

## 60

### COMPARAISON DE MÉTHODES DIRECTES (MICROSCOPIQUES) ET INDIRECTES (PAR MISE EN CULTURE) DANS L'ÉVALUATION D'UNE POLLUTION BACTÉRIENNE D'ORIGINE FÉCALE. ÉTUDE PRÉLIMINAIRE

P. MUNRO et M. BIANCHI

Microbiologie Marine CNRS E.R. 223, Université de Provence, place Victor-Hugo  
13331 MARSEILLE (FRANCE)

**RÉSUMÉ** - Les dénombrements de bactéries dans des suspensions cellulaires des sérotypes O26B6 et O111B4 de l'espèce *Escherichia coli* ont été réalisés par deux méthodes microscopiques (épi-fluorescence et immunofluorescence) ainsi que par mise en culture sur milieu spécifique. Si les deux méthodes microscopiques donnent des résultats identiques, les valeurs fournies par mise en culture sont inférieures d'une puissance de 10. Dans une eau de mer polluée par le rejet d'un collecteur urbain, les comptages en microscopie en épi-fluorescence fournissent les valeurs les plus élevées. Mais, dans ce cas, le comptage en immunofluorescence est inférieur d'une puissance de 10 au nombre de bactéries se développant sur milieu sélectif. La diversité des espèces bactériennes de l'eau de mer, d'une part, la restriction aux sérotypes "pathogènes" de l'espèce *E. coli*, d'autre part, expliquent cette différence. Des problèmes techniques dus à la filtration nécessitent des travaux ultérieurs quand à l'application de la technique d'immunofluorescence dans le milieu naturel.

**Mots clés** : bio-indicateur, pollution fécale, immunofluorescence, épi-fluorescence.

**ABSTRACT** - Cells of two serotypes of *Escherichia coli* (O26B6 and O111B4) were counted using epifluorescence and immunofluorescence microscopy (nonavalent serum) and plate count on specific medium. Values from indirect counts were 10 fold smaller than those from both microscopic counts. In a sample of sea water from an area receiving a fecal pollution, the highest number of bacteria was obtained by epifluorescence microscopy. In that case, the number of cells counted by immunofluorescence microscopy was 10 fold smaller than the number of bacteria able to grow on the medium. It could be due to : the diversity of the natural community, the possibility to other bacteria than *E. coli* to grow on the used culture medium, the restrictiveness of the serum for "pathogenic serotypes".

**Key words** : bio-indicator, fecal pollution, epifluorescence count, immunofluorescence count.

### INTRODUCTION

Dans le domaine de la surveillance de la qualité des eaux de baignade, les analyses bactériologiques préconisées (Association française de normalisation, 1979) reposent principalement sur un dénombrement de l'ensemble des micro-organismes à diverses températures, et plus particulièrement, un dénombrement des coliformes par mise en culture sur milieux sélectifs. Ainsi, ces contrôles et les normes qui en découlent, sont basés sur une étude plus quantitative que qualitative de la microflore présente dans les eaux surveillées. De plus, par leur principe même, le temps de réponse de ces analyses est souvent trop long, et ne permet donc de réagir assez vite pour faire face à un risque potentiel de contamination. De ce fait, la surveillance actuelle des eaux de baignade semble de moins en moins satisfaisante et adaptée aux risques sanitaires réels.

C'est pour ces raisons que depuis quelques années, de nombreuses recherches sont

effectuées pour mettre au point de nouvelles méthodes d'estimation de la pollution bactérienne, plus rapides et plus fiables.

L'estimation du nombre total des bactéries dans l'eau et les sédiments s'effectue par comptage en microscopie à épifluorescence (Hobbie et coll., 1977). Mais l'absence de toute possibilité d'identification des coliformes dans les échantillons par simple observation microscopique, ne permet pas une réelle évaluation des risques encourus.

D'autres méthodes, spécifiques d'espèces données, faisant appel à des milieux sélectifs, ont également été mises au point. Ainsi, de nouvelles techniques de dénombrement, d'isolation, et d'identification ont été recherchées en vue d'utiliser les vibrions comme indicateurs de risques sanitaires potentiels des eaux de baignade (Colwell et Kaper, 1977). Ces méthodes demeurent toutefois lourdes d'utilisation, et, comme toutes celles nécessitant des cultures microbiennes, donnent des résultats dans des délais trop longs dans les cas de pollution accidentelle.

