

THESE DE DOCTORAT

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE
LILLE FLANDRES ARTOIS

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE

SPECIALITE: MICROBIOLOGIE

par

Anne-Marie POURCHER

**CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'ORIGINE
(HUMAINE OU ANIMALE) DE LA CONTAMINATION
FECALÉ DES EAUX DE SURFACE**

soutenue le 2 juillet 1991 devant la commission d'examen

MEMBRES DU JURY:

MM J. GUILLAUME	Président
H.C. DUBOURGUIER	Rapporteur
D. IZARD	Rapporteur
J.M. DELATTRE	Examineur
M. GRANDMOUGIN	Examineur
L. DEVRIESE	Examineur

DOCUMENT



n° 15756

1. INTRODUCTION.....	7
1.1. NOTION DE GERMES INDICATEURS DE POLLUTION FECALE.....	7
1.1.1. Comparaison des flores fécales humaines et animales.....	8
1.1.2. les germes tests de contamination fécale:	12
1.1.2.1. Description des indicateurs sélectionnés:	12
1.1.2.1.1. Les entérobactéries coliformes d'origine fécale.....	12
1.1.2.1.2. Streptocoques fécaux.....	15
1.1.2.1.3. <i>Clostridium perfringens</i>	18
1.1.2.2. Description des techniques et milieux utilisés en colimétrie et streptométrie	19
1.2. DIFFERENCIATION DE L'ORIGINE DE LA POLLUTION FECALE.....	21
1.2.1. Biochimie, sérologie et résistance aux antibiotiques de <i>E. coli</i>	21
1.2.2. Distribution et caractérisation des streptocoques fécaux	23
1.2.3. Rapport Coliformes fécaux/Streptocoques fécaux.....	26
1.2.3.1. Evolution du ratio dans le temps:.....	27
1.2.3.2. Indépendance du ratio avec l'origine des matières fécales.....	28
1.2.4. Bactériophages.....	30
1.2.5. Staphylocoques.....	31
1.2.6. <i>Rhodococcus</i>	31
1.2.7. Bifidobactéries.....	32
1.2.7.1. Survie des bifidobactéries	37
1.3. OBJECTIFS ET ORGANISATION DE L'ETUDE.....	40
2. MATERIEL ET METHODES	44
2.1. STREPTOCOQUES FECAUX ET <i>E. COLI</i>	44
2.1.1. Collecte et traitement des échantillons.....	44
2.1.2. Milieux de culture	45
2.1.3. Tests biochimiques.....	51
2.1.4. Sensibilité aux antibiotiques.....	55
2.2. BIFIDOBACTERIES	56
2.2.1. Collecte et traitement des échantillons.....	56
2.2.2. Solutions et Milieux de culture	57
2.2.3. Tests biochimiques.....	59
2.2.4. Analyse taxonomique	61
2.2.5. tests de température	62
2.2.6. Extraction de L'ADN et hybridation des bifidobactéries.....	63

3.RESULTATS ET DISCUSSION	64
3.1.STREPTOCOQUES FECAUX ET <i>E.COLI</i>	64
3.1.1. Comparaison du pouvoir inhibiteur du milieu MUD et des Milieux sélectifs	64
3.1.2. Dénombrement de <i>E.coli</i> et des streptocoques fécaux. Rapport <i>E.coli</i> /streptocoques fécaux	67
3.1.3. Distribution comparée des espèces de streptocoques fécaux dans les échantillons d'origine humaine et animale.....	70
3.1.4. Recherche de <i>S.bovis</i> sur le milieu MBA	73
3.1.5. Essai de différenciation des souches de <i>E.coli</i> et de streptocoques fécaux selon leur origine humaine ou animale.....	74
3.1.5.1.Tests enzymatiques.....	74
3.1.5.2.Etude de la résistance aux antibiotiques.....	78
3.1.6. Mise au point d'une galerie rapide d'identification des streptocoques fécaux.....	81
3.2.BIFIDOBACTERIES.....	87
3.2.1. Comparaison du pouvoir sélectif et du pouvoir inhibiteur des milieux de Beerens et BIM 25	87
3.2.2. Dénombrement des bifidobactéries et de <i>E.coli</i> dans les eaux de surface	97
3.2.3. Analyse taxonomique du genre <i>Bifidobacterium</i>	99
3.2.3.1.Groupes d'origine humaine:	103
3.2.3.2 Groupes contenant des souches d'origine animale ou d'eaux usées.....	108
3.2.4. Approche génomique concernant le groupe IIc	111
3.2.5. tests d'identification de l'origine (humaine et animale) des bifidobactéries.	112
3.2.5.1.Tests de température	113
3.2.5.2.Tests biochimiques.....	114
3.3. APPLICATION DES TESTS MIS AU POINT A DES ENVIRONNEMENTS HUMAINS OU ANIMAUX.	117
3.3.1. Streptocoques fécaux :.....	118
3.3.2. Bifidobactéries:.....	119
4.CONCLUSION	128
5.BIBLIOGRAPHIE.....	131

