

50376  
1991  
104

65908

50376  
1991  
104

# THESE DE DOCTORAT

présentée à

N° d'ordre 749

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

Ce travail a été réalisé au laboratoire du Service des Eaux et Environnement de l'Institut Pasteur de Lille sous la direction du Docteur J.M. DELATTRE, Directeur du Service des Eaux et Environnement de l'Institut Pasteur de Lille. Ses conseils judicieux, ses encouragements et les moyens qu'il a mis à ma disposition ont permis la réalisation de cette étude. Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude et le remercie vivement d'accepter de juger ce travail.

Mes vifs remerciements à Madame C. OGER, Chef du laboratoire de Microbiologie du Service des Eaux et Environnement pour la bienveillance qu'elle a manifesté en m'accueillant dans son laboratoire et la confiance qu'elle m'a toujours accordée depuis.

Je remercie Monsieur le Professeur J. GUILLAUME, Directeur de l'Institut Agricole et Alimentaire de Lille d'avoir assuré la direction scientifique de ce travail et lui assure mon profond respect.

Je remercie également Monsieur H.C. DUBOURGUIER, Directeur de Recherches à L'Institut National de la Recherche Agronomique qui a accepté d'être Rapporteur de cette thèse.

Mes vifs remerciements au Docteur D. IZARD, Maître de conférences à la Faculté de Médecine de Lille, Praticien des Hôpitaux qui m'a accueillie dans son laboratoire . En acceptant de juger cette thèse, il manifeste une fois encore son intérêt pour mon travail.

Je remercie Monsieur M. GRANDMOUGIN Sous-Directeur du Service Lutte contre la Pollution de l'Agence de Bassin Nord Artois Nord Picardie qui m'a confié cette étude et qui m'a fait l'honneur de juger ce travail.

Toute ma reconnaissance au Docteur F. GAVINI, Chargée de Recherche à L'INSERM qui m'a accueillie dans son groupe de taxonomie et qui m'a enseigné au cours de ce travail la rigueur scientifique et m'a permis de découvrir le monde passionnant de la taxonomie.

Je remercie également Monsieur L. DEVRIESE de la Faculté Vétérinaire de Gand pour l'intérêt qu'il a manifesté pour mes recherches et l'aide qu'il m'a apportée toujours avec gentillesse.

Je remercie Monsieur le Professeur J. FRENEY de la faculté de Pharmacie de Lyon de m'avoir intégrée dans son équipe et le Docteur A. CARLOTTI qui, malgré ses nombreuses occupations, a gentiment accepté de m'initier aux techniques d'hybridation .

Tous mes remerciements à Messieurs J.F. HERNANDEZ et E. OUDART, ingénieurs hydrobiologistes, pour leur aide scientifique et leur constante amitié.

Je remercie également Monsieur le Professeur H. BEERENS et le Docteur C. NEU pour leurs conseils et leur aide précieuse.

Merci à toute l'équipe du Service des Eaux de l'Institut Pasteur et au personnel de l'unité INSERM 146 pour le soutien qu'ils m'ont toujours apporté au cours de ces 3 années.

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

agricole (irrigation, alimentation du bétail). Comme les agents pathogènes tels que *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio* ou virus ne pouvaient être mis en évidence par des techniques simples, les recherches se sont orientées vers les germes intestinaux, présents en grand nombre dans les matières fécales. Ces bactéries appelées plus tard germes indicateurs de contamination fécale devaient répondre à plusieurs critères (Scarpino, 1971):

- être corrélées à la présence de germes pathogènes entériques;
- avoir une survie dans le milieu naturel égale ou supérieure à celle des germes pathogènes;
- présenter une résistance vis à vis des agents de désinfection identique à celle des germes pathogènes;
- ne pas se multiplier dans l'eau;
- avoir une densité dans le milieu aqueux proportionnelle au degré de pollution;
- pouvoir être dénombrées facilement sans entraîner de problèmes de faux positifs;
- pouvoir être retrouvées dans tous les types d'eaux (eau du robinet, nappes phréatiques, rivières, eaux de baignades, eaux usées).

