

Marie-Laure Le Mercier
IUT de Quimper
Département Génie Biologique
Analyses Biologiques et Biochimiques
2ème année

IFREMER Centre de Brest
Direction de l'Environnement
et de l'Aménagement Littoral

*Etude des bactéries
d'origine entérique
dans les sédiments marins*

Maître de stage Michèle Gourmelon

Stage effectué du 6 avril au 12 juin 1998

REMERCIEMENTS

Je remercie Monique POMMEPUY de m'avoir accueillie au sein de l'équipe de son laboratoire.

Je remercie beaucoup Michèle GOURMELON, mon maître de stage, ainsi qu'Annick DERRIEN pour leur encadrement, pour toute l'attention consacrée à mon égard et pour leur aide dans la rédaction de mon rapport.

Un grand merci aussi à Elisabeth DUPRAY et Marie- Paule CAPRAIS pour leurs conseils.

Je remercie Denise GUILLERM pour son aide et ses conseils dans l'utilisation du micro ordinateur et dans la mise en page de mon rapport.

Merci à Isabelle pour toute la documentation qu'elle m'a fournie.

Enfin, je remercie toute l'équipe du laboratoire pour leur accueil chaleureux et leur sympathie.

SOMMAIRE

INTRODUCTION

I LES BACTERIES ET LE SEDIMENT	2
I.1 ARRIVEE DES BACTERIES ENTERIQUES EN MER	2
I.2 SURVIE EN MER ET PASSAGE DANS LE SEDIMENT	2
I.3 SURVIE DES BACTERIES DANS LE SEDIMENT	4
I.4 LA POPULATION BACTERIENNE DU SEDIMENT	5
II CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	6
II.1 GENERALITES.....	6
II.2 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	6

MATERIEL ET METHODES

I PRELEVEMENT DU SEDIMENT.....	8
II LES TECHNIQUES DE DECROCHAGE	9
II.1 PREPARATION DU SEDIMENT	9
II.2 TECHNIQUES DE DECROCHAGE DES BACTERIES DU SEDIMENT	9
III NUMERATIONS BACTERIENNES.....	11
III.1 FLORE CULTIVABLE.....	11
III.2 FLORE TOTALE.....	15
IV EFFET DES TRAITEMENTS SUR TROIS SOUCHES BACTERIENNES	15
IV.1 PREPARATION DES SOUCHES.....	15
IV.2 NUMERATION	16

RESULTATS ET DISCUSSION

I LES BACTERIES DANS LE SEDIMENT.....	17
II EFFICACITE DU DECROCHAGE.....	18
II.1 EFFICACITE DES METHODES PHYSIQUES ET CHIMIQUE.....	19
II.2 EFFICACITE DE LA METHODE ENZYMATIQUE.....	22
III RECHERCHE ET NUMERATION DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.....	24
III.1 RECHERCHE ET NUMERATION DES CLOSTRIDIUM PERFRINGENS TOTAUX ET SOUS FORME SPORULEE.....	24
III.2 COMPARAISON DES MILIEUX SOLIDES UTILISES	26

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

PRESENTATION DE L' IFREMER

L' IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) est né en 1984 de la fusion de l' institut Scientifique et Technique des Pêches Maritimes (I.S.T.P.M) et du centre national pour l' Exploitation des Océans (C.N.E.X.O).

C'est un organisme public de recherche français à vocation maritime et à caractère commercial. Les activités de recherche concernent l'environnement côtier, l'exploitation et la transformation des ressources, la connaissance du milieu marin et de ses fonds.

La Direction de l'Environnement et du Littoral (D.E.L) a pour objectif de comprendre le fonctionnement des écosystèmes côtiers soumis à l'action humaine.

Plusieurs départements constituent la D.E.L : un département d'écologie côtière, un département de polluants chimiques, d'études et d'expertises régionales et un département de microbiologie et de phycotoxine dont le laboratoire de microbiologie où j'ai effectué mon stage.

L'objectif principal du laboratoire de microbiologie est d'étudier l'influence d'une contamination bactérienne ou virale des produits marins sur la santé des consommateurs. Actuellement, les recherches sont basées sur l'étude des mécanismes et des facteurs qui déterminent la survie en milieu marin des bactéries d'origine humaine et animale ainsi que la recherche de bactéries ou de virus, dans les coquillages, qui peuvent nuire aux consommateurs.

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

Les rejets des microorganismes d'origine humaine ou animale en eau de mer constituent un problème tant sanitaire qu'économique. L'homme peut, en effet, se contaminer lors de baignades ou de consommations de coquillage.

Les bactéries entériques rejetées en mer se retrouvent dans un milieu qui leur est défavorable (lumière, salinité...) mais où elles peuvent néanmoins survivre.

Le sédiment marin protège les bactéries entériques de toutes ces agressions marines et, de ce fait, constitue un véritable réservoir naturel de bactéries entériques et de bactéries pathogènes pour l'homme comme par exemple le genre *Clostridium*. Pour survivre dans les sédiments, les bactéries se lient aux particules sédimentaires et peuvent ainsi accéder aux matières organiques et se nourrir.

Afin d'effectuer des numérations sur plusieurs genres bactériens qui sont rejetés en mer et arrivent dans les sédiments, une dispersion des particules sédimentaires et une suppression des liaisons qui existent entre elles et les bactéries peuvent s'avérer nécessaires.

C'est pourquoi nous avons réalisé des essais de décrochage de bactéries par des méthodes physiques, chimique et enzymatique sur différents sédiments dans le but de déterminer une méthode efficace.

De même, nous avons recherché un indicateur de contamination fécale : *Clostridium perfringens*, doté d'une très grande capacité de survie dans un milieu défavorable, présent au niveau des stations d'épuration et que l'on retrouve aussi au niveau des rejets en mer et dans les sédiments.

I LES BACTERIES ET LE SEDIMENT

1.1 Arrivée des bactéries entériques en mer

Le milieu marin côtier subit plusieurs apports de bactéries entériques, que ce soit par les rivières, les eaux de ruissellement ou par les rejets des stations d'épuration.

Au niveau des stations d'épuration, les bactéries entériques d'origine humaine ou animale vont subir différents traitements (boues activées, suivi éventuellement d'un traitement par les UV, ozone ou chlore). Elles ne sont pas complètement éliminées et peuvent alors arriver en mer au niveau des émissaires.

Parmi les bactéries d'origine intestinale humaine ou animale qui sont rejetées en mer, nous pouvons citer : les indicateurs de contamination fécale : *Escherichia coli*, coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux. Mais on peut aussi retrouver des bactéries pathogènes pour l'homme telles que *Salmonella* et *Clostridium* (13).

1.2 Survie en mer et passage dans le sédiment

Les bactéries entériques, une fois rejetées en mer, se retrouvent confrontées à différents facteurs qui vont limiter leur survie :

- les phénomènes de dilution et sédimentation.
- la lumière, la salinité, l'oligotrophie et la température.
- la compétition de flore (entre celles qui arrivent en mer et celles qui y vivent).
- la prédation.

Les bactéries peuvent être sous forme libre, en suspension dans l'eau de mer, ou sous forme liée, accrochées aux particules sédimentaires.

La sédimentation est l'un des facteurs les plus importants concernant la disparition des bactéries entériques de l'eau de mer. En effet, selon SAYER *et al.* (1975), plus de 80 % des germes indicateurs fécaux sont associés au matériel particulaire.

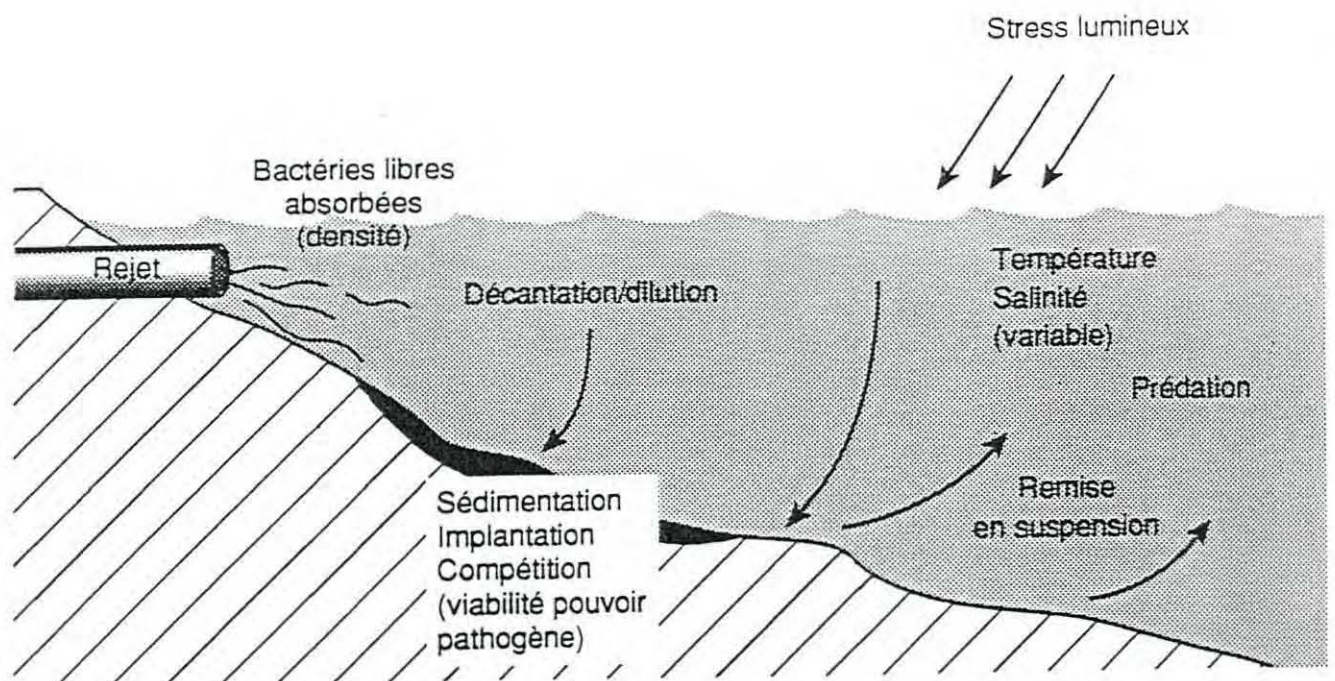


Figure 1 : Facteurs intervenants dans le devenir des bactéries entériques en mer

On peut noter que le nombre de bactéries d'origine fécale peut être 100 à 1000 fois supérieur dans le sédiment que dans l'eau surnageante (7).

