

64

BIVALVES : INDICATEURS DE POLLUTION MICROBIENNE DES EAUX LITTORALES

A. PLUSQUELLEC*, M. BEUCHER*, Y. Le GAL**

* IUT de Biologie Appliquée - Université de Bretagne Occidentale - QUIMPER (FRANCE)

** Laboratoire de Biologie Marine Collège de France - CONCARNEAU (FRANCE)

RÉSUMÉ - Une étude a été réalisée en baie de Concarneau (France), dans le but de comparer la contamination de l'eau et de moules d'un même site naturel par le dénombrement des indicateurs fécaux usuels : Coliformes fécaux et Streptocoques fécaux.

La concentration par les bivalves est importante, mais diffère pour les deux indicateurs bactériens.

Le dénombrement des Streptocoques fécaux dans les bivalves permet d'annuler une partie des variations observées dans l'eau.

L'efficacité des moules comme matériel pour la recherche des Salmonelles a été confirmée.

ABSTRACT - Sea water and mussels from a natural site (Concarneau - France) have been compared for fecal contamination by enumeration of their fecal Coliform and fecal Streptococci content.

Mussels contain a significant concentration of bacteria, although this concentration differs for the two indicators.

Enumeration of fecal Streptococci in bivalves leads to a reduction of the variability observed in sea water.

Mussels allow a more efficient assessment of Salmonella in the marine environment than sea water itself.

INTRODUCTION

Les études de bactériologie quantitative portant sur les eaux littorales s'avèrent difficiles, et une grande variabilité apparaît souvent dans les résultats. Celle-ci peut s'expliquer par l'irrégularité des apports bactériens, les paramètres météorologiques, les facteurs hydrodynamiques, et l'analyse bactériologique elle-même. (Breittmayer J.P. et Gauthier M.J. 1979).

Dans le cas des côtes atlantiques, l'influence des courants de marée est prépondérante principalement dans les baies ou estuaires. Ceci a été établi très nettement pour la baie de Concarneau - La Forêt, en Bretagne sud (Pinot et Coat 1979).

Les plans d'échantillonnage permettant d'annuler ces variations sont rarement compatibles avec les possibilités analytiques. Il paraît donc utile de rechercher des matériels d'étude qui, par leur nature, permettraient d'estomper en partie les variations observées dans les eaux de surface.

Parmi les supports capables de piéger les bactéries présentes dans l'eau, et de les maintenir en vie, les supports inertes, les sédiments et les animaux marins sont le plus souvent évoqués.

Parmi les animaux marins capables de retenir les bactéries présentes dans l'eau, les bivalves sont le plus souvent cités, en raison de leur capacité de filtration importante (Jorgensen 1960), qui leur permet de concentrer les particules et les polluants du milieu.

Leur utilisation est déjà très répandue pour la comparaison des niveaux de pollution chimique en mer (Goldberg 1975).

Nous avons voulu tester si les mêmes avantages pouvaient être obtenus dans le cadre de l'étude de la contamination en bactéries fécales des eaux littorales.

Dans ce but, une étude comparée de la contamination des eaux de surface et de celle des moules naturellement présentes dans le milieu, a été menée sur le site de la baie de Concarneau.

MATERIEL ET METHODES

Site de l'étude

Le site retenu pour cette étude est situé en fond de baie de Concarneau - La Forêt. Cette station est soumise à la pollution issue de deux rejets urbains.

Une étude préalable portant sur les eaux de surface avait révélé une contamination importante, et très variable (Plusquellec, 1984). Un suivi, en fonction de la marée avait montré que la contamination sur ce site dépendait étroitement des courants de flot et de jusant.

La présence d'une zone rocheuse permet la récolte de moules sauvages à des hauteurs de marée très diverses.

Echantillonnage

Les prélèvements ont été réalisés entre les mois de mai et août (pendant la saison balnéaire, et en dehors de cette période).

Chaque prélèvement est constitué d'une vingtaine de moules, immergées, et d'un litre d'eau de mer prélevé en plusieurs fois à 30 cm environ de profondeur, dans un flacon stérile.