Les travaux effectués sur la flore intestinale ont permis de sélectionner des germes répondant aux critères demandés.

### **1.1.1. Comparaison des flores fécales humaines et animales.**

Grâce à l'amélioration des méthodes de cultures en anaérobiose et au nombre croissant de milieux sélectifs, les profils bactériologiques des flores intestinales et fécales des humains sont actuellement connus dans leurs plus grandes lignes.

La partie terminale du tube digestif (iléon, colon) de l'homme renferme une flore microbienne dense et diversifiée, composée principalement de bactéries anaérobies appartenant aux genres *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium*, *Fusobacterium*, *Plectridium*, *Clostridium* (de l'ordre de  $10^9$  bactéries par gramme de contenu) et en moindre proportion des germes aéro-anaérobies dont les entérobactéries, entérocoques, lactobacilles, staphylocoques

(moins de  $10^8$  germes par gramme de contenu). Les bactéries isolées de la flore fécale de la plupart des animaux homéothermes appartiennent aux mêmes genres que celles décrites chez les humains. Néanmoins les proportions de ces genres varient d'une espèce animale à l'autre.

Chez les humains comme chez les animaux, la composition de la flore microbienne évolue avec l'âge et le mode d'alimentation (Mitsuoka, 1984; Benno *et al.*, 1989; Mutai et Tanaka, 1987; Leclerc et Moriamez, 1980; Croucher *et al.*, 1983, Moore *et al.*, 1987). Ainsi différents travaux effectués sur les flores intestinales humaines ont mis en évidence les résultats suivants:

- La flore anaérobie stricte évolue quantitativement et qualitativement avec l'âge (tableau 1): chez l'adulte, elle est constituée essentiellement par les *Bacteroides*, chez le nourrisson par les bifidobactéries. Les spores de *Clostridium* se retrouvent moins fréquemment chez le nourrisson que chez l'adulte (Leclerc et Moriamez, 1980).

Les bifidobactéries dominent la microflore des enfants nourris au sein mais sont nettement moins abondantes chez les enfants non allaités (Mitsuoka 1984; Biavati *et al.*, 1984).

Les densités de bifidobactéries et de *Bacteroides* sont corrélées au régime alimentaire. Le nombre de bifidobactéries étant d'autant plus important que le régime est riche en fibres (Ekataksin *et al.*, 1987) alors que le nombre de *Bacteroides* augmente lorsque le régime est carné (Drasar *et al.*, 1986).

-les flores aérobies facultatives laissent aussi apparaître des divergences:

la flore Gram -, plus variée, est quantitativement plus importante chez le nourrisson que chez l'adulte. Les entérocoques et les staphylocoques sont plus nombreux chez le premier alors que les *Bacillus* rares chez le nourrisson sont constamment isolés chez l'adulte (Leclerc et Moriamez, 1980).

Smith et Crabb (1961), Smith (1965) constatent chez de nombreux mammifères un développement similaire de la microflore intestinale pendant les premières semaines de vie qu'ils attribuent à l'alimentation lactée. Les types de flores s'individualisent en revanche lorsque les animaux atteignent le stade d'adultes.

Tableau 1: Flore fécale d'adultes et de nourrissons humains.