Enfin, plus récemment, une méthode, basée sur des techniques immunologiques, commence à faire l'objet de recherches préliminaires d'une éventuelle application à la surveillance de l'environnement. Cette méthode de comptage direct en immunofluorescence (Huai-Shu Xu et coll. 1982, Dahle et coll., 1982), encore assez peu employée dans le milieu naturel, est, de par son principe, hautement spécifique indiquant la présence de bactéries pathogènes d'une espèce bien identifiée et non par la présence d'un groupe plus ou moins bien défini comme les coliformes fécaux ou totaux. De plus, cette méthode microscopique fournit des résultats dans un délai très court, et permet de signaler quasi instantanément après le prélèvement les zones polluées par les bactéries pathogènes.

Ce travail présente les résultats d'une étude préliminaire de comparaison des différentes méthodes de comptage : une série sur des souches pures d'*Escherichia coli* pathogènes mises en suspension dans une eau de mer, une série sur un échantillon d'eau de mer littorale soumise à une pollution fécale (débouché du grand émissaire de la ville de Marseille).

## **MATÉRIEL ET MÉTHODES**

L'eau de mer littorale a été prélevée en surface, à quelques mètres de la sortie de l'égout, à l'aide d'un récipient stérile. L'aliquote destinée à l'étude microscopique a été formolée dès la remontée à bord, de même que l'ensemencement des milieux de comptage. L'eau ainsi prélevée présentait une salinité de 33 ‰ et 37,13  $\mu\text{atg N-NH}_4/\text{l}$ . La température était de 11,5 °C.

### ***Les comptages indirects par mise en culture de l'échantillon.***

La microflore hétérotrophe "totale marine" a été dénombrée sur gélose nutritive (Mérieux) dont le diluant est composé de 3/4 d'eau de mer vieillie et de 1/4 d'eau distillée, la température d'incubation est de 20°C et le temps d'incubation de 15 jours. La microflore hétérotrophe "totale" capable de croître en absence de NaCl a été dénombrée sur la même gélose nutritive (Mérieux) diluée avec de l'eau distillée et incubée dans les mêmes conditions. Les coliformes totaux et les coliformes fécaux sont cultivés sur la gélose éosine bleu de méthylène (Mérieux), incubée respectivement à 37°C et à 44,5°C, la lecture s'effectuant au bout de 24 et 48 heures.

### ***Les comptages directs par microscopie en épifluorescence.***

La méthode est celle de Hobbie et coll., 1977. Un volume connu d'échantillon, fixé au

formaldéhyde (10 %), est filtré, après homogénéisation (passage dans un bain à ultra-sons pendant cinq minutes) sur une membrane Nucléopore de 0.2  $\mu\text{m}$  de porosité et de 25 mm de diamètre, préalablement colorée en noir par trempage dans un bain d'Irgalan black (2 g/l d'eau à 2 % d'acide acétique). Une meilleure répartition des cellules sur le filtre est obtenue par l'emploi d'un préfiltre (Millipore de 0.2  $\mu\text{m}$  de porosité et 25 mm de diamètre).

### **Les comptages directs en microscopie en immunofluorescence.**

A partir des échantillons préalablement fixés au formaldéhyde (10 %), et après homogénéisation par passage pendant cinq minutes dans un bain à ultra-sons, un volume connu est filtré sur membrane Nucléopore (porosité 0,2  $\mu\text{m}$ , diamètre 25 mm). Les filtres sont traités avant l'usage, de la même manière que pour les comptages en épifluorescence : trempage dans un bain d'Irgalan black (2 g/l d'eau à 2 % d'acide acétique). Le filtre est ensuite rincé trois fois avec 5 ml d'eau physiologique tamponnée (solution concentrée dix fois, NaCl : 80 g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : 32.926 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1.088 g ; H<sub>2</sub>O distillée : 1000 ml).