Dans la mesure où les conditions de marée le permettaient, les prélèvements étaient réalisés à 10 heures du matin. Ce protocole a donc permis d'obtenir des échantillons dans les situations de marée les plus diverses.

Préparation des échantillons

Les dénombrements sur l'eau ont été réalisés sans aucune préparation.

Les moules ont été débarrassées des byssus et des épizoaires présents sur leur coquille, puis brossées sous l'eau du robinet, et enfin désinfectées superficiellement par un jet d'alcool et flambage rapide.

Après ouverture aseptique, le contenu entier : chair et liquide intervalvaire, est recueilli stérilement, puis dilué au tiers, et soumis au broyage par Ultra-Turrax (15 000 t/mn pendant 30 secondes).

L'analyse porte donc sur le mélange chair plus liquide intervalvaire, et les résultats sont exprimés pour 100 ml de ce mélange.

Analyse bactériologique

Les indicateurs fécaux usuels : coliformes thermorésistants et Streptocoques D ont été dénombrés par technique d'ensemencements multiples en milieu liquide (3 tubes par dilution).

Les Streptocoques D ont été dénombrés par ensemencement sur bouillon lactosé au bromocrésol pourpre, avec cloche, incubé à 30°C 48 heures, puis subculture sur bouillon lactosé bilié au Vert Brillant incubé à 44°C.

La numération des Streptocoques D a été réalisée sur milieu de Rothe avec subculture sur milieu de Litsky à l'azide et Ethyl violet (incubation à 37°C).

La recherche des Salmonelles a été réalisée par méthode semi-quantitative, portant soit sur 250 ml d'eau, soit sur 25 ml du contenu des bivalves.

La préparation de moules est broyée en milieu de pré-enrichissement (eau peptonée tamponnée), qui est incubé pendant 16 heures à 37°C.

Les 250 ml d'eau sont filtrés sur membrane qui estensemencée en eau peptonée tamponnée.

Après incubation, 2 ml du pré-enrichissement sont inoculés dans 20 ml de milieu d'enrichissement. Dans la plupart des cas, un double enrichissement a été réalisé :

- sur milieu Tetrathionate au Vert Brillant incubé à 43°C,
- sur milieu au Sélénite incubé à 37°C.

Après 24 heures d'incubation des isolements sont réalisés à partir de ces enrichissements sur gélose au Vert Brillant (BGA) et gélose Salmonella Shigella (SS).

Les colonies suspectes ont été caractérisées, et lorsque l'appartenance au genre *Salmonella* a été établie, les souches ont été soumises au sérotypage qui a été confirmé dans certains cas par le centre des *Salmonella*.

RESULTATS

Etude comparée de la contamination de l'eau et des moules

Les résultats des dénombrements d'indicateurs rapportés à 100 ml d'eau ou 100 ml du contenu de moules ont été figurés en fonction du temps (fig. 1), et résumés dans un tableau (Tab. 1).

	Eau		Moules	
	Coliformes Fécaux (CFE)	Streptocoques Fécaux (SFE)	Coliformes Fécaux (CFM)	Streptocoques Fécaux (SFM)
Nombre de prélèvements	56	56	56	56
Moyenne des valeurs Log	2,70	1,86	3,82	4,26
Ecart type	0,85	1,08	0,78	0,76
Coefficient de variation (%)	31,4	58,0	20,4	17,8
Moyenne	5,0 10 ²	7,2 10 ¹	6,6 10 ³	1,8 10 ⁴

Tableau 1 : Résultats des dénombrements comparés sur eau et moules.