6. ANNEXES.....	148
Tests enzymatiques (Streptocoques fécaux et <i>E.coli</i>).....	149
Fichier des profils d'identification (Streptocoques fécaux).....	150
Consommation des additifs anti infectieux en France.....	153
Liste des tests enzymatiques et des tests de fermentation utilisés pour l'analyse numérique des bifidobactéries.	154
Diamètres d'inhibition obtenus pour les souches de <i>E.faecium</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>S.bovis</i> et <i>E.coli</i>	157
Profils obtenus sur galerie API 20strep pour les souches isolées du milieu Mud	161
Proportion et densité de bifidobactéries obtenues sur les milieux Columbia cystéiné, BIM 25 et Beerens selon l'origine du prélèvement.....	164
Analyse factorielle discriminante	169
Influence de la température d'incubation sur les souches de bifidobactéries.....	172
description des échantillons (Stations d'épuration et abattoirs).....	176

1. INTRODUCTION

Cette étude a été réalisée avec l'aide de l'Agence Financière de Bassin Nord Artois Picardie. S'il est actuellement possible de quantifier le flux de pollution apporté par les divers rejets côtiers grâce au dénombrement de germes indicateurs de contamination fécale, en revanche l'origine de la pollution du littoral reste très souvent indéterminée. Depuis quelques années le risque de contamination fécale d'origine animale s'ajoute à celui des concentrations humaines parce que se développent des élevages intensifs, notamment des élevages de porcins, bovins, poulets. Le but de ce travail est de développer une méthodologie permettant d'identifier l'origine d'une pollution fécale afin d'apprécier la part respective des contaminations humaines (plutôt urbaine) et animales (plutôt rurale) dans le milieu aquatique.

1.1. NOTION DE GERMES INDICATEURS DE POLLUTION FECALE.

L'eau a toujours été un milieu de transmission de maladies (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes, dysenteries, choléra, hépatites...) mais n'a été reconnue comme vecteur d'infections que depuis la fin du siècle dernier (Scarpino, 1971). Avec le développement de la microbiologie qui a permis notamment de mieux connaître la microflore intestinale, il a été possible d'établir une corrélation entre les principales maladies d'origine hydrique et la pollution fécale des eaux. Il devenait évident que la quantité de matières fécales excrétées par les humains et les animaux d'élevage apportait quotidiennement dans le milieu naturel un nombre énorme de bactéries directement ou par l'intermédiaire de réseaux d'assainissement. Le contrôle de la qualité du milieu aquatique s'est rapidement organisé (Barrow, 1977), comprenant non seulement la surveillance de l'eau potable des réseaux urbains mais aussi le suivi d'eaux de surface destinées à des activités de loisirs (littoral, lacs, piscines), d'effluents urbains ou industriels, ou d'eaux destinées à une activité

4. CONCLUSION

L'objectif de cette étude était de différencier l'origine d'une pollution (humaine ou animale) dans l'environnement aquatique.

Nous avons développé deux axes faisant appel d'une part aux germes indicateurs classiques (streptocoques fécaux et *E.coli*), d'autre part aux bifidobactéries.

Les dénombrements des *E. coli* et des streptocoques fécaux ont été réalisés à l'aide d'une nouvelle technique associant l'utilisation de microplaques à 96 puits et la mise en évidence d'une activité enzymatique par la libération d'un composé fluorescent (l'umbelliférone) visible sous U.V.

L'étude des densités de *E.coli* (sur milieu MUG) et de streptocoques fécaux (sur milieu MUD) dans les matières fécales animales et humaines a montré que le rapport *E.coli*/streptocoques fécaux, proposé par Geldreich pour différencier l'origine d'une pollution varie indépendamment de l'origine du prélèvement d'un individu à l'autre et donc n'est d'aucune utilité pour estimer l'origine d'une contamination.