Après filtration sous vide, 1 ml de gélatine (2 % dans l'eau physiologique tamponnée, hydrolysée à pH 11 et 120°C pendant 15 minutes, puis neutralisée) est ajouté pour neutraliser les sites ioniques et réduire la "background fluorescence" (Ward and Perry, 1980, Dahle and Laake, 1982). Après 20 minutes, l'excès de gélatine est éliminé par trois rinçages avec 5 ml d'eau physiologique tamponnée. Deux ml de mélange nonvalent de globulines fluorescentes *anti-Escherichia coli* (Institut Pasteur Production), diluées au 1/20 sont ensuite mis en contact avec le filtre pendant 20 à 30 minutes. Trois rinçages (5 ml d'eau physiologique tamponnée) sont encore effectués. Après un bain du filtre pendant dix minutes dans l'eau physiologique tamponnée, celui-ci est séché et monté entre lame et lamelle.

L'observation se fait au microscope Olympus, objectif 100, sous lumière U.V.

En vue d'obtenir des témoins positifs, des examens ont été faits à partir de cultures des sérotypes 026 B6 et 0111 B4 (inclus dans les 9 sérotypes du sérum utilisé) de *Escherichia coli* (collection de l'Institut Pasteur). Les deux souches ont été mises en culture sur milieu liquide (Nutrient broth DIFCO), et incubées à 37°C pendant 48 heures. A partir de ces cultures, et toujours en vue de comparer les différentes méthodes utilisées, des ensemencements sur gélose nutritive et des comptages directs (épi et immunofluorescence) ont été réalisés, dans des conditions identiques à celles des échantillons du milieu naturel.

## **RÉSULTATS ET DISCUSSION**

La figure 1 permet de comparer les trois méthodes de comptages utilisées pour la numération des cellules des sérotypes 026 B6 et 0111 B4 de *Escherichia coli* en culture pure.

Le nombre de cellules obtenu par comptage direct en épifluorescence est pratiquement identique à celui obtenu par comptage direct en immunofluorescence. De tels résultats sont à rapprocher de ceux de Huai-Shu Xu et coll. (1982) obtenus à partir d'une souche de *Escherichia coli* (ATCC 25922) et une souche de *Escherichia coli* isolée d'eaux d'égouts. Ces résultats confirment la possibilité de la mise en évidence, dans le milieu naturel, d'une bactérie par le jeu des anticorps, comme cela a été démontré pour *Rhizobium japonicum* dans le sol (Schmidt et coll., 1968), *Thiobacillus ferrooxydans* dans les environnements acides (Apel et coll., 1976), des bactéries méthylophiles (Redd et Dugan, 1978), ou pour des souches isolées de l'eau de mer comme *Aeromonas* sp., *Chromatobacterium lividum*, *Pseudomonas* sp., et *Vibrio* sp. (Dahle et Laake, 1982).

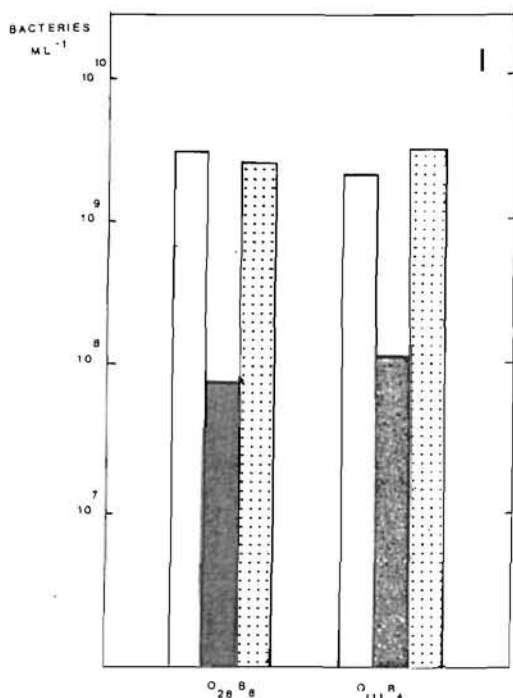


Figure 1 : Comparaison des valeurs obtenues par les différentes méthodes de comptages sur les deux sérotypes  $O_{26}B_6$  et  $O_{111}B_4$  de l'espèce *Escherichia coli* □ comptages microscopiques en épifluorescence, ▤ comptages microscopiques en immunofluorescence, ■ comptages par mise en culture sur gélose éosine bleu de méthylène.