Groupes bactériens	Indice de présence % sur 33 adultes	densités moyennes*	Indice de présence % sur 14 nourrissons	densités moyennes*
<i>Bacteroides</i>	100	9,57± 1,08	64	8,18± 1,80
<i>Bifidobacterium</i>	100	9,08± 0,85	100	9,04± 0,74
<i>Clostridium</i>	79	4,08± 2,07	64	3,07± 1,86
Bactéries lactiques	100	8,27± 0,90	100	9,01
<i>Escherichia coli</i>	100	7,71± 0,94	100	8,88± 0,80
<i>Citrobacter</i>	70	3,35± 1,92	35	2,90± 2,74
<i>Klebsiella</i>	48,5	2,40± 1,65	93	7,13± 2,14
<i>Enterobacter</i>	9	nt	43	3,58± 3,22
<i>Proteus</i>	35	2,54± 2,07	86	6,32± 2,76
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9	nt	57	2,46± 1,36
<i>Aeromonas</i>	0	-	21	
Entérocoques	100	7,17± 1,40	100	7,94± 1,48
Staphylocoques	51	2,83± 2,13	100	4,83± 1,39
<i>Bacillus</i>	94	3,68± 1,00	7	
Levures	64	2,58± 1,47	21	1,83
Moisissures	54	2,58± 1,61	0	

\*exprimées en log de germes/ g de fèces.

nt= non traités statistiquement

d'après les résultats de Leclerc et Moriamez (1980)

Tableau 2: Flore fécale de différents animaux.

Groupes bactériens	5 Poules	5 Porcs	5 Lapins	5 Chevaux
<i>Bacteroidaceae</i>	10,6±0,2*	9,3±0,8	9,6±0,2	7,2±1,6
<i>Eubacteriallactobacillus</i> anaérobies	10,2±0,3	8,1±1,3	5,6±1,0	7,7±0,3
<i>Peptococcaceae</i>	9,9±0,1	8,9±0,3	8,3±1,0	6,8±2,4
<i>Bifidobacteria</i>	9,1±0,9	7,6±0,5	7,8	2,3
<i>Streptococcus</i>	7,1±0,4	7,9±1,0	3,6±0,6	8,5±0,8
<i>Enterobacteriaceae</i>	7,0±0,4	7,3±0,1	3,5±1,3	5,5±1,0
<i>Lactobacillus</i>	9,5±0,5	8,3±0,4	0	7,7±0,5
<i>Veillonellae</i>	0	6,0	0	4,6±0,4
<i>Clostridium perfringens</i>	0	7,9±1,0	2,3	7,5±0,4
Bacilles anaérobies incurvés	0	8,9±0,7	8,6±0,3	8,3±0,4
<i>Spirochaetes</i>	0	4,9±0,8	0	7,6±0,5
<i>Staphylococcus</i>	6,8±0,7	6,6±1,1	3,4	3,8±0,6
Corynébactéries	8,6	6,5±0,5	4,6±0,4	3,9±0,4
<i>Bacillus</i>	6,4±1,2	6,4±0,9	0	6,1±1,0
Levures	4,2±1,1	2,9±0,1	4,3	2,8±0,2

\* densités exprimées en log (nombre de germes/gramme de fèces)

d'après les données de Mitsuoka (1984)

La flore intestinale des espèces ayant une importance économique, notamment chez les animaux d'élevages, les porcs, les poulets ou les lapins, a fait l'objet de nombreux travaux.

-microflore des porcs.

Pour Moore *et al.*(1987), Salanitro *et al.*(1977), Robinson *et al.* (1984), les streptocoques sont prédominants dans les matières fécales (29 à 47% de la microflore totale selon les auteurs) suivis des *Eubacterium* (6 à 36%) et des *Bacteroides* (8 à 22%) alors que pour Mitsuoka (1984), les streptocoques sont nettement moins abondants que les *Bacteroides* (tableau 2).

-microflore des poulets.

La microflore fécale des poulets se caractérise par des densités de germes nettement plus élevées que pour les autres animaux (tableau 2). Elle est principalement composée de *Bacteroides*, *Peptococcaceae* et lactobacilles. En revanche la flore du caecum des poulets est composée principalement de *Propionibacterium*, *Eubacterium*, de *Bacteroides* et de *Clostridium* (Salanitro *et al.*, 1974).

-microflore des lapins.