1.3 Survie des bactéries dans le sédiment

Le sédiment marin, surtout la vase, joue le rôle de réservoir à bactéries car il additionne les avantages favorisant leur survie.

En effet, en adhérant aux particules sédimentaires, les bactéries sont protégées des radiations solaires, de la température et y trouvent de la matière organique nécessaire à leur croissance ou à leur survie.

L'adhérence bactérienne joue donc un grand rôle dans la survie des bactéries entériques dans le sédiment. Il existe de fortes liaisons qui lient la bactérie à son support et notamment un réseau de fibres polysaccharidiques appelé le glycocalix (2).

Ce glycocalix permet à la bactérie de s'accrocher à son support, de s'accrocher entre elles, et ainsi de survivre et se multiplier.

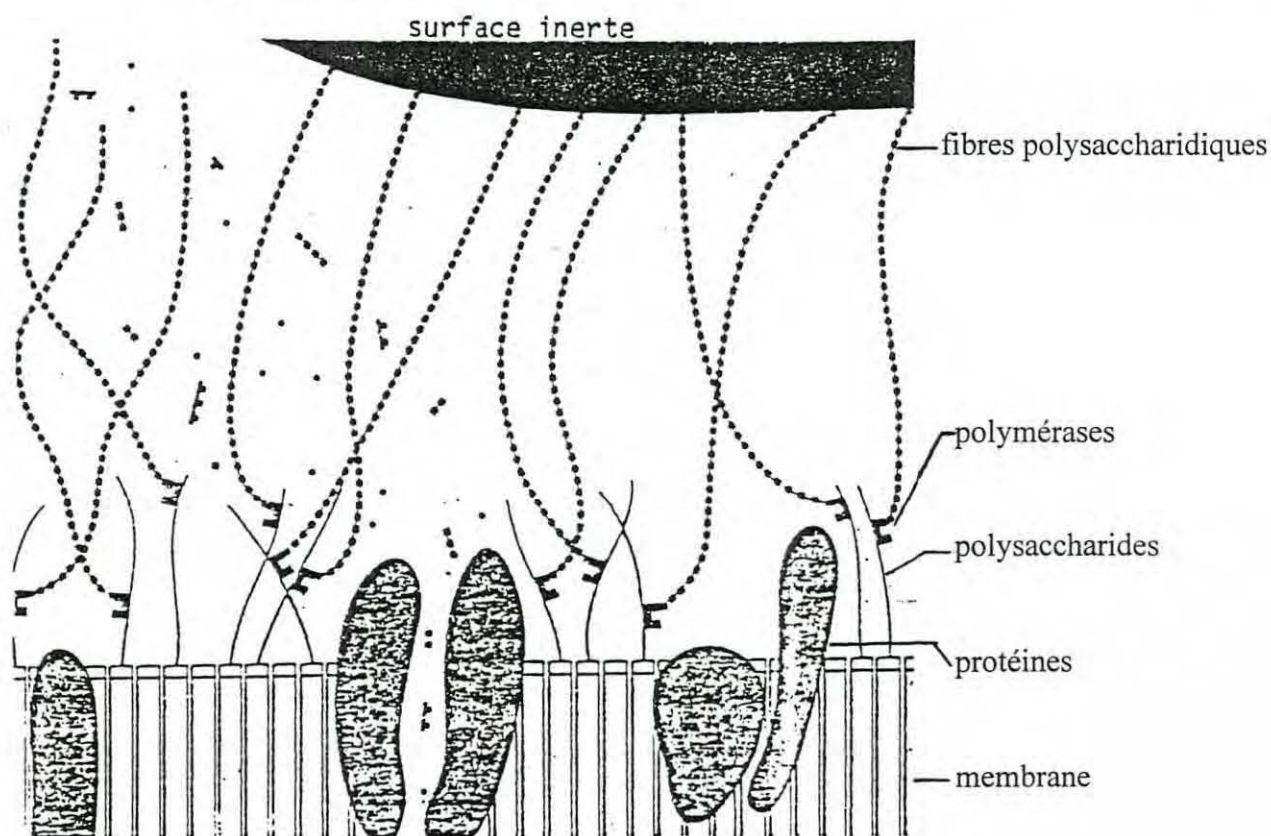


Figure 2 : Mécanisme d'adhésion de la bactérie (3)

Afin de dénombrer les bactéries entériques présentes dans le sédiment avec précision, un traitement permettant de briser les liaisons qui existent entre les bactéries et les particules sédimentaires peut s'avérer utile.

1.4 La population bactérienne du sédiment

Il existe plusieurs facteurs qui entraînent une grande diversité de la flore sédimentaire (12) :

- la nature du sédiment (sable, vase...)
- la teneur en matière organique
- la teneur en oxygène (surface ou profondeur)
- la température

Les bactéries peuvent se trouver en surface ou en profondeur du sédiment, elles sont donc en présence ou en absence d'oxygène.

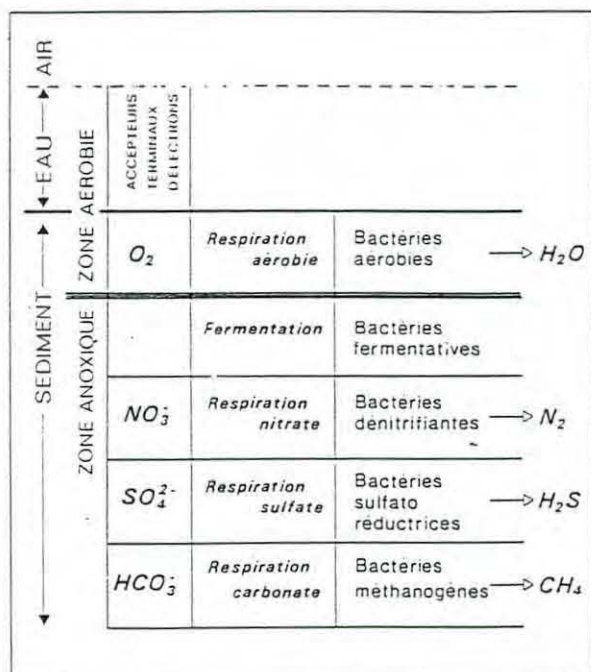


Figure 3 : Représentation théorique du profil d'un biotope sédimentaire marin (d'après Claypool et Kaplan (1974) dans Bianchi *et al.* 1989)

Au niveau de la couche superficielle aérobie on trouve une flore de surface essentiellement composée de bacille à Gram négatif (12) comme par exemple *Pseudomonas*, *Vibrio* et la flore fécale : *E. coli*, *Salmonella*...

Au niveau de la couche inférieure, il y a moins de bactéries et la flore se compose surtout de bactéries à Gram positif, utilisant une respiration anaérobie facultative, stricte ou la voie fermentative. Dans cette flore anaérobie, le genre le plus retrouvé semble être le genre *Clostridium*, pouvant sporuler et être pathogène pour l'homme (1 ; 12).

II CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

II.1 Généralités

Le genre *Clostridium* appartient au groupe des microorganismes anaérobies sulfite-réducteurs. D'une façon générale, ce sont des bacilles à Gram positif formant des endospores avec, pour certains d'entre eux, une mobilité péritriche.

Ce genre contient de nombreux pathogènes et notamment *Clostridium perfringens* que nous recherchons dans les sédiments.

Le *Clostridium perfringens* se distingue des autres *Clostridium* par son immobilité et par la présence d'une capsule.

Il existe 5 sous-types, classés selon les toxines produites, allant de A à E. On retrouvera surtout le type A en pathologie humaine (8).

II.2 *Clostridium perfringens*

↳ Habitat

Le *Clostridium perfringens* est ubiquitaire ; en effet on le retrouve dans les sols (surtout sous forme de spores), les eaux, les boues, et enfin les sédiments (8). De plus, il est présent dans la flore intestinale de l'homme et de nombreuses espèces animales.

↳ Caractères bactériologiques

C'est un bacille à Gram positif, immobile, possédant une capsule et pouvant sporuler. *Clostridium perfringens* est une bactérie anaérobie stricte mais qui peut tolérer l'oxygène. Sa température optimale de croissance est de 37 à 44 °C.

C'est un réducteur, en effet, il réduit les sulfites en sulfure en présence d'un donneur d' H_2 pour former de l' H_2S . Cette propriété est utilisée pour la détection et la numération de *Clostridium perfringens* sur des milieux solides.

