

65

MISE EN ÉVIDENCE ET ÉVALUATION DE L'ENRICHISSEMENT BACTÉRIEN DU FILM DE SURFACE DES EAUX LITTORALES A PROXIMITÉ D'EF- FLUENTS URBAINS

M. BEUCHER*, A. PLUSQUELLEC*, Y. LE GAL**, J.J. CLERET*.

* Institut Universitaire de Technologie, département de Biologie, 29000 QUIMPER.

** Laboratoire de Biologie Marine, 29110 CONCARNEAU (FRANCE)

RÉSUMÉ - Des prélèvements d'eau ont été réalisés en mer à proximité de rejets d'effluents urbains non traités, d'effluents industriels non traités, et enfin d'effluents urbains traités. Ces prélèvements sont de deux types : les premiers consistent à prélever un échantillon de la couche superficielle (film de surface), les seconds un échantillon de la masse d'eau sous-jacente. Les analyses bactériologiques réalisées sur ces prélèvements ont montré une concentration significativement plus importante de la flore mésophile et des indicateurs de contamination fécale dans le film de surface. La valeur du facteur d'enrichissement varie selon les points et la nature des rejets, et semble relativement indépendante du groupe bactérien considéré. Pour une des stations, une régression très significative entre les concentrations bactériennes en surface et en profondeur a été mise en évidence.

Mots clés : bactériologie marine, indicateurs fécaux, film, surface, effluents, eaux littorales.

ABSTRACT - Sea water samples were collected in the vicinity of urban non-treated, urban treated and industrial outfalls. The samples belonged to two different types : the first one consisted of the surface film, the second was the corresponding water at a 50 cm depth.

The enumeration of the bacteria in both types of samples indicated a significant concentration of the mesophilic flora and of the indicators of fecal pollution in the surface film.

The value of the concentrating factor depended largely on the nature of the sewage and did not reflect differences between the various bacterial groups.

At one of the stations a very significant regression was demonstrated between surface sample and depth sample.

Key words : marine bacteriology, fecal indicator, film, surface, effluent, littoral.

INTRODUCTION

La mise en évidence d'un film particulier à la surface des eaux remonte à 1938 (LangMuir et Adamcold, 1973). Des travaux concernant essentiellement les eaux de piscine ont montré que ce film est de nature lipidique (Courtois, 1969-70) et qu'il joue le rôle de piège à bactéries. Le facteur d'enrichissement est dans ce cas de 80 à 300 (Amies, 1956). La nature physico-chimique de la microcouche de surface et de l'écume marine a été également étudiée : hydrocarbures et lipides en sont les constituants principaux (Davison *et al.*, 1980; Marty et Saliot, 1974). Des expériences réalisées *in vitro* (Bezdeck et Carlucci, 1972) ont montré que cette microcouche de surface peut réaliser un enrichissement de 10 à 100 fois vis-à-vis des bactéries de la couche sous-jacente.

Selleck et Bracewell, (1974) Selleck et Carter (1972), montrent que la composition des matières flottantes de la surface des eaux soumises à l'influence de rejets d'eaux usées de grandes agglomérations est essentiellement lipidique. Un enrichissement bactérien est

également associé aux "flottants". En 1976 et 1978, le film est mis en évidence sur l'ensemble des eaux marines et continentales polluées ou non. Le facteur d'enrichissement bactériologique va de 10 à 200. Le phénomène est confirmé au laboratoire. Il dépend de la nature des bactéries et de leur concentration (Norkrans et Sorensson 1977 ; Odham *et al.*, 1978).

D'après Newton (1975) le film des zones soumises à rejet est de nature lipidique et concentre environ 10 fois les bactéries ; il atténue les vagues et les rides et est visible. Sa formation est conditionnée par l'état de la mer, le niveau de dilution de l'effluent, le taux de matières grasses. Il est surtout visible dans le cas d'effluents non traités.

Dans cet article, nous présentons les résultats d'une étude portant sur l'enrichissement bactérien du film de surface au voisinage de trois exutoires urbains.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sites de prélèvement

Trois stations ont été sélectionnées en baie de Concarneau afin d'étudier les principaux types de rejets d'eaux usées.

