

## 63

### DETERMINATION DU PROFIL DES FLORES BACTERIENNES DES ZONES LITTORALES. APPLICATION A L'EVALUATION DE L'IMPACT DES REJETS.

L. BUNETEL-LANGLAIS\*, A. SEGUI\*\*, J. GUERIN\*\*, I.C. LERMAN\*\*\*, M. CORMIER\*.

\* Laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique, Avenue du professeur Léon Bernard, 35043 RENNES Cedex. (FRANCE)

\*\* Laboratoire de Physique et Biomathématiques Pharmaceutiques, Avenue du professeur Léon Bernard, 35043 RENNES Cedex. (FRANCE)

\*\*\* Institut de Recherche en Informatique et Systèmes Aléatoires, Avenue du Général Leclerc, 35043 RENNES Cedex. (FRANCE)

RÉSUMÉ - Le principe de la méthode est d'évaluer, grâce à des numérations sur milieux sélectifs, l'importance relative des différentes familles bactériennes dans la flore des eaux de mer littorales. Il est important de séparer les espèces contaminantes et les espèces commensales du milieu marin. Les numérations sont effectuées sur dix milieux de cultures, répartis en quatre classes : milieux sélectifs, non sélectifs, salés, non salés. Les numérations sont reportées sur un diagramme permettant d'établir un profil de la flore bactérienne de l'eau prélevée en un point géographiquement donné. Les profils sont groupés par une méthode de classification. Les points de prélèvements dont les profils sont semblables ou voisins sont rassemblés et repérés sur la carte. Nous obtenons de cette façon des nappes qui représentent la zone d'impact d'un rejet ou des zones à flore remaniée mais stable pendant la durée de l'étude.

ABSTRACT - The principle of this method is to evaluate, by counts exercised upon selective media, the relative importance of the different bacteria families in the flora of the coastal waters. It is important to separate the contaminant species and the commensal species in the marine environment.

Ten culture media distributed into four categories (selective, non selective, saline and non saline) were examined by numeration. Counts were transferred on a diagram allowing to plot down a profile of bacterial flora of water sampled from a given geographical area. The profiles are arranged by a classification method. The sampling points with similar or adjoining profiles were assembled and marked on the chart. In this way, we obtained areas representing the impact zone of disposal of disturbed zones of flora that have remained stable during this study.

Les flores bactériennes sont caractérisées par la répartition qualitative et quantitative des espèces qui les composent. Le coût élevé et le temps importants nécessaires à l'identification bactérienne ne permettent pas d'envisager la caractérisation qualitative des flores par les techniques d'identification actuellement à notre disposition. Nous présentons ici une technique de caractérisation de flore fondée sur les dénombrements bactériens en milieux sélectifs. Les numérations obtenues permettent d'établir un profil de la flore en chaque point de prélèvement. La comparaison des profils est effectuée par une technique mathématique basée sur la méthode de classification hiérarchique par la vraisemblance des liens. (Lerman, 1981).

## MATERIEL ET METHODE

L'étude se situe dans la baie de Saint-Brieuc (fig. 1) (Côte nord de la Bretagne). Dans cette baie découverte à basse mer, se situent une vaste zone conchylicole et les embouchures de trois rivières : le Gouet, le Gouessant et l'Urne.

### Prélèvements

Des prélèvements d'eau de mer en surface ont été effectués en 20 points de la baie et aux embouchures des trois rivières (fig. 1). Six séries de prélèvements au cours d'un cycle de marée ont été réalisés sur les 20 points de la baie.