La flore fécale des lapins se distingue de toutes celles les animaux homéothermes par le faible nombre , voire l'absence de bactéries aéro-anaérobies telles les entérocoques, les entérobactéries, les lactobacilles, l'essentiel de la flore étant constitué de bactéries anaérobies strictes dont les *Bacteroides* (Smith et Crabb, 1961; Smith, 1965; Ducluzeau,1966) ainsi que *Clostridium*, *Peptostreptococcus* et *Fusobacterium* (Crociani *et al.*, 1984).

-Le tractus intestinal des ruminants, contrairement au rumen a fait l'objet de peu d'études.

Pour Smith (1965), les streptocoques, les entérobactéries et les lactobacilles sont peu abondants et les *Bacteroides* très rares.

## 1.1.2. Les germes tests de contamination fécale:

### 1.1.2.1. Description des indicateurs sélectionnés:

Parmi les germes décrits dans les fèces humaines et animales, 3 groupes bactériens ont été rapidement sélectionnés comme indicateurs de contamination fécale en raison de leur omniprésence dans la microflore intestinale et de leur facilité de dénombrement:

- les entérobactéries coliformes d'origine fécale;
- les streptocoques fécaux;
- Clostridium perfringens* (remplacé par la suite par les spores d'anaérobies sulfito-réducteurs).

#### 1.1.2.1.1. Les entérobactéries coliformes d'origine fécale

Le terme d'entérobactéries coliformes a été proposé par Breed et Norton en 1937 pour désigner les bactéries fermentant le lactose, recherchées comme indicateurs de pollution fécale. La définition de ce groupe de germes selon les normes ISO (International Organization for Standardization) comprend des bactéries Gram négatives, non sporulées, oxydase négatives, anaérobies ou aérobies facultatives, capables de se développer en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface ayant les mêmes propriétés, capables de fermenter le lactose avec production de gaz et d'acide en 48 heures à une température de  $35-37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ). Jusque dans les années 1970, les espèces appartenant à ce groupe et identifiées à l'aide des tests IMViC (indole, rouge de méthyl, Voges Proskauer, citrate) comprenaient principalement *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter diversus* et *Citrobacter amalonaticus*. Avec les nombreux travaux de Gavini *et al.*, d'Izard *et al.*, de Brenner *et al.* ou de Grimont *et al.*, le nombre d'espèces a considérablement augmenté, modifiant la composition des entérobactéries coliformes. Les principales espèces  $\beta$  galactosidase+ (fermentant ou non le lactose) sont reportées dans le tableau 3.

Tableau 3: Liste des principales espèces  $\beta$  galactosidase+ appartenant au groupe des entérobactéries coliformes.

Espèces		Origine
<i>Escherichia coli</i>		intestinale
<i>E. hermanii</i>	Brenner <i>et al.</i> (1982)	clinique
<i>E. vulneris</i>	Brenner <i>et al.</i> (1982)	clinique
<i>E. blattae</i>	Grimont (1983)	blatte
<i>E. fergusonii</i>	Farmer <i>et al.</i> (1985)	intestinale, clinique
<i>Citrobacter freundii</i>		intestinale, environnement
<i>C. malonaticus</i>	Young <i>et al.</i> (1971)	intestinale, environnement
<i>C. amalonaticus</i>	Young <i>et al.</i> (1971)	intestinale, environnement
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		intestinale, environnement
<i>K. oxytoca</i>		intestinale, environnement
<i>K. mobilis</i>	Izard <i>et al.</i> (1980)	intestinale, environnement
<i>K. terrigena</i>	Izard <i>et al.</i> (1981)	environnement
<i>K. trevisanii</i>	Ferragut <i>et al.</i> (1983)	environnement
<i>K. planticola</i>	Bagley <i>et al.</i> (1981)	environnement
<i>Enterobacter cloacae</i>		intestinale, environnement
<i>E. amigenus</i>	Izard <i>et al.</i> (1981)	environnement
<i>E. intermedium</i>	Izard <i>et al.</i> (1980)	environnement
<i>E. gergoviae</i>	Brenner <i>et al.</i> (1980)	clinique et environnement
<i>E. sakazakii</i>	Farmer <i>et al.</i> (1980)	clinique
<i>E. taylorae</i>	Farmer <i>et al.</i> (1985)	intestinale, clinique
<i>E. absuriae</i>	Brenner <i>et al.</i> (1986)	clinique
<i>E. dissolvens</i>	Brenner <i>et al.</i> (1986)	clinique
<i>E. nimipressularis</i>	Brenner <i>et al.</i> (1986)	végétaux
<i>E. cancerogenus</i>	Dickey et Zummo (1988)	clinique
<i>Serratia marcescens</i>	Grimont <i>et al.</i> (1978)	clinique et environnement
<i>S. liquefaciens</i>	Grimont <i>et al.</i> (1978)	environnement
<i>S. marinorubra</i>	Grimont <i>et al.</i> (1978)	environnement
<i>S. plymuthica</i>	Grimont <i>et al.</i> (1978)	environnement
<i>S. odorifera</i>	Grimont <i>et al.</i> (1978)	clinique
<i>S. fonticola</i>	Gavini <i>et al.</i> (1979)	environnement
<i>S. ficaria</i>	Grimont <i>et al.</i> (1979)	environnement