- Le Miné : exutoire d'effluents urbains non traités et d'eaux pluviales.
- La Croix : canalisation d'évacuation d'effluents urbains non traités avec apports industriels (pollution de type organique biodégradable).
- Kersos : exutoire d'effluents urbains traités par une station de type biologique à boues actives.

Méthodologie

Les techniques de prélèvement du film sont diverses (Waldner et Buttian, 1966 ; Larsson *et al.*, 1974 ; Harveu, 1966 ; Garret, 1965 ; Kjelleberg *et al.*, 1979), celle que nous utilisons dans cette étude dérive de celle utilisée par Selleck et Bracewell (1974) et Selleck et Carter (1972).

Le point précis de chaque prélèvement est déterminé après lâcher au niveau du rejet, de flotteurs réalisés en film de plastique : ces repères n'offrent aucune prise au vent et se déplacent uniquement sous l'effet du courant. Les prélèvements sont réalisés au niveau de ces "papillons" environ 30 mn après le lâcher. On note l'état de la mer, l'ensoleillement, le temps et la salinité.

Pour chacun de ces sites, deux types de prélèvements ont été réalisés : d'une part les prélèvements (S) du film de surface. Ceux-ci ont été obtenus par adsorption sur un grillage de nylon de maille 500 μm et de 0,1 m² de surface (technique de Selleck et Carter, 1974). D'autre part, les prélèvements (P) de l'eau sous-jacente ont été obtenus à l'aide de flacons stériles descendus à 50 cm au-dessous de la surface et ouvert seulement à cette profondeur.

Pour les prélèvements de surface les carrés de nylon sont stérilisés par stockage dans l'alcool. Égouttés et séchés, ils sont transportés dans des sacs plastiques. Au moment du prélèvement, ils sont descendus à la surface de l'eau à l'aide de baguettes de verre. Dès qu'ils sont imbibés, ils sont remontés, égouttés et introduits dans un conteneur stérile en évitant toute perte de l'eau prélevée. Ces grilles prélèvent en moyenne 15 gr d'eau de surface.

Les prélèvements en profondeur ont été réalisés à l'aide d'un flacon stérile (1 litre) lesté. L'ouverture est réalisée stérilement à distance.

L'ensemble de l'étude s'est déroulée pendant les mois de juillet, août, septembre et octobre. Les prélèvements ont toujours été réalisés par temps très calme.

Analyses

Pour les prélèvements de surface, l'ensemble conteneur-grille est lavé plusieurs fois avec du liquide de Ringer stérile, liquide de dilution habituellement utilisé pour les dénombrements ; les eaux de rinçage sont complétées à 250 ml.

Tous les prélèvements (surface et profondeur) sont ensuite homogénéisés à l'aide d'un broyeur type Ultra-Turrax de manière à dissocier les agglomérats bactériens. Sur chaque prélèvement, les analyses suivantes ont été réalisées.

- dénombrement de la flore aérobie mésophile,
- dénombrement des coliformes totaux,
- dénombrement des coliformes fécaux,
- dénombrement des streptocoques fécaux.

Ces dénombrements ont été réalisés par la méthode de dilution-inclusion en gélose d'une part et parallèlement par filtration sur membrane de 100 ml d'échantillon. Ceci permet d'obtenir des valeurs pour chaque prélèvement. Le fait de travailler dans les deux cas en milieu gélosé permet de rendre les résultats comparables.

La flore aérobie mésophile a été dénombrée sur milieu PCA (incubation 30°C pendant 72 h). Les coliformes sur milieu VRBL (incubation 44°C pour les coliformes fécaux et 30°C pour les coliformes totaux).

Les membranes ont été incubées sur milieu Endo dans les mêmes conditions. Les streptocoques fécaux ont été dénombrés sur milieu de SLANETZ (inclusion et membrane) (incubation 37° C).

RÉSULTATS

Les résultats sont donnés en logarithme népérien du nombre de germes par ml d'eau de mer avec, pour les prélèvements de surface, une correction de dilution correspondant au rinçage de la grille et sur la base de 15 ml d'eau de mer absorbée par celle-ci à chaque prélèvement.

Examen préliminaire de la distribution des valeurs.

La distribution de l'ensemble des valeurs obtenues (352 au total) ne s'écarte pas significativement du modèle Log. normal. En effet, le test de normalité sur les transformées logarithmiques classées (19 classes entre les valeurs 3 et 16 du logarithme népérien) satisfait cette hypothèse ($X^2 = 17.22$ pour 15 ddl non significatif).