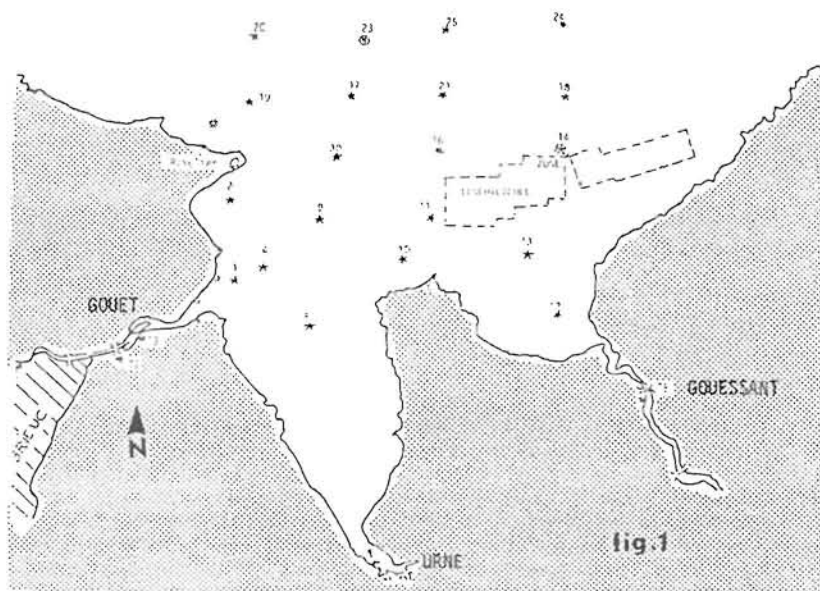


Figure 1 : Baie de Saint-Brieuc  
Emplacement des points de prélèvement.  
Echelle 1/50 000

### Dénombrements (numérations) des germes

Nous avons utilisé la méthode de numération en milieux solides. Un volume adéquat de chaque échantillon est filtré (millipore 0,22  $\mu\text{m}$ ). Les filtres sont incubés sur les milieux de culture selon différents critères sélectifs.

### Milieux de culture et critères de sélection

10 milieux différents ont été utilisés afin de générer une représentation de la flore bactérienne :

- deux milieux trypticase-soja :
  - . l'un préparé à l'eau distillé (5 ‰ NaCl) et incubé à 37°C,
  - . l'autre préparé à l'eau de mer (40 ‰ NaCl) incubé à 25°C, permettent le dénombrement des bactéries hétérotrophes.

- cinq milieux de Drigalski :

. deux reconstitués avec de l'eau distillée incubés à 37°C ou à 42°C,

. un reconstitué avec de l'eau de mer incubé à 25°C.

Ces trois milieux sont sélectifs des bacilles à gram négatif hétérotrophes. La température d'incubation permet de différencier les espèces de contamination.

. deux milieux aux antibiotiques (Leclerc *et al.*, 1977) : Ampicilline ou gentamycine (5 µg/ml) incubés à 37°C sélectionnent des bacilles à gram négatif résistants.

- un milieu TCBS incubé à 42°C pour la recherche des Vibrios,

- un milieu de Chapman (NaCl 70 ‰) incubé à 25°C : dénombrement des germes halophiles,

- un milieu de Chapman (NaCl 70<sup>0/∞</sup>) incubé à 25°C : Dénombrement des germes halophiles, hyperhalophiles.

Dans les milieux sélectifs des bacilles à gram négatif, la présence de lactose ou de saccharose permet de différencier les souches lactose ou saccharose positif ou négatif.

Nous obtenons de cette façon 16 numérations.

### *Le traitement mathématique*

La méthode de classification par la vraisemblance des liens propose une représentation ensembliste ou ordinale des données à caractère mathématique fini. Elle propose un arbre condensé des classifications construit à partir de sa représentation polonaise (fig. 2) sur l'ensemble des unités statistiques (unité spatio-temporelle) rassemblées en classes (Lerman, 1981 et Percheron, 1983).

Les valeurs brutes sont les nombres obtenus lors des numérations sur milieu de culture. Elles ont tendance à privilégier les fortes valeurs donc les milieux non sélectifs.

La notation ordinale transforme les valeurs brutes obtenues par la numération directe en une échelle discrétisée de quelques valeurs pour chaque milieu (cf. exemple de numération préordinale) ayant simplement le sens de codes ordinaux. Chaque note représente un intervalle de valeurs du paramètre initial. La notation maximale peut différer d'un milieu à l'autre.

Chaque unité statistique est constituée d'une suite de notes (une note par milieu) représentative de l'état de la flore au point et à l'heure de prélèvement. Cette unité statistique définit un profil de flore.

Les classes indiquées par une \* sur l'arbre (fig. 2) rassemblent les unités statistiques présentant une similitude significative à ce niveau de synthèse et laissent de côté les unités statistiques moins bien «classifiables».