Tableau 3 (suite).

Espèce		origine
<i>Serratia. grimesii</i>	Grimont <i>et al.</i> (1982)	clinique
<i>S. proteamaculans</i>		clinique, environnement
<i>Pantaea agglomerans</i>	Gavini <i>et al.</i> (1989)	environnement
<i>P. dispersa</i>	Gavini <i>et al.</i> (1989)	environnement
<i>Hafnia alvei</i>		environnement
<i>Rahnella aquatilis</i>	Izard <i>et al.</i> (1981)	environnement
<i>Buttiauxella agrestis</i>	Ferragut <i>et al.</i> (1981)	environnement
<i>Kluyvera ascorbata</i>	Farmer <i>et al.</i> (1981)	clinique
<i>K. cryocrescens</i>	Farmer <i>et al.</i> (1981)	environnement
<i>Budvicia aquatica</i>	Bouvet <i>et al.</i> (1985)	environnement
<i>Cedecea davisae</i>	Grimont <i>et al.</i> (1981)	clinique
<i>C. lapagei</i>	Farmer <i>et al.</i> (1982)	clinique
<i>C. neteri</i>	Farmer <i>et al.</i> (1982)	clinique
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Tamura <i>et al.</i> (1986)	environnement
<i>Tamumella pryseos</i>	Hollis <i>et al.</i> (1981)	clinique
<i>Erwingella americana</i>	Grimont <i>et al.</i> (1983)	clinique
<i>Xenorhabdus nematophilus</i> <i>subsp. nematophilus</i>	Thomas et Poinar (1979)	nématode

L'analyse des écosystèmes telluriques et aquatiques a révélé la présence d'espèces répondant à la définition des entérobactéries coliformes sans pour autant avoir une origine fécale, aussi, l'intérêt sanitaire de ce groupe de germes dans les eaux a-t-il été remis en question par Oger *et al.* (1981), Lavoie (1983). En effet parmi ces bactéries, seules les espèces ayant une origine exclusivement intestinale peuvent être considérées comme indicatrices de pollution fécale. Le groupe des

entérobactéries coliformes a donc été réduit aux coliformes dits "fécaux" qui se différencient des entérobactéries coliformes de l'environnement par un test de température puisque les germes d'origine supposée fécale, mésophiles se multiplient à des températures plus élevées que ceux d'origine tellurique ou aquatique, psychrotrophes (Oger *et al.*, 1981). Actuellement, la norme AFNOR (Association Française de Normalisation) applicable à l'eau de consommation préconise la recherche des germes se développant à une température de 44°C (dits "coliformes thermotolérants"). Néanmoins, le choix de cette température est controversé (Leclerc *et al.*, 1983) car elle élimine beaucoup de souches d'origine fécale (Oger et Leclerc, 1977). De plus, certaines souches de *K.pneumoniae* provenant de déchets d'usines de papeteries seraient capables de se développer à cette température (Ducan et Razzel, 1977, Vlassof, 1977). D'après Leclerc *et al.* (1983) une température de 41°C semblerait plus adéquate puisqu'elle permet la culture de toutes les souches fécales.