↳ Pouvoir pathogène

Chez l'homme, *Clostridium perfringens* peut entraîner des infections de gravité plus ou moins importante. En effet, il peut être responsable de toxi-infections alimentaires, de bactériémie ou d'abcès mais aussi d'infections plus graves pouvant être mortelles sans traitement comme les septicémies et gangrènes gazeuses ou myonécroses clostridiennes (infections localisées au muscle) (8).

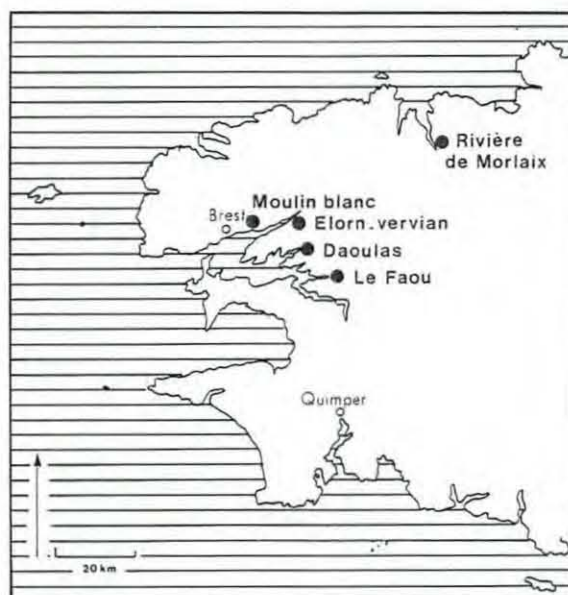
Clostridium perfringens présent au niveau des stations d'épuration, et donc au niveau des rejets de ces stations dans la mer.

C'est une bactérie d'origine fécale qui a la capacité de survivre très longtemps dans les sédiments sous forme de spore.

MATERIEL ET METHODES

I PRELEVEMENT DU SEDIMENT

Nous avons recherché un sédiment possédant une contamination fécale assez importante pour pouvoir comparer l'efficacité des méthodes de décrochage des bactéries. Nous avons donc fait des prélèvements de vase dans plusieurs endroits de la région brestoise (cf. carte) :



- plage du Moulin Blanc (Brest)
- Le Faou
- Daoulas
- Morlaix
- Elorn (Vervian)

Pour Morlaix et le Moulin Blanc, les prélèvements sont effectués directement au niveau du rejet de la station d'épuration ou de l'émissaire et pour les autres endroits, ils sont situés un peu plus loin en aval du rejet.

La vase étant recouverte à marée haute, tous les prélèvements ont été fait à marée basse.

Elle est prélevée en surface (premier centimètre) à l'aide de grandes cuillères stériles et transportée à 4 °C dans des flacons en plastique stériles.

II LES TECHNIQUES DE DECROCHAGE

II.1 Préparation du sédiment

Les échantillons de sédiment sont dilués au ½ dans de l'eau physiologique avant tout traitement (par exemple 200 g de sédiments dans un flacon stérile contenant 200 mL d'eau physiologique).

Aussi, afin de ramener les résultats par gramme de poids sec, nous remplissons un pilulier de sédiment. Celui-ci est pesé à vide (tare), une fois rempli (poids humide) et après une semaine à l'étuve à 60 °C (poids sec).

II.2 Techniques de décrochage des bactéries du sédiment

↳ **Les traitements physiques**

Ultrasons (US) : réalisés avec une sonde à ultrasons

Nous avons effectué des tests en mode continu et en mode alternatif (pulse 50 %) à la puissance 4 (200W).

La sonde est plongée dans un flacon stérile, placé dans de la glace, contenant le sédiment dilué au ½ (60 mL pour chaque essai).

Les différents temps d'action testés sont les suivants :

- pulse 50 % : 1 min, 3 min, 6 min et 10 min
- continu : 1 min et 3 min

Waring-blendor (WB) : homogénéiseur (utilisé au laboratoire pour broyer des coquillages)

Nous avons testé plusieurs temps de broyage en utilisant deux vitesses high et low de l'appareil :

- position high (22 000 tours/min) : 20 sec 3 fois avec des arrêts d'1 min
1 min 3 fois avec des arrêts de 5 min au

réfrigérateur.

- position low (18 000 tours/min) : mêmes temps

↳ **Les traitements chimiques**

A partir des produits utilisés dans les publications traitant du décrochage des bactéries (5 ; 6 ; 9 ; 11), nous avons réalisé un mélange constitué de :

- Chelex 100 : une résine échangeuse d'ions
- désoxycholate de sodium : un détergent non dénaturant supposé rompre les polymères adhésifs des cellules (11)
- PEG 6000 : PolyEthylène Glycol renforçant l'action du désoxycholate de sodium (11)

Le mélange est effectué à raison d'une concentration pour chaque produit de :

20 g/100 mL pour la chelex 100, 2,5 g/100 mL pour le PEG et 0,1 g/100 mL pour le désoxycholate de sodium.

Les échantillons de sédiment sont dilués au ½ directement dans le mélange et incubés à température ambiante sous agitation magnétique pendant 30 minutes.

(Dans les résultats, le mélange chimique est noté "chelex" ou CH pour raison de simplicité.)

↳ **Traitement enzymatique**

A partir des études réalisées sur le décrochage des bactéries par une méthode enzymatique (4 ; 7), nous avons choisi de tester l'action de deux enzymes : une protéase et une cellulase.

Le mélange enzymatique est constitué à une concentration de 1 mg/mL pour chaque enzyme.

Deux concentrations ont été testées : 0,05 mg/mL et 0,2 mg/mL, ainsi que deux températures d'incubation : 37 °C et 25 °C. Une numération bactérienne est effectuée au bout d'1, 4, 6 et 24 heures.

Un traitement avec des enzymes dénaturées a été réalisé afin de vérifier si les enzymes agissent par leur propriété enzymatique ou par l'apport de nutriments. La dénaturation des enzymes (perte de leur activité enzymatique) a été faite en incubant la solution enzymatique 1 heure à 95 °C dans du tampon borate pH 9. Un test a également été fait avec le tampon borate pour vérifier qu'il n'avait aucun effet sur les bactéries.

III NUMERATIONS BACTERIENNES

III.1 Flore cultivable

↳ Flore cultivable à 20 °C

Nous effectuons la numération de la flore cultivable totale par étalement sur une gélose Tryptone soja Doux (TD) (composition en annexe 2). L'incubation dure 4 jours à 20 °C.

↳ Coliformes thermotolérants

La numération des coliformes fécaux se fait sur le milieu de Mac Conkey (composition en annexe 2). Ce milieu inhibe la flore Gram positive et met en évidence les bactéries lactose + grâce à un indicateur de pH (le rouge neutre). L'incubation est réalisée à 44,5 °C durant 24 h. Seules les bactéries rouges sont prises en compte.

↳ *Clostridium perfringens*

La numération de *Clostridium perfringens* nous a au départ posé quelques problèmes. En effet, nous avons réalisé 2 techniques de numération :

↳ par étalement

↳ par inclusion

Les milieux que nous avons utilisé sont au nombre de 3 (composition et fournisseurs en annexe 1) :

- gélose SPS selon Angelotti
- gélose TSC additionnée de D-cyclosérine
- gélose OPSP additionnée de suppléments A et B

Le principe de ces 3 milieux repose sur la capacité des bactéries anaérobies sulfito-réductrices à réduire les sulfites en sulfure. Chaque milieu contient un sel de fer qui réagit avec l'H₂S formé par les bactéries pour donner un sulfure de fer, ce qui rend les colonies noires avec un halo noir.

Au début les numérations étaient effectuées par simple étalement sur le milieu selon Angelotti. L'incubation se fait en jarre anaérobie pendant 24 h à deux températures : 37 °C et 46 °C, plus sélective de *Clostridium perfringens*.

Par cette méthode, nous n'avons jamais obtenu de colonies noires sur les géloses, signifiant qu'il n'y avait pas de réduction des sulfites. Il nous était donc difficile de supposer que c'était le genre *Clostridium*.

Ensuite nous avons testé la technique par inclusion. Pour cela, la gélose stérilisée était fondue dans un flacon de 100 mL et aliquotée dans des tubes à essai à raison de 20 mL/tube. Les ajouts des antibiotiques pour les géloses TSC et OPSP se font au dernier moment.

On mélange dans un premier temps environ 10-15 mL de gélose avec la suspension déposée au fond de la boîte de Pétri puis on attend que la gélose se solidifie et on verse le reste de la gélose.

L'incubation est aussi réalisée à 37 °C et 46 °C pendant 24 h en jarre anaérobie.

Par cette technique, nous avons obtenu des colonies noires supposées être des *Clostridium perfringens*.