L'ensemble de ces résultats permet de procéder à deux types d'analyses statistiques sur les valeurs transformées : l'analyse de variance et l'étude des droites de régression.

Analyse de variance.

Dans un premier temps les valeurs des numérations bactériennes effectuées sur le film et sur la masse d'eau sous-jacente sont comparées pour chaque station et chaque groupe bactérien. (tab. 1)

On peut constater qu'une différence hautement significative (1 %) entre les deux populations (S) et (P) est obtenue dans chaque cas.

Cette différence semble cependant varier d'avantage selon la localisation des stations qu'en fonction de la nature du groupe bactérien considéré. Ceci est confirmé par l'étude

des différences Log S - Log P obtenues pour chaque prélèvement et l'analyse de ces valeurs pour chaque station et chaque groupe bactérien (tab. 2).

	F.M		C.T.		C.F.		S.F.	
	S	P	S	P	S	P	S	P
LA CROIX								
N	9		9		9		9	
X	13,50	8,14	9,56	3,27	7,93	1,35	6,29	1,20
$X_s - x_p$	5,36		6,29		6,58		5,09	
T	1,76	1,71	1,83	1,60	1/86	1,99	3,47	2,00
F	26,11 xxx		35,98 xxx		39,38 xxx		26,3 xxx	
KERSOS								
N	18		18		18		18	
X	12,07	8,91	9,23	5,45	6,65	3,47	5,26	1,47
$X_s - x_p$	3,26		3,78		3,18		3,79	
O	2,24	2,52	1,90	2,03	2,19	2,19	1,87	2,58
F	18,17 xxx		26,03 xxx		18/36 xxx		26,11 xxx	
LE MINE								
N	17		17		17		17	
X	11,35	7,19	8,12	4,01	6,27	2/02	4,94	1,60
$X_s - x_p$	4,16		4,11		4,25		3,34	
O	1,74	1,63	2,14	1,70	2,32	3,02	2,73	2,72
F	29,86 xxx		28,93 xxx		31,00 xxx		19,23 xxx	

Tableau 1 : Comparaison des concentrations bactériennes du film de surface (S) et de l'eau sous-jacente (P).

FM: Flore aérobie mésophile

CT: Coliformes totaux

CF: Coliformes fécaux

SF: Streptocoques fécaux

N: Nombre de prélèvements

x: moyenne arithmétique des logarithmes des valeurs.

X_s : logarithme népérien de la valeur obtenue pour le film

X_p : logarithme népérien de la valeur obtenue pour la masse d'eau.

v: écart type

F: Rapport de la variance externe (entre S et P) à la variance interne ($v = 4,95$ avec 328 ddl).

x: valeur significative au seuil 5 %

xx: valeur significative au seuil 1 %

xxx: valeur significative au seuil 1 %/∞

Ns: Non significatif

On constate en effet que si les différences ne sont pas significativement différentes entre les groupes bactériens, en revanche, elles le sont entre les stations.

Il est possible également de comparer entre elles les valeurs du film ainsi que celle de l'eau en fonction des stations et en fonction des groupes bactériens (tab. 3).

La différence entre les stations est significative dans les deux cas et pour les trois premiers groupes, ce qui nous permettra de déterminer le niveau de contamination de chaque effluent.

Détermination des droites de régression entre Log S et Log P.

Dans cette étude, seule la station de Kersos a fourni des résultats significatifs (tab. 4).

Les pentes des différentes droites ont été comparées au moyen du test de Student: entre les extrêmes (CF et SF): $t = 1.34$ (non significatif).

Les pentes ne sont donc pas différentes et nous pouvons regrouper les valeurs de CT, CF et SF dans un même test avec pour résultats:

$$F \text{ REG/DEV} = 56.93, \text{ coef. } R = 0.72 \text{ } Y = 0.67 X + 4.73$$

	FM	CT	CF	SF	
LA CROIX	N=9 M=5,358	N=9 M=6,291	N=9 6,581	5,094	F=2,017
KERSOS	N=18 M=3,161	N=18 M=3,784	N=18 3,178	N=18 3,789	F=1,002 NS
LE MINE	N=17 M=4,169	N=17 M=4,104	N=17 4,248	N=17 3,347	F=1,297 NS
	F=4,333 x	F=5,891 xx	F=10,12 xxx	F=2,657 NS	Variance interne v=6,87 avec 164 ddl

Tableau 2 : Comparaison des stations et des groupes bactériens.