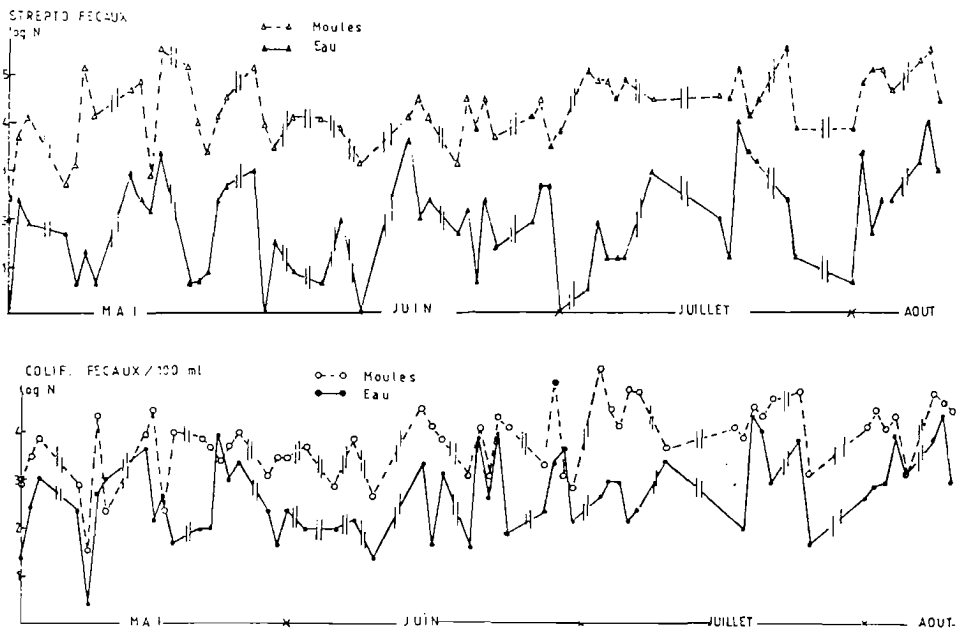


Figure 1 : Résultats des dénombrements journaliers sur eau et moules.

La figure 1 permet de noter des différences de niveau entre la contamination des eaux et celle des moules, surtout dans le cas de Streptocoques fécaux.

Les variations de jour en jour sont importantes pour les quatre séries de résultats.

On peut remarquer un certain parallélisme entre les variations dans les eaux et les moules, surtout pour les Coliformes fécaux.

Ces séries de dénombrements peuvent être comparées par la figuration des fréquences cumulées des résultats obtenus. La représentation en coordonnées gaucco logarithmiques permet d'obtenir des droites qui renseignent sur le niveau médian et la variabilité (fig. 2).

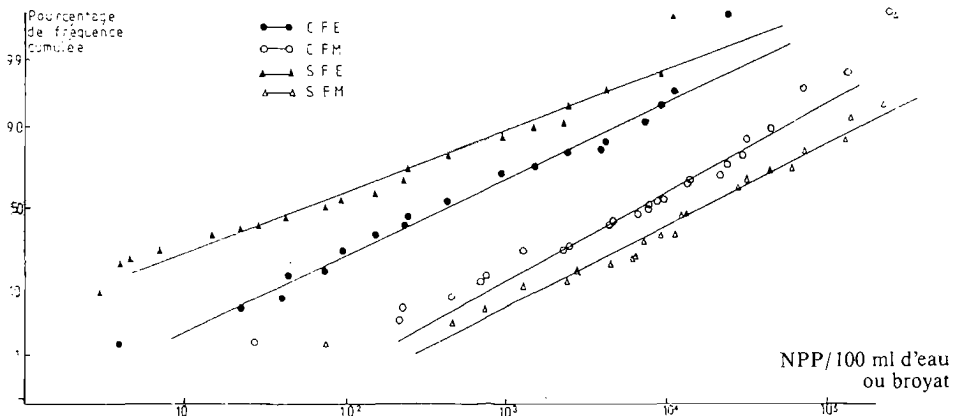


Figure 2 : Représentation des résultats par leurs fréquences cumulées en coordonnées gaucco logarithmiques.

Cette figuration permet de déterminer la concentration réalisée par les moules. Le niveau médian passe de $4,0 \cdot 10^2$ dans l'eau à $5,6 \cdot 10^3$ dans les moules pour les Coliformes fécaux, et de $6,0 \cdot 10^1$ à $1,6 \cdot 10^4$ pour les Streptocoques fécaux.

Pour les deux indicateurs bactériens, les pentes sont plus prononcées dans le cas des bivalves, ce qui traduit une variabilité plus faible.

Concentration des bactéries par les bivalves

L'examen des moyennes géométriques obtenues pour chaque série permet d'estimer la concentration réalisée par les bivalves (Tab. 1).