A un niveau donné, la cohérence d'une classe est d'autant meilleure que la statistique locale associée est forte.

Les classifications par tranche horaire ne permettent pas d'établir directement les évolutions temporelles de chaque unité statistique. Cependant, une tentative a été effectuée pour établir cette évolution en classant les unités statistiques par groupement de tranches horaires imbriquées :

. basse mer - pleine mer moins deux heures trente

. pleine mer moins deux heures trente - pleine mer moins zéro heure trente

. pleine mer plus une heure - pleine mer plus deux heures trente

. pleine mer plus deux heures trente - pleine mer plus quatre heures.

Valeurs brutes	Notation préordinale
0	0
de 1 à 499	1
de 500 à 1 999	2
de 2 000 à 9 999	3
de 10 000 à 49 999	4
de 50 000 à 199 999	5
≥ 200 000	6

Milieu trypticase-soja isotonique incubé à 37°

Valeurs brutes	Notation préordinale
0	0
de 1 à 4	1
de 5 à 19	2
de 20 à 49	3
≥ 50	4

Milieu de Drigalski isotonique à la gentamycine incubé à 37°C germes lactose (+).

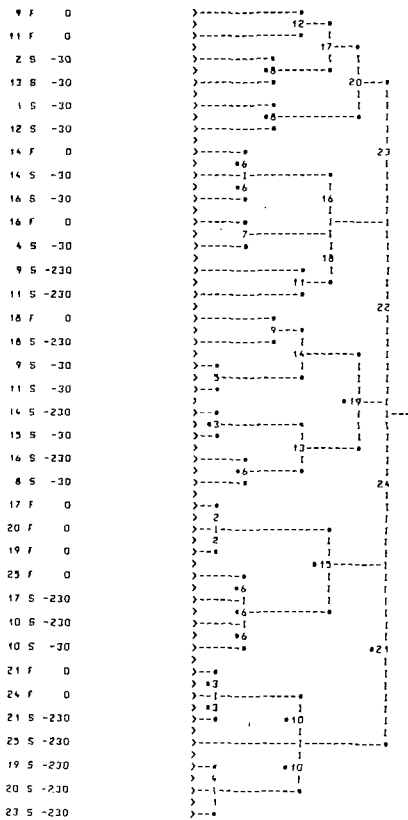


Figure 2 : Représentation polonaise.

## RESULTATS

Cette méthode permet de visualiser l'évolution des flores :

- à marée montante,
- à marée descendante.

### *Au flot* (fig. 3 et 4)

La méthode nous permet de déterminer 3 classes : la première qui correspond à l'eau du large englobe à basse mer les points situés au large :

20 23 25 24 19 17 21

Cette classe inclut le point 10 à pleine mer moins zéro heure trente traduisant une faible entrée de l'eau du large dans la baie.

Une seconde classe regroupe les points proches de l'embouchure des rivières. En avant de cette zone une classe fortement liée à la zone conchylicole à basse mer pénètre profondément dans la baie au cours du flot en direction du Sud-Ouest.

A pleine mer moins zéro heure trente, on peut reconnaître deux zones correspondant aux embouchures du Gouet et du Gouessant, alors qu'il apparaît une classe nouvelle en avant de la zone conchylicole.

### *Au jusant* (fig. 5 et 6)

A pleine mer plus une heure, différentes classes apparaissent évidentes :

- l'eau du large qui régresse vers le Nord, et devant l'embouchure des deux rivières, 2 classes indépendantes ;