Finalement, devant ces difficultés à définir les indicateurs parmi les entérobactéries coliformes, certains auteurs (Dufour, 1977, Wright, 1982), de plus en plus nombreux ont proposé de restreindre la recherche d'indicateurs à *E.coli* dont l'origine fécale est indiscutable et qui représentent plus de 97% et 90% des coliformes isolés respectivement des fèces humaines et animales (Geldreich, 1978). Cette espèce est communément caractérisée par la production de gaz et d'indole à partir du tryptophane à 44°C (Dufour, 1977; Leclerc *et al.* 1977; Barrow, 1977) bien qu'il existe certaines souches de *E.coli* (environ 10%) qui ne répondent pas à cette définition (Buesckens et Stiles, 1984).

#### 1.1.2.1.2. Streptocoques fécaux

La présence des streptocoques d'origine intestinale dans le milieu aquatique a été corrélée dès le début du siècle à une contamination fécale.

La définition de ces germes est restée confuse, les termes streptocoques fécaux, entérocoques, streptocoques du groupe D étant couramment confondus bien que qu'ils ne regroupent pas les mêmes espèces. Baudoin et Litsky (1981) proposent une définition des 3 termes:

- streptocoques fécaux:

Ils comprennent toutes les espèces de streptocoques isolées dans les matières fécales, c'est à dire, *S. faecium*, *S. faecalis subsp. faecalis*, *S. faecalis subsp. liquefaciens*, *S. faecalis subsp. zymogenes*, *S. durans*, *S. avium*, *S. bovis*, *S. equinus*. Certains auteurs incluent *S. salivarius* et *S. mitis* (ces 2 dernières espèces ayant une origine orale).

- entérocoques:

Ils ont été définis en 1898 par Thiercelin pour désigner les streptocoques d'origine intestinale connus alors. Le terme "entérocoques", repris par Shermann en 1937 inclut les streptocoques répondant à certains critères de croissance:

- à 10 °C
- à 45°C
- à pH 9,6
- en présence de 0,1% de bleu de méthylène,
- de 6,5% en NaCl (m/v) ou,
- après chauffage à 60°C pendant 30 minutes.

Les entérocoques se réduisent alors à *S. faecium*, les 3 sous espèces de *S. faecalis* et *S. durans*.

- streptocoques du groupe D:

Ce terme, défini avec le développement du système de classification sérologique de Lancefield, comprend les streptocoques possédant uniquement l'antigène D: *S. faecium*, les 3 sous espèces de *S. faecalis*, *S. durans*, *S. bovis*, *S. equinus*. *S. avium* qui possède en plus de l'antigène D, l'antigène Q n'est pas classé dans ce groupe.

Bien que Mundt (1963) ait démontré la présence d'entérocoques dans les végétaux (principalement *S. faecium* et *S. faecalis*) ceux-ci présentent de nombreux avantages (Kenner, 1978):

- densités importantes dans les fèces humaines et animales;
- présence dans les eaux contaminées;
- absence dans les eaux pures;

- temps de survie dans le milieu naturel supérieur à celui des coliformes.