Le facteur de concentration est égal à 13,1 pour les Coliformes fécaux et 254,1 pour les Streptocoques fécaux.

La concentration des bactéries de l'eau par les bivalves est donc tout à fait effective, mais on doit remarquer qu'elle diffère nettement pour les deux groupes bactériens étudiés.

Variabilité des dénombrements sur les eaux et les moules

L'examen des coefficients de variation obtenus pour chaque série (Tab. 1) fait apparaître une variation sensiblement plus faible dans le cas des bivalves.

Pour tester si la variabilité diffère de façon significative, entre les deux matériels d'étude, on peut appliquer le test de Fisher pour la comparaison des variances.

Pour les Coliformes thermotolérants $F = 1,09$ NS ($P > 0,05$),
 Pour les Streptocoques D $F = 2,07$ ** ($P < 0,01$).

Ceci amène à conclure que les variances diffèrent significativement dans le cas des Streptocoques fécaux, mais pas dans celui des coliformes fécaux.

Relation entre la contamination de l'eau et des moules au même moment

On peut se demander si les variations observées dans les deux matériels d'étude sont indépendantes les unes des autres, ou si, au contraire, la contamination des moules est liée à celle de l'eau au même moment. Pour répondre à cette question, la régression des résultats obtenus dans les moules sur ceux de l'eau du même prélèvement a été testée (Fig. 3).

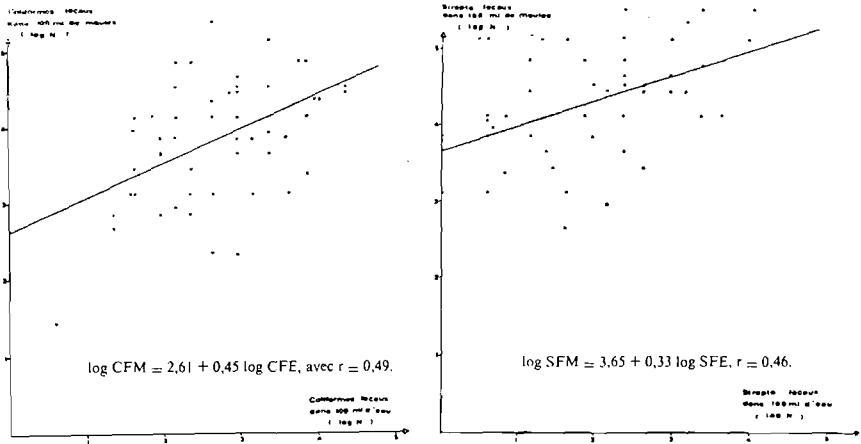


Figure 3 et 4 : Relation entre la contamination des moules et de l'eau d'un même prélèvement.

Dans les deux cas, les droites de régression présentent une pente positive, et indiquent donc qu'une liaison existe. Les coefficients de corrélation traduisent une liaison très significative (pour 55 ddl et $P = 0,01$, $r = 0,33$).

La contamination mesurée dans les bivalves est donc en relation avec celle de l'eau prélevée au même moment, du moins dans le cas de prélèvements espacés d'au moins 24 heures. Il a été vérifié, par contre, qu'aucune liaison n'existe entre la contamination des moules et celle de l'eau prélevée 24 heures plus tôt.

Les résultats précédents concernant la concentration par les bivalves, les variations et les relations entre les deux matériels d'étude s'appliquent à des prélèvements espacés d'au moins 24 heures. Une étude a été réalisée sur le même site, mais avec des prélèvements plus rapprochés, afin de tester si les moules sont capables d'intégrer des variations rapides de contamination telles que celles qui apparaissent dans les eaux au cours d'un cycle de marée.

Etude de la contamination de l'eau et des moules au cours d'un cycle de marée

Les prélèvements ont été réalisés entre basse mer moins 3 h 30, et pleine mer plus 0 h 20, au cours d'une marée de vive eau (coefficient 80).

Les résultats sont exprimés sur la figure 4.