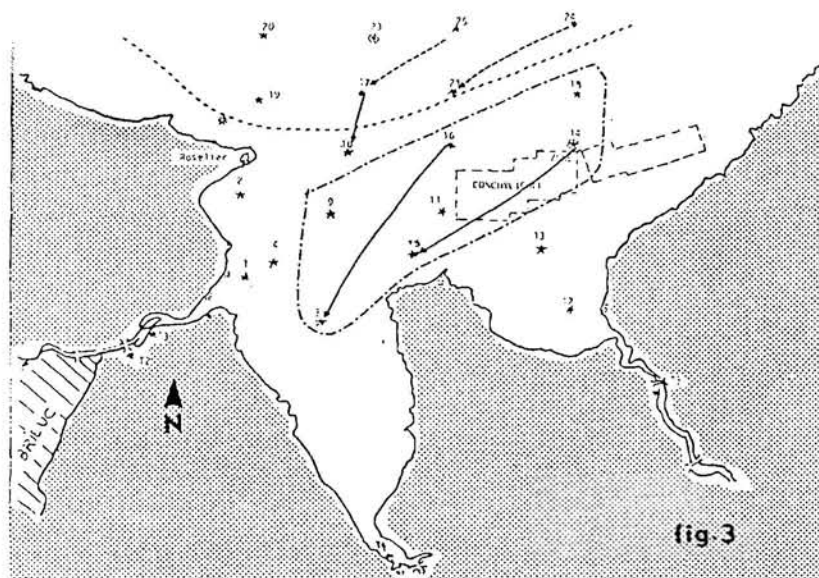


Figure 3 : Baie de Saint-Brieuc

Situation à basse mer et évolution

De basse mer à pleine mer moins 2 h 30 minutes.

De pleine mer moins deux heures 30 minutes à pleine mer moins 0 h 30

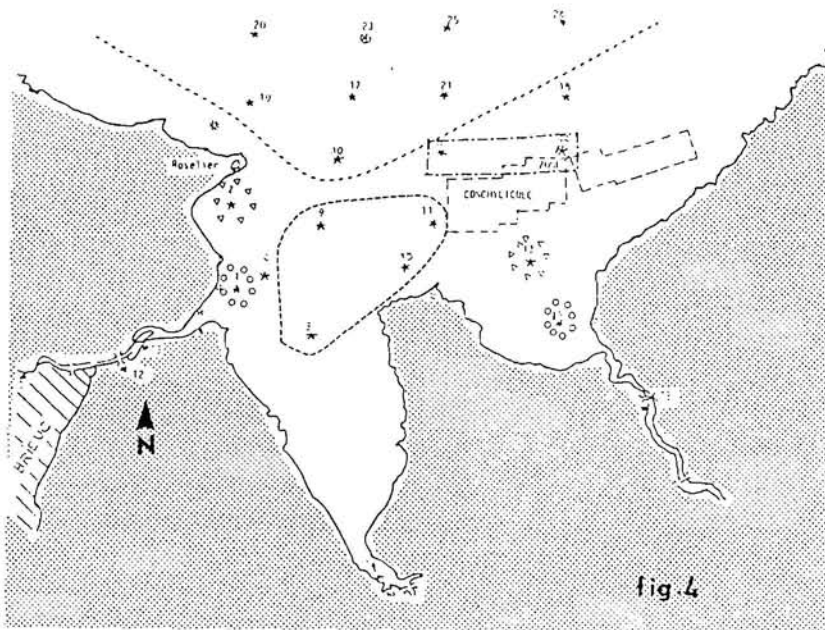


Figure 4 : Baie de Saint-Brieuc  
 Situation à pleine mer moins 0 h 30.  
 Classe faiblement liée.

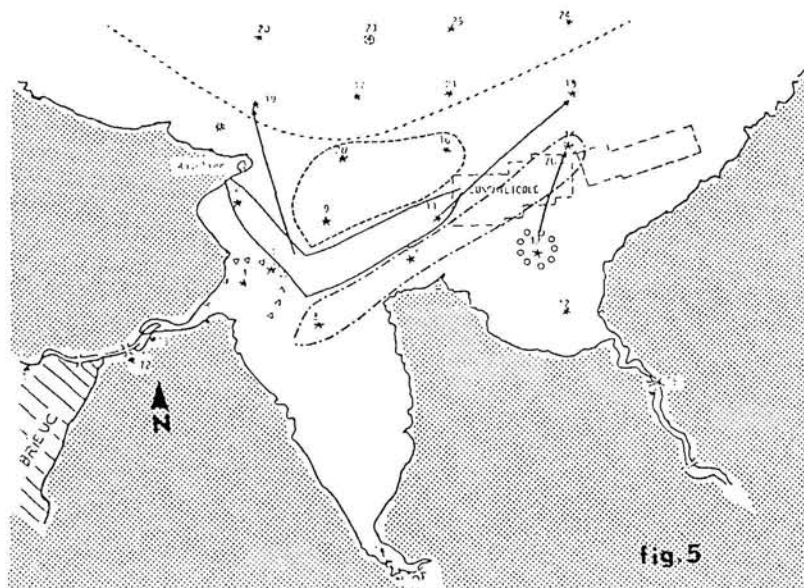


Figure 5 : Baie de Saint-Brieuc  
 Situation à pleine mer plus 1 heure et évolution.