Avec le développement dans les années 1980 des techniques d'hybridation ADN-ADN, le genre *Streptococcus* a éclaté en 3 genres *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*. En effet, Farrow *et al.* (1983), Schleifer et Kilpper-Bälz (1984) ont démontré que les entérocoques *sensu* Shermann représentaient un genre à part entière.

le genre *Enterococcus* comprend actuellement 14 espèces dont 7 seulement ont une origine fécale. Les premières espèces décrites en 1984 par Schleifer et Kilpper-Bälz sont *E. faecium* et *E. faecalis*, cette dernière regroupant en raison de leur taux élevé d'homologie, les 3 sous espèces de *E. faecalis* (*faecalis*, *liquefaciens*, *zymogenes*) décrites antérieurement. La même année, *S. avium*, *S. casseliflavus* (décrite comme une sous espèce de *S. faecium*), *S. durans*, *S. faecalis subsp. malodoratus* et *S. gallinarum* sont reclassées dans le genre *Enterococcus* (Collins, 1984). A ces 7 espèces, dont 2 ne sont pas d'origine fécale (*E. casseliflavus* et *E. malodoratus* ont été respectivement isolés de plantes et de fromage) ont été ajoutées de nouvelles espèces (Ruoff, 1990):

- *E. hirae*, très proche sur le plan phénotypique de *E. durans* et *E. faecium*, présent dans les fèces de porcs et de poulets (Farrow *et al.*, 1985).

- *E. mundtii*, isolé de matières fécales de vaches mais aussi de sols et de plantes (Collins *et al.*, 1986).

- *E. cecorum* (William *et al.*, 1989), d'abord décrit comme *S. cecorum* (Devriese *et al.*, 1983) présent dans le cœcum de poulets.

- *E. raffinosus*, *E. solitarius*, espèces isolées d'infections humaines et *E. pseudoavium* isolé de mammite chez la vache (Collins *et al.*, 1989).

La dernière espèce décrite, *E. columbae*, a été isolée d'intestin de pigeons (Devriese *et al.*, 1990).

Parallèlement, de nouvelles espèces de *Streptococcus* ont récemment été définies. A *S. bovis* et *S. equinus* qui vont fusionner en une seule espèce, leur taux d'homologie étant très élevé (Farrow *et al.*, 1984), se sont ajoutées 3 espèces isolées de la microflore intestinale de porcs:

*S. suis* (Kilpper-Bälz, 1987), *S. hyointestinalis* (Devriese *et al.*, 1988) et *S. intestinalis* (Robinson *et al.*, 1989).

*S. suis* a suscité un intérêt particulier en raison de son pouvoir pathogène (il est responsable d'arthrites, septicémies, méningites et pneumonies) chez les porcs (Hommez *et al.*, 1986) mais aussi chez les humains (Ho *et al.*, 1990).

En résumé, parmi les espèces appartenant aux genres *Enterococcus* et *Streptococcus* 12 ont été isolées dans des matières fécales humaines ou animales: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. cecorum*, *E. columbae*, *S. bovis* - *S. equinus*, *S. suis*, *S. intestinalis*, et *S. hyointestinalis*.

Actuellement, la streptométrie ne tient pas compte des modifications taxonomiques du genre *Streptococcus* et reprend sous le terme "streptocoques fécaux" les entérocoques *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* et parfois *S. bovis* - *S. equinus*.

#### 1.1.2.1.3. *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens*, bacille sulfite-réducteur, gram positif, anaérobie stricte, a été proposé comme indicateur de pollution fécale dès le début du siècle mais son identification laborieuse a été rapidement remplacée par le dénombrement plus aisé des spores des sulfite-réducteurs, formes de résistance se développant en anaérobiose sur gélose Viande-foie en donnant des colonies typiques, noires, réduisant le sulfite de sodium. Toutefois, celles-ci présentent l'inconvénient de ne pas avoir une origine exclusivement fécale. Grâce à la survie de leurs spores dans le milieu naturel, les *Clostridium* apparaissent comme des indicateurs de choix pour mesurer une pollution intermittente ou passée, ou accompagnée de rejets toxiques industriels qui inhibent rapidement les autres germes indicateurs (Cabelli, 1978). Cependant, les *Clostridium* étant moins nombreux que les *E. coli* et streptocoques fécaux dans les matières fécales ou dans les eaux usées, leur recherche a été peu à peu abandonnée notamment dans les eaux de surface au profit de la colimétrie et de la streptométrie.