		FM			CT			CF			SF		
		LC	LM	KS	LC	LM	KS	LC	LM	KS	LC	LM	KS
S	N	9	17	18	9	17	.18	9	17	18	9	17	18
	X	13,5	11,35	12,07	9,56	8,12	9,23	7,93	6,27	6,65	6/29	4,94	5,29
	F	5,449	xx		3,308	x		3,362	x		2,208	NS	
P	N	9	17	18	9	17	18	9	17	18	9	17	18
	X	8,13	7,18	9,91	3,27	4,01	5,45	1,35	2,02	3,47	1,20	1,60	1,469
	F		5,279	xx		6,839	xx		6,603	xx		5,241	NS

Tableau 3 : Comparaison des valeurs du film et de la profondeur selon les stations (LC : LA CROIX ; LM : LEMINE ; KS : KERSOS.)

Groupe bactérien	F REG/DEV	COEFF. R.	Equation	Résultat
FM	3,473 (1,16)	0,42	$Y = 0,38 x + 8,7$	NS
CT	5,089 (1,16)	0,49	$Y = 0,46 x + 6,7$	*
CF	14,520 (1/16)	0,69	$Y = 0,69 x + 4,3$	**
SF	5,59 (1,16)	0,51	$Y = 0,37 x + 4,7$	*

Tableau 4 : Étude des droites de régression sur les valeurs obtenues à Kersos.

Si nous ajoutons les valeurs de la flore mésophile, la régression devient encore plus significative (fig. 1).

$F \text{ reg/dev} = 133.7$, coef. $R = 0.81$ $Y = 0.75 X + 4.71$

DISCUSSION

- Méthodologie :

En complément de cette étude, d'autres manipulations ont été réalisées *. La nécessité de l'homogénéisation a été montrée par des dénombrements sur les deux types de prélèvement avant et après passage à l'ultra-thurax et expliquée par des observations microscopiques et ultra-microscopiques (les bactéries sont généralement regroupées sous forme d'agrégats sur matière en suspension ou non). La technique choisie pour le dénombrement imposait la dissociation de ces agrégats.

- Résultats :

Pour toutes les stations et tous les groupes bactériens, les différences constatées entre la concentration bactérienne en surface et celles obtenues en profondeur sont hautement significatives (tab. 1).

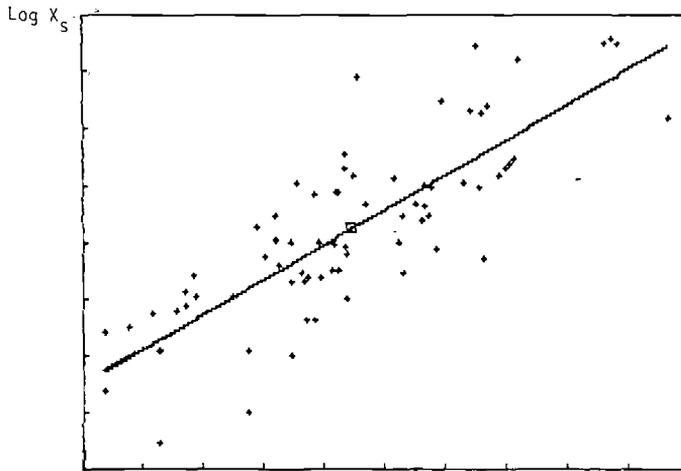


Figure 1 : Concentrations bactériennes (toutes catégories regroupées) obtenues en surface en fonction de celles obtenues en profondeur à la station de Kersos : $\text{Log } X_s = F(\text{Log } X_p)$.

Origine $\text{Log. } X_p$: - 2,88	Echelle $\text{Log. } X_p$: 1,73
$\text{Log. } X_s$: - 0,53	$\text{Log. } X_s$: 1,85

Ces différences varient entre 3.16 et 6.58. Le facteur d'enrichissement S/P rapport des valeurs non transformées varie donc en moyenne de 24 à 700 selon les stations et les groupes.