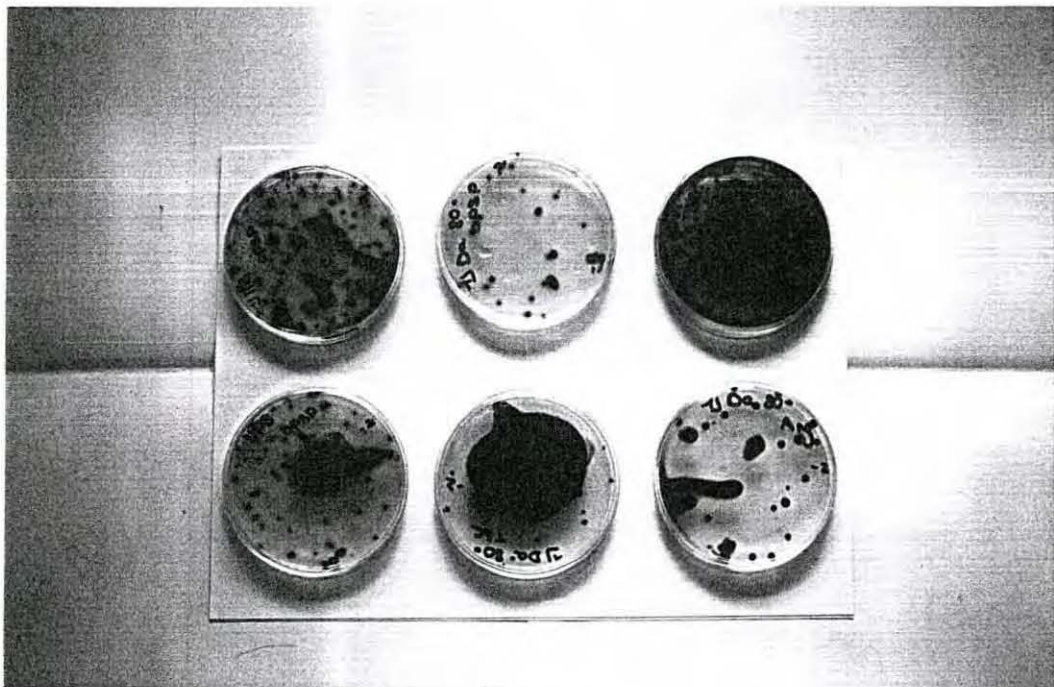


Photo 1 :Aspect des colonies noires obtenues par inclusion avec les milieux ANGELOTTI, TSC et OPSP après 24 h à 46 °C (photo réalisée à IFREMER. D. Guillem)

Confirmation de *Clostridium perfringens*

Pour confirmer que les colonies noires obtenues sur les différents milieux sont des *Clostridium perfringens* nous avons effectué les tests suivants :

➤ Coloration au Gram

Selon les caractéristiques données dans les livres (1 ; 8 ; Bergey's Manual vol 2), c'est un bacille à Gram positif, petit, à bords droits et parallèles aux extrémités arrondies, se tenant isolés, par paire ou en amas.

Nous avons réalisé une coloration au Gram sur 2 colonies noires dans chacune des boîtes.

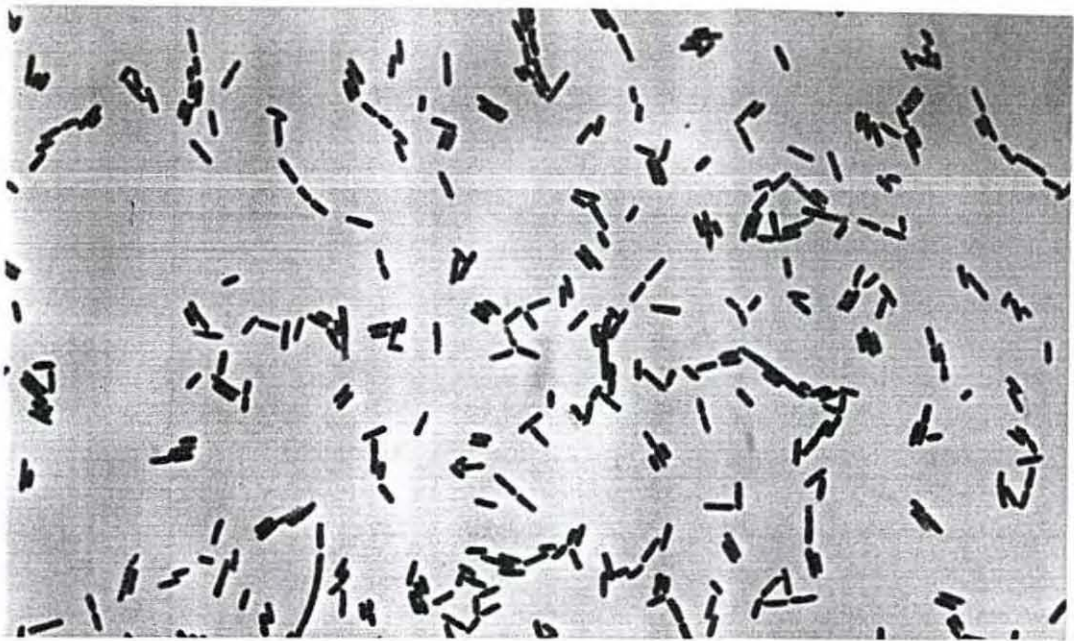


Photo 2 : Coloration de Gram effectuée sur une colonie noire. (photo réalisée à IFREMER. A Derrien)

➤ Test de la catalase

Sachant que le genre *Clostridium* est catalase -, nous avons effectué le test de la catalase au moyen d'eau oxygénée sur 2 colonies de chaque boîte de Pétri.

➤ Galerie API 20 A

Sur 2 colonies noires par boîte nous réalisons une galerie API 20 A (protocole en annexe 3).

La colonie est récupérée de la gélose au moyen d'une anse de platine et est dissoute dans 1 mL d'eau physiologique. Un isolement sur une gélose Angelotti est effectué à partir de cette suspension. A partir des colonies obtenues sur le milieu Angelotti, nous ensemençons l'ampoule de milieu API 20 A MEDIUM afin d'inoculer la galerie.

Recherche de spores de *Clostridium perfringens*

Pour dénombrer les spores de *Clostridium perfringens*, les échantillons de sédiment dilués au $\frac{1}{2}$ sont placés à 80 °C pendant 10 minutes afin de détruire les cellules végétatives. Ensuite, la numération s'effectue comme pour le dénombrement des *Clostridium* totaux, c'est à dire par inclusion avec les trois milieux Angelotti, TSC et OPSP.

III.2 Flore totale

La flore totale est observée grâce à la microscopie à épifluorescence.

La numération s'effectue après coloration au DAPI (4,6-diamidino 2-phenyl indol) (protocole en annexe 3). Le DAPI est un colorant spécifique de l'ADN, ainsi, en se fixant sur les acides nucléiques des bactéries, celles-ci fluorescent sous une lumière UV.

Les bactéries apparaissent en bleu et les matières organiques en jaune.

IV Effet des traitements sur trois souches bactériennes

Nous avons testé les différents traitements sur des suspensions bactériennes dans l'eau de mer afin de vérifier qu'ils ne sont pas toxiques pour les bactéries.

Nous avons choisi trois souches bactériennes d'intérêt sanitaire susceptibles d'être présentes dans le sédiment :

Escherichia coli MG1655 (Mme Bachmann B.)

Salmonella typhimurium 60 62T (Institut Pasteur)

Enterococcus faecalis 103 015 IP (Institut Pasteur)

IV.1 Préparation des souches

Les souches ont étéensemencées par une anse de platine dans un bouillon nutritif Trypto-Caséine-Soja et incubées 18 h à 37 °C.

Puis on réalise un lavage des bactéries en eau physiologique par 3 centrifugations de 20 min à 3500 tr/min .

On inocule 2 mL de suspension bactérienne dans 1L d'eau de mer pour avoir environ 10^6 bactéries par mL (on considère que l'on a $5 \cdot 10^8$ à 10^9 bactéries par ml dans la suspension). L'eau de mer utilisée ici est une eau de mer artificielle reconstituée à partir de sels « Instant Océan », filtrée sur $0,2 \mu\text{m}$ et autoclavée 20 min à 120°C .

Les flaconsensemencés sont placés une nuit à 20°C . Les bactéries ont subi un stress en eau salée et les conditions se rapprochent donc de celles existantes dans les sédiments.

IV.2 Numération

Les traitements effectués sur les 3 souches bactériennes sont ceux que nous allons réaliser sur les sédiments : Ultrasons, Waring-blendor et la solution chimique.

Un flacon n'ayant reçu aucun traitement sert de témoin.

Les numérations sont faites sur gélose Tryptone soja Doux (TD) par étalement au râteau. L'incubation est à 37°C durant 24 h.

RESULTATS ET
DISCUSSION

I LES BACTERIES DANS LE SEDIMENT

Différents types de bactéries ont été recherchés dans les sédiments.

Les numérations réalisées sur les sédiments testés (n'ayant reçus aucun traitement de décrochage) nous renseignent sur le nombre de coliformes thermotolérants : de 30 à 300 par g de sédiment humide, sur la quantité de flore totale cultivable à 20 °C : de 1.10^6 à 4.10^6 par g de sédiment humide et sur le nombre de *Clostridium perfringens* : de 1.10^3 à 1.10^4 par g de sédiment.

En vue de ces résultats, on peut dire que dans les sédiments testés il y a une plus faible quantité de coliformes thermotolérants que de *Clostridium perfringens*.

Deux hypothèses peuvent être envisagées : les *Clostridium perfringens* sont apportés en quantité plus importante par les rejets ou ils survivent mieux dans les sédiments. A ce sujet, des études ont montré que ces bactéries survivaient très bien dans les sédiments grâce à leur capacité à sporuler.

Il faut également souligner la grande quantité de flore totale cultivable à 20 °C dans les sédiments.

Au moyen de la microscopie à épifluorescence nous avons pu observer les bactéries associées aux particules sédimentaires. On retrouve des bacilles isolés ou en chaîne, ainsi que des coques, montrant la grande diversité de la flore sédimentaire.