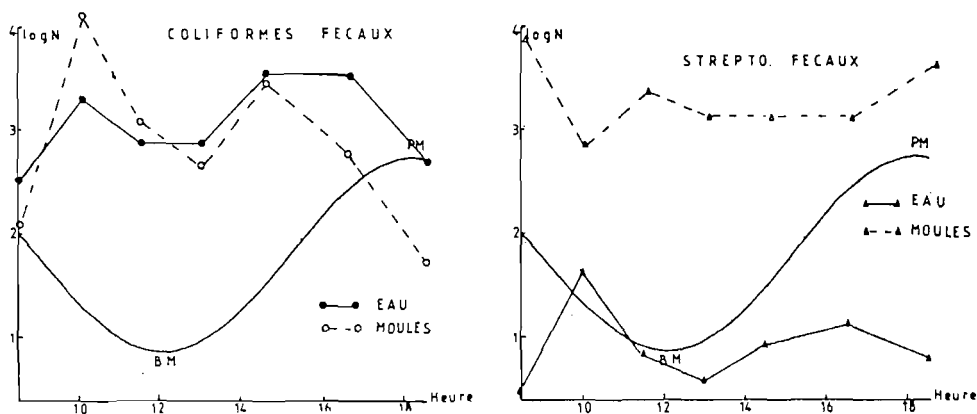


Figure 4 : Contamination de l'eau et des moules au cours d'un cycle de marée.

On vérifie que la contamination dans l'eau évolue avec la marée, avec maxima à BM - 2 heures et BM + 4 heures.

Si l'on considère séparément les indicateurs, on constate que, pour les Coliformes 44°C, la contamination des moules suit de manière fidèle celle de l'eau. La concentration réalisée par les moules est faible dans ce cas.

Par contre, pour les Streptocoques D, on observe une concentration importante par les bivalves et, par ailleurs, on ne constate plus aucun parallélisme entre les taux de bactéries dans les moules et dans l'eau.

Utilisation des moules comme matériel d'étude : application à la baie de Concarneau.

L'utilisation des moules pour situer le niveau de contamination d'une zone littorale a été appliquée à la baie de Concarneau.

L'analyse de prélèvements mixtes d'eau et de moules a porté sur huit stations. Les résultats obtenus (Plusquellec, 1984) confirment les précédentes observations.

La concentration des bactéries par les moules conduit à des dénombrements moyens toujours supérieurs dans les bivalves, les facteurs de concentration obtenus varient cependant selon les stations. Ils sont très élevés pour des sites peu contaminés, et, par contre, les valeurs minimales (2,5 pour les Coliformes fécaux et 7,6 pour les Streptocoques fécaux) sont obtenus pour le site le plus pollué.

Dans tous les cas, une contamination plus importante est observée pour les Streptocoques fécaux.

Utilisation des moules pour la mise en évidence des Salmonelles

Cette étude comparée de la contamination des eaux et des moules a été complétée par la recherche des Salmonelles dans les deux types de prélèvements.

Les Salmonelles ont été rencontrées dans quatre stations situées à proximité immédiate des rejets (Plusquellec, 1984).

La valeur des moules comme matériel d'étude pour cette recherche est apparue avec évidence. Sur 55 échantillons analysés, la présence des Salmonelles a été rencontrée 15 fois : 12 fois dans les moules et 3 fois dans les eaux.

Les Salmonelles rencontrées sont variées, et appartiennent à des sérotypes communs. Les Salmonelles ne sont mises en évidence que pour des stations où le taux d'indicateurs est important.

DISCUSSION

L'objectif de cette étude était d'estimer la valeur des moules comme matériel d'analyse pour le contrôle bactériologique du milieu marin.

En premier lieu, les moules sont intéressantes du point de vue de la sensibilité de l'analyse. La concentration importante qu'elles réalisent en fait un matériel bien adapté à l'étude de sites faiblement pollués.

La concentration observée paraît liée à la charge bactérienne dans l'eau, elle diminue pour les sites très pollués. Cabelli - Hefferman, (1970) ont montré que l'augmentation de la charge en particules limitait l'activité filtrante des bivalves.

Cette concentration permet également la mise en évidence plus facile des bactéries présentes en petit nombre dans le milieu. Ceci est apparu nettement pour la recherche des Salmonelles, et rejoint d'autres conclusions similaires (Marjori *et al.* 1977).