D'après le tableau 2, on peut constater que la différence entre les concentrations bactériennes en surface et en profondeur, est indépendante des catégories bactériennes. En revanche, elle varie significativement d'une station à l'autre et ce, d'autant plus que le groupe observé est spécifique de l'effluent. Les résultats obtenus avec les streptocoques fécaux peuvent s'expliquer par le fait que les valeurs obtenues pour ce groupe sont plus faibles et souvent à la limite de la sensibilité des méthodes utilisées. La différence $\text{Log. } S - \text{Log. } P$ s'établit en moyenne par station de la façon suivante: La Croix : 5.83; Kersos : 3.50; Le Miné : 3.97, soit un rapport S/P des valeurs non transformées égal à 341 pour La Croix, 33 pour Kersos et 53 pour Le Miné. Le gain le plus élevé est obtenu pour le rejet contenant des effluents industriels et le plus faible pour celui provenant de la station d'épuration. C'est à ce niveau que l'on peut envisager le rôle des matières flottantes dans l'enrichissement, puisqu'elles sont abondantes dans les rejets industriels. Le tableau 3 nous permet d'évaluer le niveau de contamination des différents sites en ce qui concerne les groupes étudiés, en surface aussi bien qu'en profondeur. Dans tous les cas, les stations sont significativement différentes (sauf pour les streptocoques, pour les mêmes raisons que précédemment). La station de La Croix présente toujours les concentrations les plus élevées pour le film. En profondeur, c'est la station de Kersos qui présente les plus fortes valeurs. Ce niveau élevé de contamination de la masse d'eau peut trouver une explication dans la topographie de l'anse qui ne s'ouvre vers le large que par un goulet de quelques dizaines de mètres.

Par ailleurs, la droite de régression obtenue à la station de Kersos pour les quatre catégories de bactéries nous montre que pour la gamme de valeurs étudiées, il y a relation directe entre la population du film et celle de l'eau. Les différentes strates ont peu de possibilités de déplacement les unes par rapport aux autres; elles ne sont pas indépendantes. En un point donné, il existe une forte probabilité pour que le film soit issu de l'eau sous-jacente.

L'équation de la droite est $Y = 0.75 X + 4.71$ soit $\text{Log } X_s = 0.75 \text{ Log } X_p + 4.71$ ce qui équivaut à : $X_s = 111 S_p^{0.75}$

Cette équation signifie que plus les concentrations sont élevées en profondeur plus l'enrichissement est faible. Nous pouvons pour la station de Kersos, calculer l'enrichissement S/P pour chaque groupe bactérien à partir des valeurs de X_p et selon l'équation : FM 12.5 CT 28.5 CF 46.8

Ce phénomène n'avait pu être mis en évidence par l'analyse de variance. L'enrichissement moyen calculé de cette façon est égal à 33.

Ce type de relation pourrait expliquer la différence d'enrichissement entre la station de Kersos et celle du Miné par une différence du taux de contamination plutôt que par un phénomène lié à l'épuration.

Pour toute station, dans des conditions de rejets similaires à la station de Kersos (vase clos) on peut penser qu'il est possible de déterminer une équation de régression avec des paramètres différents, spécifiques de la nature du rejet.

Parallèlement à l'étude bactériologique * nous avons aussi dosé la matière extractible à l'hexane (HEM). Nous n'avons pu établir comme Bracewell, Selleck et Carter (1980) de relation entre les résultats bactériologiques et le taux d'HEM, celui-ci étant souvent très bas voire à la limite de sensibilité des techniques.

CONCLUSION

La pellicule de surface des eaux littorales présente un enrichissement bactérien par rapport à la masse d'eau sous-jacente. Cet enrichissement s'observe pour les germes indicateurs de contamination fécale mais également pour la flore aérobie mésophile. Il intéresse aussi bien les secteurs recevant des eaux traitées que ceux recevant des effluents bruts. Le facteur d'enrichissement ($E = \frac{S}{P}$ en nombre de germes par ml) est très variable : de 1 à 4.10^3 . Les valeurs faibles sont, en moyenne, observées sur les zones recevant des eaux traitées. Les valeurs élevées se rapportent aux effluents d'origine industrielle riches en composés organiques. Dans certaines conditions, il est possible de montrer une relation entre la concentration bactérienne du film de surface et celle de la masse d'eau.