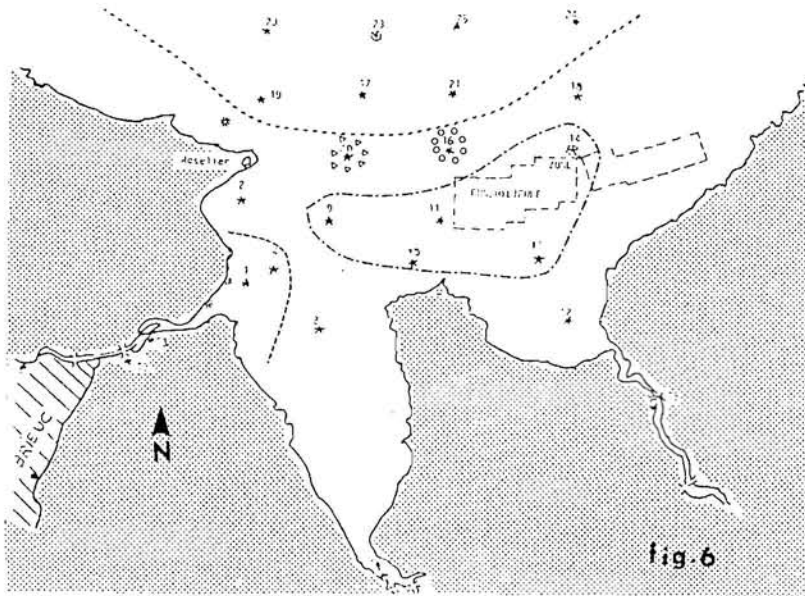


Figure 6 : Baie de Saint-Brieuc  
Situation à pleine mer plus 4 heures.

- dans la partie nord-ouest de la baie, deux classes remaniées correspondant probablement à une évolution de la flore issue du Gouet et enfin, au centre, une classe qui englobe la zone conchylicole fortement liée à la classe représentant l'embouchure du Gouessant.

Au cours du jusant, la régression de l'eau du large est particulièrement nette dans la partie est de la baie ; la classe située à l'embouchure du Gouessant recouvre la zone conchylicole.

Dans la partie ouest de la baie, la situation est plus complexe. On note une évolution à la fois vers l'Est et le Nord-Est de la classe intermédiaire. A pleine mer plus quatre heures, il existe au centre de la baie, incluant la zone conchylicole, une vaste classe dont la flore peut subir à la fois l'influence des moules et des sédiments. Il est à noter que cette classe est présente à basse mer.

## CONCLUSION

Cette technique nous a permis d'individualiser des classes et de suivre leur évolution au cours du cycle de la marée. Dans la baie de Saint-Brieuc nous avons pu mettre en évidence une dérive vers l'Est de l'ensemble de la contamination d'origine terrestre et le rôle des bouchots dans la contamination au cours du flot.

D'autre part, sur le plan technique, il est possible de réduire le nombre de paramètres étudiés, donc de déterminer les milieux qui apportent le plus d'informations utiles, car la suppression des résultats obtenus sur certains milieux modifie peu la formation des classes.

L'utilisation des valeurs ordinales ou préordinales permet la classification des zones, et la connaissance des valeurs réelles permet l'identification de ces zones, en zones propres, souillées ou sales.

---

American Public Health Association, 1975. *Standard methods for examination of water and waste water*. 14th Ed., New York.

LECLERC H., MIZON F., BONIFACE B., BONIFACE M., 1977. Eau et bactéries résistantes aux antibiotiques : étude écologique. *Annales de Microbiologie 128B* : 253-269.

LERMAN I.C., 1981. *Classification et analyse ordinale des données*. Dunod, Bordas, Paris.

PERCHERON, E., 1983. Génération d'une base de données et étude statistique de la flore microbienne par classification des paramètres physico-chimiques et bactériologiques en milieu marin : 52-57. DEA Université de Rennes I.