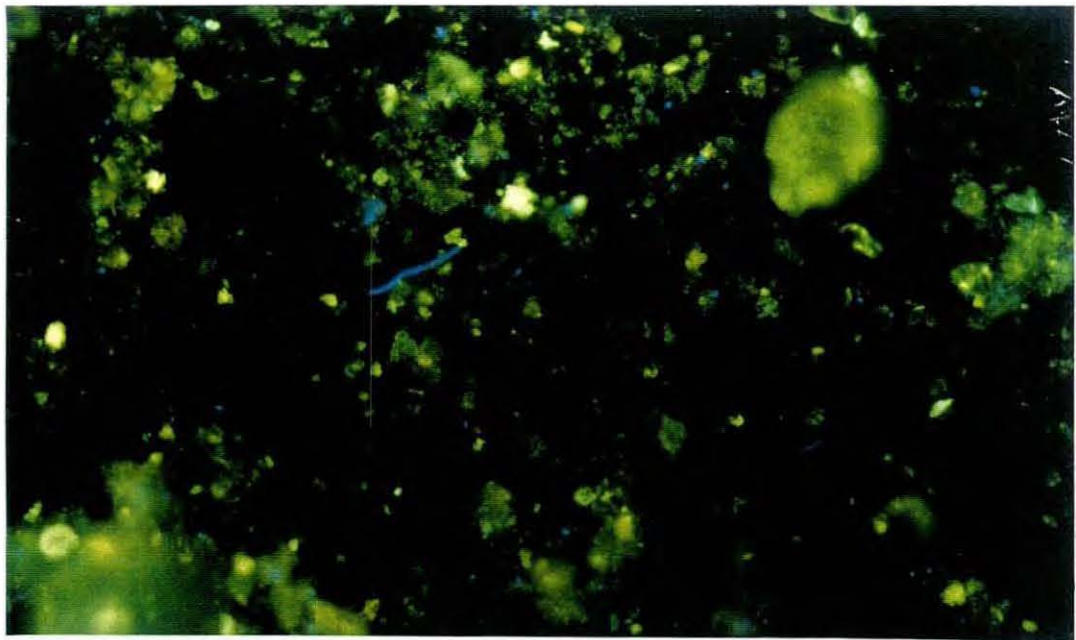
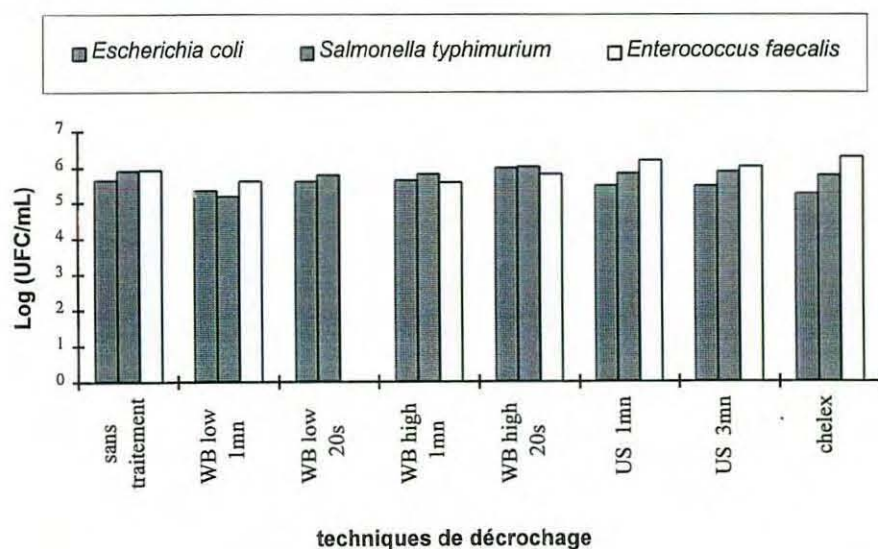


Photo 3 : Flore sédimentaire totale par microscopie à épifluorescence (photo réalisée à IFREMER. A. Derrien).

II EFFICACITE DU DECROCHAGE

Nous avons fait subir à 3 souches bactériennes inoculées dans l'eau de mer les différents traitements de décrochage (ultrasons, Waring Blendor et mélange chimique). On a pu constater que le nombre de bactéries cultivables restait stable avec ou sans traitement (graph. 1).



Graphique 1 : Effet des techniques de décrochage sur 3 souches bactériennes dans l'eau de mer.

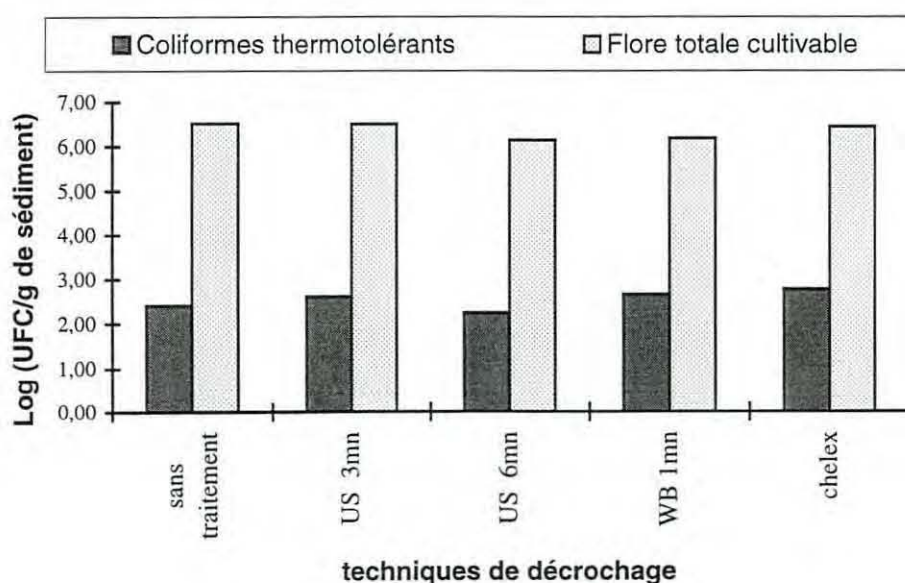
Nous pouvons donc dire que les traitements de décrochage utilisés ne sont pas toxiques pour les bactéries.

II.1 Efficacité des méthodes physiques et chimique

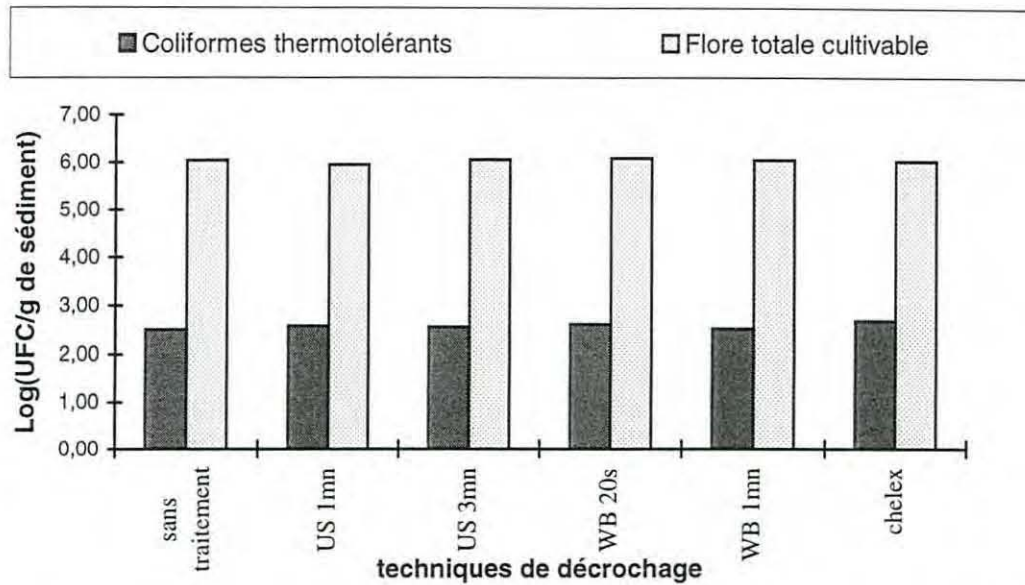
Nous avons réalisé plusieurs essais de décrochage sur les différents échantillons de sédiments, avec 2 répliquats pour la plupart.

Voici les quelques résultats sous forme d'histogramme obtenus sur trois lieux de prélèvement (résultats de tous les prélèvements en annexe 4) :

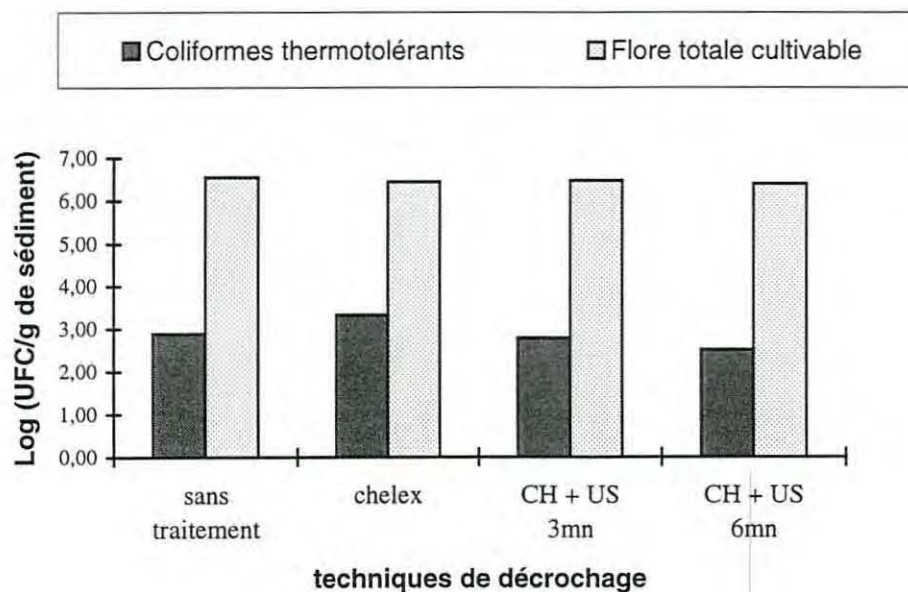
- Morlaix au niveau du rejet de la station (20/04/98)
- Morlaix plus loin en aval du rejet de la station (27/05/98)
- Daoulas (27/04/98)



Graphique 2 : Dénombrement de coliformes thermotolérants et de la flore totale cultivable après traitement de décrochage sur le sédiment de MORLAIX (rejet de la station).



