers les silts grossiers aux sables très fins (voir annexe II).

Des relations entre les concentrations en CTT et les teneurs en carbone organique des sédiments ou les diamètres médians des particules de la fraction inférieure à 500 μm ont été recherchées. En raison du faible nombre de données, il est toutefois difficile de mettre en évidence une relation entre ces différents paramètres (fig. A14). Une corrélation positive entre les concentrations en CTT et la teneur en COT des sédiments et négative entre les concentrations en CTT et le diamètre des particules n'a pas été mise en évidence dans cette étude contrairement aux résultats généralement présentés dans la littérature (Albinger, 1992 ; Irvine *et al.*, 1995 ; Shiaris *et al.*, 1987). Le faible nombre de données et les variations des conditions météorologiques, des apports peuvent expliquer cette absence de relation.

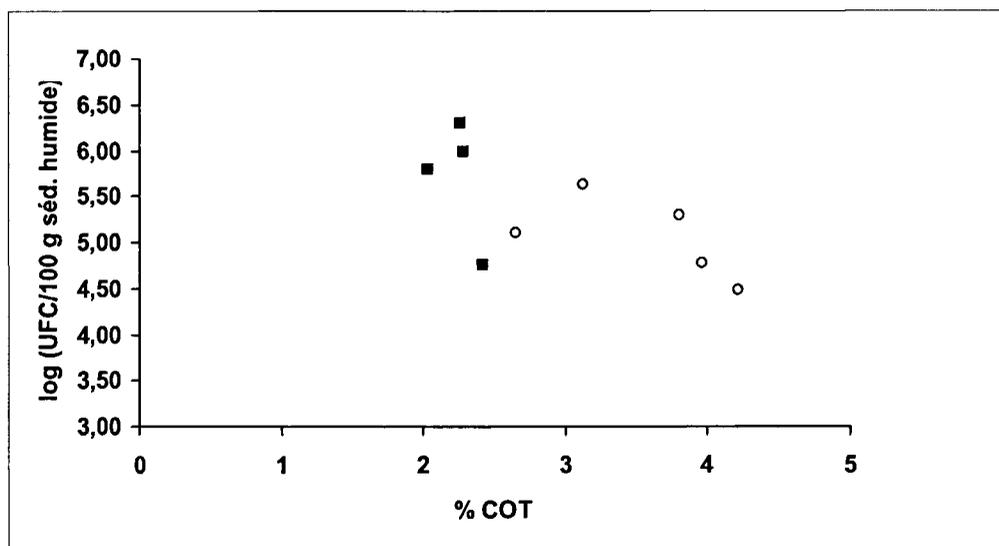


Figure A14 : Relation entre les concentrations en CTT des sédiments de Morlaix (O) et de St Pol de Léon (■) obtenues sur géloses Mac Conkey et la teneur en carbone organique total du sédiment (COT en %).