En revanche, l'analyse de la distribution des streptocoques fécaux dans les fèces humaines et animales révèle une espèce discriminante, *S.bovis*, caractéristique d'une origine animale (en particulier bovine et dans une moindre mesure, porcine). Cette espèce nous paraissait d'autant plus intéressante qu'elle se différencie aisément des entérocoques fécaux par son incapacité à réduire le Chlorure de Triphényl Tétrazodim incorporé dans le milieu MUD.

Nous avons donc recherché ce germe en utilisant la technique des microplaques dans les eaux surface et dans des environnements humains (eaux usées brutes de stations d'épuration) ou animaux (rejets d'abattoirs). Cette recherche s'est malheureusement révélée infructueuse puisque nous n'avons plus ou très rarement identifié *S.bovis*, en raison de la fragilité de ce germe lorsqu'il se retrouve dans le milieu naturel.

Nous avons complété l'étude des streptocoques fécaux et de *E.coli* par la comparaison de profils enzymatiques et par la résistance aux principaux antibiotiques utilisés dans l'alimentation animale . Nos résultats indiquent que sur les enzymes et sur les antibiotiques étudiés, il n'est pas possible de différencier les souches humaines des souches animales.

Aussi notre travail s'est-il orienté vers le genre *Bifidobacterium* dont les espèces ont un habitat exclusivement humain ou animal.

La recherche des bifidobactéries a été réalisée sur le milieu de Beerens dont la sélectivité est très satisfaisante pour les prélèvements d'eaux de surface (80 à 100% des colonies repiquées à partir de ce milieu appartiennent au genre *Bifidobacterium*). Ces germes qui appartiennent à la flore dominante des matières fécales humaines (Moriamez et Leclerc, 1986; Mitsuoka, 1984) ont été retrouvés au cours de nos travaux dans les fèces des principaux animaux d'élevage mais plus ou moins fréquemment selon l'animal considéré (ils sont particulièrement abondants dans les fèces de porcs et de veaux).

D'autre part, l'analyse de 27 eaux de surface fait apparaître une très bonne corrélation entre les densités de bifidobactéries et l'indicateur type de contamination fécale, *E.coli*.

Ces données nous ont conduit à développer l'étude des bifidobactéries comme indicateur de l'origine de la pollution fécale du milieu naturel.

L'analyse taxonomique du genre *Bifidobacterium* réalisée sur 156 souches (dont 41 de collection) et 114 caractères biochimiques révèle une remarquable distinction entre les bactéries d'origine humaine et les bactéries d'origine animale: le dendrogramme obtenu est en effet composé de 7 groupes dont 4 sont constitués par des souches d'origine humaine (fèces, vagin, intestin, bouche, eaux usées urbaines) et 3 par des souches d'origine animale. Nous avons donc caractérisé à l'aide des tests les plus discriminants les groupes humains et animaux.

Ainsi, nous proposons un ensemble de 5 caractères comprenant la croissance à 45°C et 4 tests de fermentation de carbohydrates (sorbitol, D-xylose, mélézitose et raffinose). La réponse des souches permet de déduire leur origine (tableau 37).

Tableau 37: Origine des bifidobactéries déduite des 5 tests.

croissance à 45°C	sorbitol	mélézitose	D-xylose	Raffinose	ORIGINE
+	-				animale
+	+				humaine
-	+				humaine
-	-	+	+		humaine
-	-	-	+		humaine
-	-	-	-	+	animale
-	-	-	-	-	humaine

L'application de cet ensemble de tests à des environnements typiquement humains ou animaux a montré une très bonne corrélation entre l'origine déduite des souches d'après nos caractères sélectionnés et l'origine réelle de ces bactéries (eaux usées brutes de stations d'épuration ou rejets d'abattoirs).

Nous avons donc à notre disposition une méthode simple réalisable en une semaine permettant de définir l'origine d'une contamination fécale du milieu aquatique. Celle-ci comporte plusieurs étapes:

- ensemencement de l'eau à analyser sur le milieu sélectif de BEERENS;
- incubation 3 jours à 39°C en anaérobiose;
- dénombrement et repiquage des colonies en milieu nutritif liquide (TPY);
- incubation 24 heures à 39°C en anaérobiose;
- recherche de la Fructose-6-Phosphate-Phosphocétolase (enzyme clé du genre *Bifidobacterium*);
- et ensemencement des bactéries pour l'étude des 5 caractères ;
- incubation 48 heures à 39°C ou 45°C (pour le test "température") en anaérobiose;
- lecture des 5 tests .

Cette méthode qui n'a pas la prétention d'identifier l'espèce animale responsable de la contamination d'une eau de surface permet d'estimer la part respective des contaminations fécales d'origine humaine et animale.