Graphique 3 : Dénombrement des coliformes thermotolérants et de la flore totale cultivable après traitement de décrochage sur le sédiment de MORLAIX (en aval du rejet).



Graphique 4 : Dénombrement des coliformes thermotolérants et de la flore totale cultivable après traitement de décrochage sur le sédiment de DAOULAS.

Coliformes thermotolérants :

Pour les essais des ultrasons de 1 min et 3 min (en mode alternatif) sur le sédiment de Morlaix en aval du rejet (graph. 3), il n'y a pas de variation du nombre de bactéries cultivables. Sur le sédiment prélevé au niveau du rejet il y a une légère

de bactéries cultivables. Sur le sédiment prélevé au niveau du rejet il y a une légère augmentation pour les ultrasons d'une durée de 3 min (graph. 2). Par contre, un traitement aux ultrasons durant 6 minutes entraîne plutôt une baisse du nombre de bactéries.

Au niveau des tests effectués avec l'homogénéiseur Waring Blendor, il n'y a pas de variations du nombre de bactéries cultivables (graph. 1 et 2). Le mélange chimique constitué à base de la résine chelex semble donner de meilleurs résultats, puisqu'il donne une augmentation un peu plus importante (de $\frac{1}{2}$ à 1 Log).

Concernant l'association du mélange chimique et du traitement par ultrasons, elle entraîne une diminution du nombre de coliformes fécaux (graph. 4).

Flore totale cultivable :

Le traitement aux ultrasons n'apporte pas de variation du nombre de bactéries cultivables. On peut remarquer là aussi une diminution par le traitement aux ultrasons de 6 minutes (graph. 2)

Avec l'homogénéiseur Waring Blendor, le nombre de bactéries reste toujours stable par rapport au témoin et est même dans certains cas légèrement diminué.

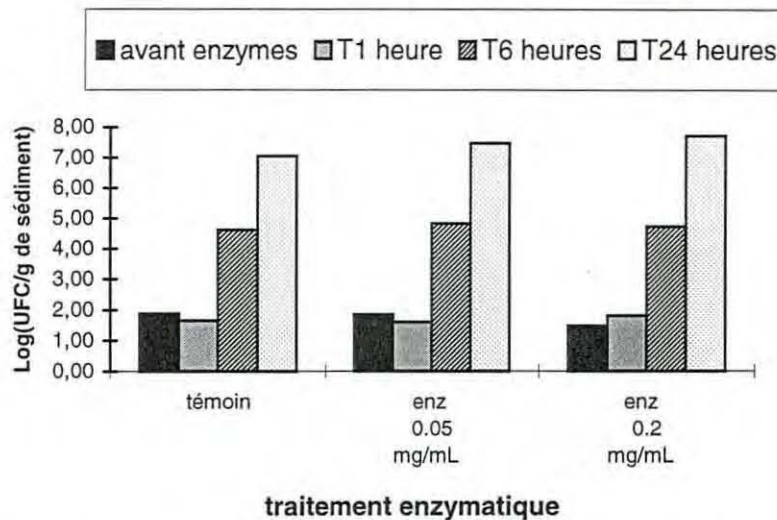
Contrairement à l'effet sur les coliformes thermotolérants, le mélange chimique ne semble pas ici exercer d'action sur le décrochage de la flore totale cultivable. L'association du mélange chimique et du traitement par les ultrasons n'affecte pas non plus le nombre de bactéries cultivables.

D'après ces 3 graphiques et l'ensemble des résultats que l'on a obtenus durant mon stage, nous pouvons dire que les techniques physiques et chimique de décrochage des bactéries des sédiments testés n'ont, en aucun cas, augmenté de manière significative le nombre de bactéries cultivables. On peut même rajouter que certains traitements aux ultrasons peuvent être toxiques pour des temps trop longs. Deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'absence d'efficacité des techniques de décrochage : soit les différents traitements ne décrochent pas bien les bactéries du sédiment, soit l'étalement du sédiment dilué sur les géloses reflète assez bien la population bactérienne présente dans les sédiments.

II.2 Efficacité de la méthode enzymatique

La méthode enzymatique nécessite plus de réflexion.

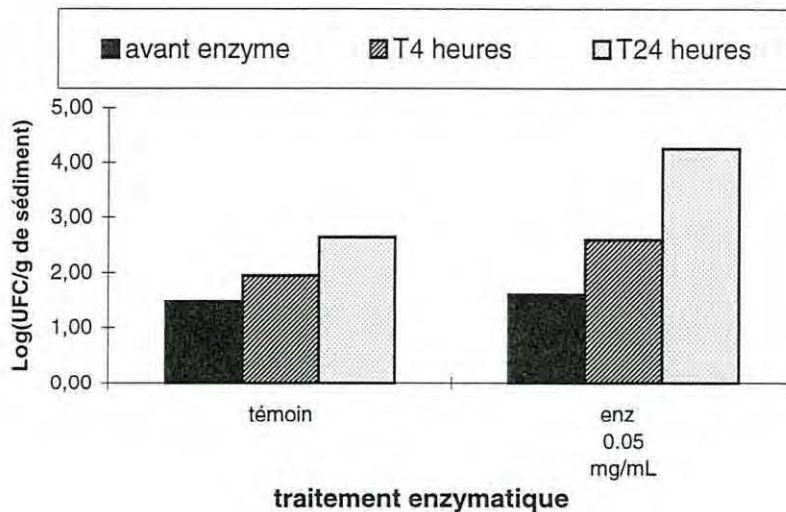
Nous avons tout d'abord réalisé des essais à 37°C car les conditions optimales d'activité des enzymes sont à 37°C.



Graphique 5 : Effet d'un apport d'enzymes (cellulase et protéase) sur les coliformes thermotolérants du sédiment de DAOULAS à 37°C.

On a constaté qu'au bout de 24 h d'incubation le nombre de coliformes fécaux passait d'environ 80 /g de sédiment humide à $1,5 \cdot 10^7$ dans le témoin et à $3,10^7$ en présence des enzymes. Nous observons donc une prolifération bactérienne importante dans le sédiment placé à 37 °C au cours du temps en présence ou non d'enzymes. Les 2 concentrations d'enzymes testées n'augmentent pas sensiblement le nombre de bactéries cultivables par rapport au témoin.

Pour éviter une telle prolifération bactérienne, nous avons donc par la suite conduit des essais à 25 °C sur le même échantillon de sédiment.

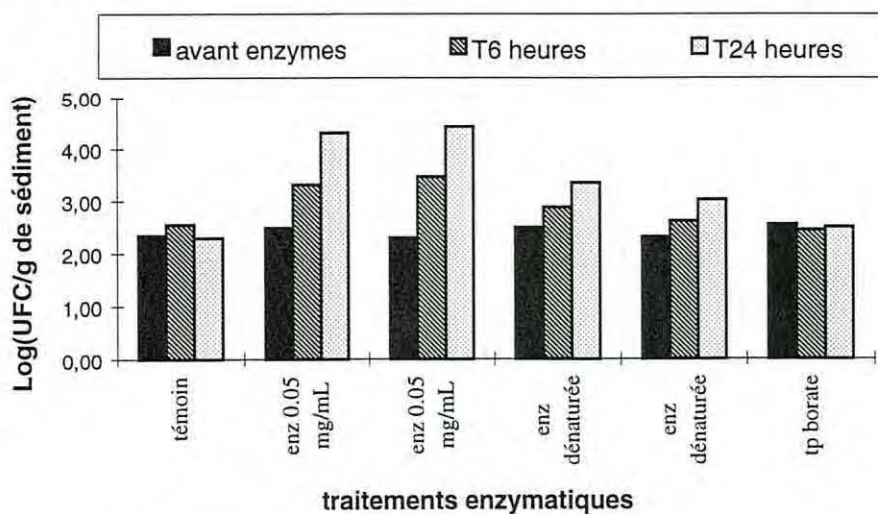


Graphique 6 : Effets d'un apport d'enzymes (cellulase et protéase) sur les coliformes thermotolérants du sédiment de DAOULAS à 25 °C.

A 25 °C, le nombre de bactéries cultivables augmente beaucoup moins en 24 h qu'à 37 °C dans le témoin : de 30 à 400 UFC/g de sédiment humide, tandis qu'en présence des enzymes on passe de 30 à $1,8 \cdot 10^4$ UFC/g de sédiment humide.

A 25 °C, nous observons donc un effet des enzymes sur le nombre de bactéries cultivables.

En vue de ces résultats, nous avons réalisé la suite des traitements à 25 °C. Pour vérifier que les enzymes agissent bien par leur activité enzymatique et non par un apport de nutriments, un essai avec des enzymes dénaturées a été effectué.