Les résultats obtenus montrent l'importance de la méthode de prélèvement particulièrement en ce qui concerne les eaux de baignades puisqu'alors la couche superficielle est directement en contact avec la sphère O.R.L. des individus. Le prélèvement du film est d'autant plus intéressant que le niveau de contamination est peu élevé.

* : Ces travaux entrent dans le cadre d'un contrat CETE (Centre d'études techniques de l'équipement) - Ministère de l'environnement (contrat n° 78.0.2413 "Étude de la contamination bactériologique des eaux de surface du littoral") ayant pour but de déterminer l'apport des "flottants" émis par les rejets d'effluents urbains dans la constitution du film de surface.

AMIES C.R., 1956. Surface film in swimming pools. *Canad. J. public. Health*, 47, 93.

BEZDECK H.F. and CARLUCCI A.F., 1972. Surface concentration of marine bacteria. *Limnology and Oceanogr.* July, vol. 17 (4), 566-569.

BRACEWELL, SELLECK and CARTER., 1980. Contribution of wastewater discharges to ocean surface particulates. *J. Wat. Pollution control Fed.*, 52, 2230-2245.

- COLIN F et JOURDAIN M.J., 1981. Recherche de l'influence des conditions de milieu sur la fixation des bactéries pathogènes aux surfaces solides, leur survie et leur maintien dans les eaux continentales superficielles. *IRH Nancy. Etude ministère de l'Environnement, Comité Scientifique "eau" (1981)*, 108 p.
- COURTOIS G., 1969-1970. Etude de la pollution du film superficiel de piscine. *Mémoire ENSP Rennes* 121 p.
- DAVISON A., EASEY J.F., VARJAVANDI J.J., WARNER K.M., 1980. Investigation into sewage grease behaviour in coastal waters. *Prog. wat. techn.* Vol. 12, Toronto IAWRP/Pegamon Press Ltd, 499-508.
- GARRET W.D., 1965. Collection of slick-forming materials from the sea surface. *Limn. Oceanogr.* 10 (4), 602-605.
- HARVEU G.W., 1966. Microlayer collection from the sea-surface, a new method and initial results. *Limnol. Oceanogr.*, 11, 608-13.
- KJELLEBERG S., STENSTROM T.A. and ODHAM G., 1979. Comparative study of different hydrophobic devices for sampling lipid surface film and adherent microorganisms. *Marine biol.* 53, 21-25.
- LANGMUIR et ADAM COLD., 1938. *Spring harbor symposia. quant. biol.* 6, 173.
- LARSSON K., ODHAM G. and SODERGREN A., 1974. "On lipid films on the sea I. a simple method for sampling and studies of composition." *Mar.* 2, 49-57.
- MARTY J.C., SALIOT A., 1974. Etude chimique comparée du film de surface et de l'eau de mer sous-jacente, acide gras. *P. cong. J. rech. Atmosph. Fr.* Vol. 8N; 3-4 signalement CNRS, 76-3 00093333, 563-570.
- NEWTON J.R., 1975. Factors affecting slick formation at sewage outfalls. *Pollution criteria for estuaries*. Ed. P.R. Helliwell J. Bosanyi Techno press London, paper 12.
- NORKRANS B., SORENSON F., 1977. On the marine lipid surface microlayer. Bacterial accumulation in model system Dep. mar. microbiol. *Univ. Goeteborg. Oweden. Botanica marina* vol XX, 473-478.
- ODHAM G., NOREN B., NORKRANS B., SODERGREN A., LOFGREN H., 1978. Biological and chemical aspects of the aquatic lipid surface microlayer. Lab. Ecol. Chem. Univ. Lund Sweden. *Prog. chem. Fats other lipid. Vol 16* pp Pergamon Press (1978), 31-44.
- SELLECK R.E., BRACEWELL L.W., 1974. The significance and control of wastewater floatables in coastal waters. *Office of research and development U.S environmental protection agency*. Washington. 117 p.
- SELLECK R.E., CARTER R., 1972. Surface phenomena study. *Southern California coastal water research project Los Angeles*. California 81 p.
- WALDNER O., et BUTTIAN R., 1966. Dispositifs pour le prélèvement du film superficiel des eaux de baignades. *Ann. Inst. Pasteur*. Lille, 17 p.