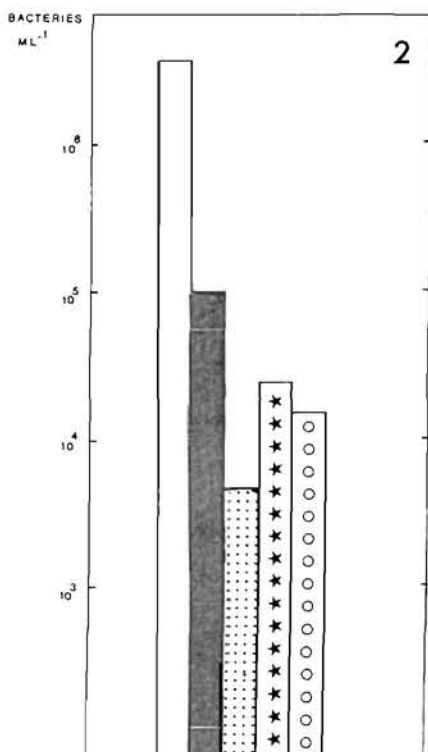


Figure 2 : Comparaison des valeurs obtenues par les différentes méthodes de comptages appliquées à un échantillon d'eau de mer polluée.

□ épifluorescence, ▤ immunofluorescence, ■ culture sur gélose nutritive marine, ▤ culture sur gélose éosine bleu de méthylène (incubation à 37°C), □ culture sur gélose éosine bleu de méthylène (incubation à 44°C).

D'autre part, ces valeurs (comptages directs en épifluorescence et comptages directs en immunofluorescence) sont supérieures d'un facteur 10 à 100 à celles obtenues par comptage indirect des colonies formées sur milieu sélectif gélosé. Ces différences ont des causes multiples. Les méthodes directes dénombrent toutes les cellules présentes, vivantes ou mortes, alors que les méthodes indirectes ne décèlent que les cellules aptes à se diviser. Par ailleurs, il faut supposer que sur les boîtes de culture, les colonies proviennent d'une cellule unique, ce qui n'est souvent pas le cas.

Dans le cas de l'eau de mer polluée la figure 2 permet la comparaison des valeurs obtenues par les différentes méthodes.

Comme lors des comptages avec les cultures pures, on note une différence entre le nombre total de bactéries obtenu par comptages directs en épifluorescence et le nombre total obtenu par comptage indirect. Cette différence qui était d'un facteur 10 à 100 dans le cas des suspensions des cellules en cultures pures, est d'un facteur 10 à 1000 dans le cas de l'échantillon du milieu littoral pollué. Cette augmentation entre les valeurs de comptages

directs en épifluorescence et bactéries hétérotrophes marines s'explique par l'hétérogénéité de la population bactérienne présente dans le milieu naturel. D'une part, le comptage direct en épifluorescence prend en compte toutes les cellules quel que soit leur état physiologique (cellules inactives ou mortes, par exemple). D'autre part, les communautés microbiennes naturelles comprennent un grand nombre d'espèces qui ne sont pas aptes à se développer sur les milieux de culture proposés.

En ce sens, le comptage direct en immunofluorescence est plus précis, mais les valeurs obtenues dépendent directement des fluctuations du nombre des entéropathogènes déversés dans l'eau de mer par l'égout, nombre qui varierait au gré de plusieurs facteurs incontrôlables (saisons, mini-épidémies, courantologie, etc...).

Si, dans son principe, la méthode est fiable, le marqueur bactérien par contre, devrait être défini différemment. Pour ce travail qui avait pour objectif la comparaison de méthodes de comptage, la présence dans le commerce du sérum nonavalent (Institut Pasteur Production) a plus influencé notre choix que le marqueur bactérien lui-même. La recherche de un ou plusieurs marqueurs de pollution bactérienne est à réaliser.