Graphique 7 : Effet d'un apport d'enzymes sur les coliformes thermotolérants du sédiment de MORLAIX à 25°C.

Ici, on peut constater que dans le témoin le nombre de bactéries reste stable, ainsi que dans le tampon borate. Pour les enzymes dénaturées, il y a une augmentation du nombre de coliformes fécaux au bout de 24 h. Et enfin, en présence des enzymes, le nombre coliformes thermotolérants passe de 220 à $2,5.10^4$ UFC/g de sédiment humide.

On peut dire qu'en présence d'enzymes non dénaturées il y a une augmentation du nombre de bactéries cultivables par rapport au témoin. Il y a donc une action des enzymes par leur propre activité enzymatique (car plus faible numération en présence des enzymes dénaturées) mais aussi par l'apport de nutriments (car avec les enzymes dénaturées la numération est plus forte que dans le témoin).

III RECHERCHE ET NUMERATION DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

III.1 Recherche et numération des Clostridium perfringens totaux et sous forme sporulée

↳ Clostridium totaux

Les résultats ont été obtenus par la technique de l'inclusion puisque par étalement nous n'avons obtenu que des colonies blanches.

L'incubation à 37 °C nous donne les bactéries anaérobies sulfite réductrices, tandis que l'incubation à 46 °C est plus spécifique de *Clostridium perfringens*. Cette température est souvent utilisée dans l'industrie alimentaire.

	Clostridium totaux					
	ANGELOTTI		TSC		OPSP	
	37°C	46°C	37°C	46°C	37°C	46°C
18/05/98 DAOULAS	6480 4400	4640 4180	4320 4000	3000 3640	4300 3820	3380 2740
18/05/98 MOULIN BLANC	2.41E+04	1.29E+04	9.80E+03	1.55E+04	1.48E+04	1.66E+04
25/05/98 DAOULAS		1.08E+04 6.50E+03		envahi/le noir envahi/le noir		6.10E+03 5.20E+03
25/05/98 MOULIN BLANC		1.88E+04 1.40E+04		1.40E+04 9.00E+03		1.33E+04 8.50E+03
27/05/98 MORLAIX		1.10E+04 1.13E+04		9.80E+03 7.50E+03		8.80E+03 9.30E+03

Tableau 1 : Quantité de *Clostridium perfringens* totaux / gramme de sédiment humide.

↳ Spores de Clostridium

A 46 °C, en étalant le sédiment directement, nous obtenons les *Clostridium perfringens* totaux (formes végétatives + spores) présents dans les sédiments.

Après le passage de 10 minutes à 80 °C de l'échantillon, nous obtenons la quantité de *Clostridium perfringens* sous forme de spores présents dans le sédiment.

	Spores de Clostridium					
	ANGELOTTI		TSC		OPSP	
	37°C	46°C	37°C	46°C	37°C	46°C
18/05/98 DAOULAS	1540 1050	1260 1090	1170 910	640 1240	1920 1390	1580 1000
18/05/98 MOULIN BLANC	4,70E+03	2,30E+03	5,60E+03	7,40E+03	3,80E+03	6,70E+03
25/05/98 DAOULAS		3,10E+03 1,00E+03		2,00E+03 1,20E+03		2,40E+03 1,00E+03
25/05/98 MOULIN BLANC		6,20E+03 2,70E+03		6,00E+03 3,00E+03		6,00E+03 2,50E+03
27/05/98 MORLAIX		2,10E+03 2,90E+03		3,30E+03 2,80E+03		2,00E+03 1,90E+03

Tableau 2 : Quantité de spores de *Clostridium perfringens* / gramme de sédiment humide.

↳ Clostridium sous forme végétative

Lorsqu'on a le nombre de *Clostridium perfringens* totaux et la quantité sous forme sporulée, on peut obtenir la quantité sous forme végétative.

	Formes végétatives					
	ANGELOTTI		TSC		OPSP	
	37°C	46°C	37°C	46°C	37°C	46°C
18/05/98 DAOULAS	4940	3380	3150	2360	2380	1800
	3350	3090	3090	2400	2430	1740
18/05/98 MOULIN BLANC	19400	10600	4200	8100	11000	9900
25/05/98 DAOULAS		7700				3700
		5500				4200
25/05/98 MOULIN BLANC		12600		8000		7300
		11300		6000		6000
27/05/98 MORLAIX		8900		6500		6800
		8400		4700		7400

Tableau 3 : *Quantité de Clostridium perfringens sous forme végétative / gramme de sédiment humide.*

D'après ces résultats on peut dire que la quantité de *Clostridium perfringens* est plus élevée sous forme végétative que sous forme sporulée.

Le rapport spores / *Clostridium* totaux nous donne le pourcentage de *Clostridium perfringens* vivant dans les sédiments sous forme sporulée.

D'après tous nos résultats nous avons trouvé que environ 30 % des *Clostridium perfringens* étaient sous forme sporulée.

III.2 Comparaison des milieux solides utilisés

Les trois milieux sélectifs retenus dans notre étude pour dénombrier *Clostridium perfringens* sont les milieux ANGELOTTI, TSC et OPSP.

Nous voulons savoir s'il y a une différence dans le nombre de *Clostridium perfringens* mis en évidence dans les sédiments et si les milieux sont assez spécifiques de *Clostridium perfringens*.

↳ Comparaison des compositions des milieux

Tout d'abord ces 3 milieux ont comme principe la réduction des sulfites en sulfure des bactéries sulfito-réductrices. La présence de citrate ferrique dans la gélose selon Angelotti et de citrate de fer ammoniacal dans les géloses TSC et OPSP permet la formation du précipité noir autour des bactéries.

Chaque milieu contient un antibiotique différent, non toxique à *Clostridium perfringens*, qui permet d'éliminer les autres bactéries :

- D-cyclosérine (TSC)
- Polymyxine B + Sulfadiazine (Angelotti)
- Oléandomycine + Polymyxine B (OPSP)

D'une façon générale se sont des milieux adaptés pour la recherche et le dénombrement des ASR mais aussi pour la recherche et le dénombrement de *Clostridium perfringens*. Cependant une confirmation de *Clostridium perfringens* est nécessaire pour chaque milieu.

↳ Comparaisons des résultats à 37 et 46 °C

D'après les résultats (tableaux 1 et 2), on peut observer aucune différence entre les numérations sur chaque milieu à 37 °C ou à 46 °C.

Néanmoins, on a remarqué que sur les géloses TSC il y avait beaucoup plus de bulles d'air (poches de gaz) que sur les autres géloses et qu'il y avait une diffusion irrégulière et d'une forte intensité du halo noir autour des colonies rendant la numération difficile.

De même, pour les géloses OPSP le précipité noir autour des colonies rendait la distinction des plusieurs colonies rapprochées difficile.

Tandis que sur les géloses Angelotti, les colonies étaient plus grosses et plus distinctes. Pour une question de facilité de numération, le milieu selon Angelotti nous a semblé donc être le meilleur.

Concernant les tests de confirmation de *Clostridium perfringens*, les bactéries observées au Gram étaient toutes similaires, toutes les colonies testées étaient catalase - , et enfin, les résultats des galeries API 20 A donnaient *Clostridium perfringens* dans chaque cas.

CONCLUSION

Nous avons essayé de déterminer une technique de décrochage des bactéries entériques des sédiments marins qui soit efficace et fiable.

En conclusion, d'après les résultats obtenus, nous pouvons dire que les techniques physiques et chimique testées n'apportent pas de changement sur les numérations bactériennes. Le traitement enzymatique à 25 °C augmente par contre le nombre de bactéries mises en évidence dans le sédiment . Mais compte tenu du peu de tests que nous avons réalisés, des études supplémentaires devront être effectuées.

Il faut souligner que nous étalions directement le sédiment sur les géloses, contrairement à certaines études où ils laissaient décanter le sédiment et étalaient le surnageant. Dans notre cas, il est difficile de savoir si les techniques ont vraiment décrochés les bactéries des particules sédimentaires ou si les numérations révèlent exactement toutes les bactéries présentes dans le sédiment.

En ce qui concerne la recherche et la numération de *Clostridium perfringens* dans les sédiments, par étalement nous n'avons obtenu que des colonies blanches, la réduction des sulfites en sulfure n'a été mise en évidence que par la technique de l'inclusion. Nous pouvons donc dire que de bonnes conditions d'anaérobiose sont nécessaires pour avoir des colonies noires *Clostridium perfringens* présumé. Enfin, *Clostridium perfringens* est un bon indicateur de contamination fécale puisqu'il est capable de survivre plus longtemps dans les sédiments que les coliformes thermotolérants.