Une différence très sensible est apparue dans la concentration des deux groupes d'indicateurs bactériens dans les bivalves. Delattre et Delesmont (1981) ont fait la même observation, et envisagent une explication liée à la taille des bactéries ou à l'analyse.

Cette différence dans les facteurs de concentration pourrait s'expliquer par une persistance plus importante des Streptocoques fécaux à l'intérieur des bivalves. Prieur (1981) a souligné l'adaptation de certaines bactéries aux conditions hostiles rencontrées dans le tractus digestif des moules. Or, les Streptocoques fécaux d'origine humaine se caractérisent par une bonne résistance en milieu hostile (Feachem, 1975).

Cette persistance prolongée peut expliquer également la différence que présentent les deux indicateurs au point de vue de la variabilité des dénombrements.

La contamination des Coliformes thermotolérants dans les moules suit celle de l'eau, mais il n'en est pas de même pour les Streptocoques D : leur persistance dans les moules peut permettre d'intégrer les variations rapides. Un dénombrement de Streptocoques D dans les moules peut donc être représentatif de la contamination de l'eau pendant une période de temps dont la durée reste toutefois à préciser.

Ce dénombrement pourrait être assimilé à une valeur moyenne, et non une valeur ponctuelle, ce qui justifierait également la variabilité plus faible observée dans les dénombrements espacés de 24 heures.

Même si la rétention des bactéries par les moules n'est pas comparable à celle des polluants chimiques mentionnée par Goldberg (1975), la concentration par ces bivalves peut être mise à profit pour mesurer la contamination des eaux littorales.

Le groupe des Streptocoques D se révèle bien adapté pour cette évaluation. Ceci rejoint les données épidémiologiques de Cabelli *et al.* (1982) qui montrent que la meilleure corrélation entre riques sanitaires liés à la baignade et dénombrement d'indicateurs dans l'eau est obtenue pour ce groupe.

Le dénombrement des Streptocoques D dans les bivalves constitue donc un test bien adapté à l'étude de la contamination bactérienne des eaux littorales, en raison de l'augmentation de sensibilité et diminution de variabilité qu'il procure.

BREITTMAYER J.P., GAUTHIER M.J., 1979. Dénombrement des bactéries en milieu marin. Facteurs de variation et d'incertitude. *Ann. Microb. Inst. Pasteur*, 130 : 245 - 256.

CABELLI V.J., HEFFERMAN W.P., 1970. Accumulation of *Escherichia coli* by the Northern quahaug. *Appl. Microb.*, 19 (2) : 239-244.

CABELLI V.J., DUFOUR A.P., MACCABE J., LEVIN M.A., 1982. Swimming associated gastro enteritis and water quality. *Ann. Jour. of Epidemiol.* 115-4 : 606-616.

DELATTRE J.M., DELESMONT R., 1981. L'analyse des coquillages peut-elle servir au contrôle microbiologique du littoral. *Rev. int. Oceanog. Med.*, 63-64 : 11-16.

FEACHEM, 1975. An improved role for faecal coliforms to faecal streptococci ratio in the differentiation between human and non human pollution sources. *Wat. Res.* 9 : 689-690.

GOLDBERG E.G., 1975. The mussel watch : a first step in global marine monitoring. *Mar. poll. bull.* 6 (7) : 111.

JORGENSEN C.B., 1960. Efficiency of particle retention and rate of water transport in undisturbed lamellibranchs. *J. Cons. Perm. Int. Expl. Mer.*, 29 : 96-116.

MAJORI L., CAMPELLO C., CREVATIN E., 1977. *Salmonella* pollution of the gulf of Trieste. *Rev. Int. Oceanog. Med.*, 47 : 181-191.

PINOT, 1979. Etude de l'assainissement des communes littorales de la baie de Concarneau - La Forêt. : 7-10.

PLUSQUELLEC A., 1984. Contribution à l'étude de la pollution bactérienne des eaux littorales. Thèse 3^e cycle. Université de Bretagne Occidentale.

PRIEUR D., 1981. Nouvelles données sur les relations entre bactéries et bivalves marins. *Haliotis*, 11 : 251-260.