L'influence éventuelle du formol (utilisé pour la conservation des échantillons) sur les réactions antigéniques a été testée par des comptages de la souche 026B6. L'échantillon formolé a permis de dénombrer  $3,2 \cdot 10^5$  cellules par ml, tandis que l'échantillon non formolé présente  $4,2 \cdot 10^5$  cellules par ml. Dans les conditions expérimentales que nous avons définies il ne semble pas que le formol ait influencé les comptages.

Deux autres problèmes d'ordre technique se sont posés lors de l'étude de l'eau de mer naturelle. Le premier problème dû au bruit de fond observé avec le sérum fluorescent utilisé a été rapidement résolu grâce à l'emploi déjà mentionné de gélatine hydrolysée.

Le second problème rencontré est lié au volume de l'échantillon à filtrer. Étant donné la très grande spécificité du sérum utilisé, et la concentration cellulaire en eau de mer, il est nécessaire de filtrer un volume d'au moins 100 ml pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. De tels volumes n'ont pu être filtrés, l'importante quantité de matériel particulaire en suspension dans cette eau littorale entraînant le colmatage du filtre.

## CONCLUSION

Dans le cadre de la recherche de techniques nouvelles de traceurs de pollution bactérienne des eaux marines, recherches qui se révèlent aujourd'hui indispensables, le dénombrement par microscopie en immunofluorescence apparaît comme une voie d'avenir prometteuse.

Les techniques immunologiques présentent à la fois l'avantage et l'inconvénient d'une grande spécificité dans la mise en évidence du traceur bactérien choisi. Ainsi, pour une exploitation maximale de ces techniques nouvelles, il convient de rechercher des bactéries ayant une réelle signification tant du point de vue épidémiologique que du point de vue écologique. Le premier point implique que cette ou ces espèces bactériennes présentent un pouvoir pathogène. La signification écologique est essentiellement liée au temps de survie et au mode de dispersion de ces bactéries dans le milieu marin.

Les travaux ultérieurs devront être intégrés dans un programme plus vaste de recherche et d'application de nouveaux indicateurs biologiques de pollution. Ces travaux devront reposer à la fois sur des bases bactériologiques (temps de survie des bactéries, réaction immunologiques dans les diverses conditions du milieu naturel, ...) et sur des bases écologiques (stratégie d'échantillonnage et exploitation des résultats).

---

Association Française de Normalisation (AFNOR), première édition-1979. *Eaux, méthodes d'essais*.

APEL W.A., DUGAN P.R., FILIPPI J.A., RHEIMS M.S., 1976. Detection of *Thiobacillus ferro-oxidans* in acid mine environments by indirect fluorescent antibody staining. *Appl. Environ. Microbiol.*, 32, pp. 159-165.

COLWELL R.R. and KAPER J., 1977. *Vibrio* species as bacterial indicators of potential health hazards associated with water, Bacterial Indicators/Health Hazards Associated with Water, ASTM STP 635, A.W. Hoadley and B.J. Dukta, Eds., *American Society for Testing and Materials*, pp. 115-125.

DAHLE A.B., and LAAKE M., 1982. Diversity dynamics of marine bacteria studied by immunofluorescent staining on membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43, pp. 169-176.

HOBBIE J.E., DALEY R.J., JASPER S., 1977. Use of Nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33, pp. 1225-1228.

HUAI-SHU XU, ROBERTS N, SINGLETON F.L., ATTWELL R.W., GRIMES D.J., and COLWELL R.R., 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* in the estuarine and marine environment. *Microbiol. Ecol.*, 8, pp. 313-323.

REED W.M., DUGAN P.R., 1978. Distribution of *Methylomonas methanica* and *Methylosinus trichosporium* in Cleveland Harbor as determined by an indirect fluorescent antibody membrane filter technique. *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, pp.422-430.

SCHMIDT E.L., BANKOLE R.O., BOHLOOL B.B., 1968. Fluorescent antibody approach to study *Rhizobia* in soil. *J. Bacteriol.*, 95, pp. 1987-1992.

STRICKLAND J.D.H. and PARSONS T.R., 1968. A practical handbook of sea-water analysis. *Bull. Fish. Res., Board Canada, Ottawa. Bull. N°168*.

WARD B.B. and PERRY M.J., 1980. An immunofluorescent assay for the marine ammonium-oxidizing bacterium *Nitrosococcus oceanus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39 pp. 913-918.