BIBLIOGRAPHIE

1. BIANCHI, M. *et al.* *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*, Masson. Paris 1995.
2. COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G., CHENG, K.J. (1978) : Comment collecter les bactéries ? *Pour la science*, **5**, 100-110.
3. COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G.. (1979). Microbial contamination of surfaces. *In : Surface contamination*, édité par Mittal K.L., Plenum Press Publishing, New-York, 211-221.
4. CHEVRIER, M.C.. *Etude de l'action d'enzymes sur les numérations des populations bactériennes d'eaux douces, marines et sédiments*. DEA de Microbiologie, Paris-Sud 1983.
5. DERRIEN, A., DUPRAY, E., CAPRAIS, M.P.. (1992). *Essai de décrochage de bactéries de sédiments côtiers par action physique et chimique*. Rapport interne IFREMER / DEL.
6. EPSTEIN, S., ROSSEL, J.. (1995) : Enumeration of sandy sediment bacteria : search for optimal protocol. *Marine ecology progress series*, **117**, 289-298.
7. LE GUYADER, F.. Colonisation bactérienne et implantation de *E. coli* dans le sédiment d'origine littoral. Thèse Université de Rennes I 1988.
8. LE MINOR, L., VERON, M.. *Bactériologie médicale*. Médecine-Science-Flammarion. Paris 1982.
9. LINDAHL, V., BAKKEN, R. (1995) : Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol. Ecol.*, **16**, 135-142.
10. MC DANIELS, J.A., CAPONE, D.G. (1985) : A comparison of procedures for the separation of aquatic bacteria from sedimentation for subsequent direct enumeration. *Microbiol. Methods*, **3**, 291-302.
11. LUCAS, F. *et al* (1996) : Bactéries du sédiment : extraction et distribution sur un estran (baie du Mont St Michel). *CR.Acad.Sci.Paris, Science de la vie/Life science*, **319**, 537-540.
12. POMMEPUY, M. *et al* (1989). Le devenir de la charge bactériologique des sédiments dragués. *Actes du séminaire international sur les aspects environnementaux liés aux activités de dragages*.
13. POMMEPUY M., CORMIER, M., BRUNEL, M., BRETON, M. (1987). Etude de la flore bactérienne d'un estuaire breton. *Oceanologica acta*, **10**, 187-195.
14. POUMEYROL, M., BILLON, J. (1991). Le genre *Clostridium* et les micro-organismes anaérobies sulfite-réducteurs. *In : Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agro-alimentaires*, **3**, Tec et Doc Lavoisier, Paris, 293-304.
15. Normes AFNOR (1986). Eaux méthodes d'essai.

ANNEXES

ANNEXE 1

Gélose SPS selon ANGELOTTI (Sanofi Pasteur)

(en gramme par litre d'eau distillée)

• Tryptone	15
• Extrait de levure	10
• Citrate ferrique	0.5
• Sulfite de sodium anhydre	0.5
• Thioglucate de sodium	0.1
• Tween 80	0.05
• Sulfate de polymyxine B	0.01
• Sulfadiazine sodique	0.12
• Agar	14

Gélose OPSP (Oxoid)

(en gramme par litre d'eau distillée)

• Tryptone	15
• Extrait de levure	5
• Citrate de fer ammoniacal	1
• Métabiosulfite de sodium	1.5
• Peptone de soja	5
• Extrait de foie	7
• Tampon tris	1.5
• Agar	10

Supplément A : Sulfadiazine (40microlitres dans 10ml de gélose)

Supplément B : Oléandomycine (phosphate) + Polymyxine B (idem))

Gélose TSC (Sanofi Pasteur)

(en gramme par litre d'eau distillée)

• Tryptose	15
• Extrait de levure	5
• Citrate de fer ammoniacal	1
• Métabisulfite de sodium	1
• Peptone de soja	5
• Extrait de viande de boeuf	5
• Agar	14

Supplément TSC = D-cyclosérine (0.1ml d'une solution à 4% dans 10ml de gélose)(Sigma)

ANNEXE 2

Gélose Tryptone soja Doux (TD)

(en gramme par litre d' eau distillée)

• Tryptone	15
• Peptone de soja	5
• Chlorure de sodium	5
• Agar	15

Agar de Mac Conkey

(en gramme par litre d'eau distillée)

• Peptone de caséine	17
• Peptone de viande	3
• Lactose	10
• Mélange de sels biliaires (inhibiteur de la flore Gram +)	1.5
• Chlorure de sodium	5
• Rouge neutre (indicateur de pH)	0.03
• Cristal violet (inhibiteur de la flore Gram+)	0.001
• Agar-agar	13.5

ANNEXE 3

PROTOCOLE de la COLORATION au DAPI

- Filtration des échantillons sur filtre Nucléopore coloré en noir (0.2 µm de diamètre)
- Ajout de 2 mL de solution de DAPI à une concentration de 2.5 µg/mL. On couvre la tulipe de papier aluminium pour le maintenir à l'obscurité et on laisse en contact pendant 20 mn.
- Elimination du DAPI et rinçage des filtres par de l'eau milliQ stérile.
- Dépot du filtre sur une lame avec une goutte d'huile.
Ajout d'une goutte d'huile sur le filtre et dépot d'une lamelle
Lecture au microscope sous lampe à UV.

NB : conservation des lames à 4°C avant la lecture.

PROTOCOLE de la galerie API 20 A

- Ensemencer le milieu API 20 A MEDIUM avec quelques colonies pures obtenues après isolement
- On inocule la galerie API 20 A avec le milieu API 20 A MEDIUM ensemencé au moyen d'une pipette Pasteur.
Pour le test GEL, on remplit la cupule entièrement.
Pour le test IND, on met une goutte d'huile de parafine après l'inoculation pour éviter l'évaporation de l'indole formé.
- On place la galerie dans une jarre anaérobie à 37°C durant 24 h.

ANNEXE 4

Récapitulatif des résultats des essais de décrochage des bactéries des sédiments

Décrochage des coliformes thermotolérants

(en Log(UFC/g de sédiment humide))

	sans traitement	Ultra-sons pulse				US continus	
		1mn	3mn	6mn	10mn	1mn	3mn
07/04/98 ELORN superficiel	1,48	1,60	1,00				
07/04/98 ELORN profond			1,00				
20/04/98 MORLAIX rejet	2,63 2,30	2,59 2,56	2,64 2,45				
22/04/98 MORLAIX rejet	2,73 2,30			2,38 2,41	2,38 2,20	2,58 2,62	2,38 2,30
27/04/98 DAOULAS	2,40 3,11						
12/05/98 DAOULAS	1,00 2,00		1,70 2,15	1,78 1,00			
27/05/98 MORLAIX escalier	2,40 2,41		2,62 2,60	2,36 2,08			

	WB high		WB low		chelex	chelex +US	
	20sec	1mn	20sec	1mn		3mn	6mn
07/04/98 ELORN superficiel			1,70	1,85	1,90		
07/04/98 ELORN profond				1,30	1,00		
20/04/98 MORLAIX rejet	2,40 2,75	2,58 2,45	2,81 2,51				
22/04/98 MORLAIX rejet							
27/04/98 DAOULAS					3,04 3,50	2,75 2,83	2,59 2,41
12/05/98 DAOULAS		1,00 1,60			1,48 1,78		
27/05/98 MORLAIX escalier		2,66 2,65			2,93 2,52		

ANNEXE 5

Récapitulatif des résultats des essais de décrochage des bactéries des sédiments

Décrochage de la flore totale cultivable

(en Log(UFC/g de sédiment humide))

	sans traitement	US pulse				US continus	
		1mn	3mn	6mn	10mn	1mn	3mn
07/04/98 ELORN superficiel	6,09	6,36	6,00				
07/04/98 ELORN profond	5,32	6,15	5,53				
20/04/98 MORLAIX rejet	5,94	5,99	6,25				
	6,12	5,92	5,65				
22/04/98 MORLAIX rejet	6,52			6,32	6,52	6,35	6,17
	6,46			6,07	5,51	6,26	5,59
27/04/98 DAOULAS	6,52						
	6,59						
12/05/98 DAOULAS	5,00		6,18				
	6,67		6,21	6,20			
27/05/98 MORLAIX escalier	6,32		6,23	6,14			
	6,64		6,66	6,10			

	WB high		WB low		Chelex	chelex+US	
	20sec	1mn	20sec	1mn		3mn	6mn
07/04/98 ELORN superficiel			6,10	6,08	6,51		
07/04/98 ELORN profond			5,58	5,59	5,34		
20/04/98 MORLAIX rejet	6,15	6,03			6,11		
	5,15	6,06			5,90		
22/04/98 MORLAIX rejet							
27/04/98 DAOULAS					6,55	6,53	6,42
					6,31	6,42	6,39
12/05/98 DAOULAS		5,08			5,91		
		6,25			6,32		
27/05/98 MORLAIX escalier		6,18			1,44		
					6,44		

ANNEXE 6

Récapitulatif des résultats des essais de décrochage des bactéries des sédiments

Décrochage des Coliformes thermotolérants

(en Log (UFC/g de sédiment humide))

	US avt enzyme					T 1 heure			T 4 heures	
	témoin	enz 0,05mg/ml	enz 0,2mg/ml	enz dénaturées	tampon borate	témoin	enz 0,05mg/ml	enz 0,2mg/ml	témoin	enz 0,05mg/ml
12/05/98 DAOULAS 37 °C	6,06 5,99	6,27	6,90			6,14 6,33	6,12 6,23	6,06 6,31		
13/05/98 DAOULAS 25 °C									6,60 7,88	7,08 7,32
27/05/98 MORLAIX 25 °C	6,29 6,32	6,09 6,25		6,07 6,19	6,36 6,28					

	T 6 heures					T 24 heures				
	témoin	enz 0,05mg/ml	enz 0,2mg/ml	enz dénat	tp borate	témoin	enz 0,05mg/ml	enz 0,2mg/ml	enz dénat	tp borate
12/05/98 DAOULAS 37 °C	6,85 6,59	6,95 6,93	7,00 7,11			7,98 8,18	8,00 8,30	8,52 8,27		
13/05/98 DAOULAS 25 °C						7,46	8,04 8,02			
27/05/98 MORLAIX 25 °C	7,66 7,64	6,48 6,78		6,37 6,17	6,38 6,27	6,30 6,38	7,68 7,74		6,67 6,60	6,33 4,35