### 1.1.2.2. Description des techniques et milieux utilisés en colimétrie et streptométrie

Deux techniques sont principalement utilisées pour le dénombrement des entérobactéries coliformes d'origine fécale et des streptocoques fécaux:

- en milieux liquides:

chaque dilution de l'eau à analyser, estensemencée sur 3 ou 5 tubes du milieu de culture. Le développement des bactéries en tubes multiples comporte une étape présomptive et des tests confirmatifs. Des tables statistiques ou des programmes informatiques permettent d'évaluer un Nombre le Plus Probable (NPP) de bactéries présentes dans 100 ml d'eau.

- sur milieux gélosés:

l'eau à analyser est filtrée sur une membrane (de porosité 0,45 µm) déposée ensuite sur le milieu. Le dénombrement est effectué en comptant les colonies caractéristiques, chaque colonie étant supposée provenir d'un seul germe.

Les principaux agents sélectifs utilisés pour le dénombrement des coliformes fécaux sont:

- les sels biliaries (EC medium, mFC medium);
- des mouillants de synthèse tels le teepol (Teepol broth) ou le tergitol (milieu de Chapman).

Deux agents sélectifs principaux apparaissent dans les milieux pour streptocoques fécaux:

- l'acétate de thallium (gélose TITG [Thallous Tetrazolium Glucose] de Barnes, gélose BEA [Bile Esculine Agar], sélective des entérocoques);
- l'azoture de sodium (bouillon de Rothe, bouillon de Litsky qui contient un autre agent sélectif, l'éthyl violet, gélose "m Enterococcus " de Slanetz et Bartley, bouillon ou gélose KF de Kenner, Clark et Kabler).

Depuis quelques années il est possible d'améliorer la sélectivité des milieux en incorporant des composés fluorescents mettant en évidence certaines réactions enzymatiques. Ces composés constitués d'un substrat et d'une molécule fluorescente, l'umbelliférone, n'émettent une fluorescence visible sous U.V. (à 366 nm) que lorsque l'enzyme clive la liaison substrat - umbelliférone libérant cette dernière dans le milieu.

Ainsi, il est possible de distinguer *E.coli* des autres coliformes grâce à l'activité de la  $\beta$ -D-glucuronidase (Kilian et Bulow, 1976; Godsey *et al.*, 1981; Feng et Hartman, 1982). De même, Littel et Hartman (1983) ont développé un milieu permettant de différencier parmi les streptocoques fécaux *E.faecium* et *S.bovis* grâce à l'incorporation de 4-methylumbelliféron- $\alpha$ -D-galactosidase.

Actuellement les milieux sélectifs les plus utilisés en France sont reportés dans le tableau 4:

Tableau 4 : Techniques et milieux utilisés pour la recherche des indicateurs fécaux.

Méthode	caractéristiques	coliformes fécaux	streptocoques fécaux
NPP  milieux liquides	milieu présomptif	<b>Bouillon Lactosé au Bromo Cresol Pourpre (BLBCP)</b>	<b>milieu de Rothe</b>
	conditions d'incubation	30°C, 48 heures	37°C, 48 heures
	agent sélectif		azoture de sodium (0,2 g/l)
	lecture	production d'acide par la fermentation du lactose (milieu jauni) et de gaz	trouble du bouillon
FILTRATION sur membrane	milieu	<b>gélose Chapman au TTC (au Chlorure de Triphényl Tétrazolium )</b>	<b>gélose Slanetz et Bartley</b>
	conditions d'incubation	37°C, 48 heures	37°C, 48 heures
	agent sélectif	Tergitol	azoture de sodium (0,4 g/l)
	lecture	fermentation du lactose (auréole jaune d'acidification) sans réduction du TTC repiquage des colonies caractéristiques sur milieu de Schubert	réduction du TTC en formazan repiquage des colonies caractéristiques sur milieu de Litsky

## 1.2. DIFFERENCIATION DE L'ORIGINE DE LA POLLUTION FECALE

Si la présence des streptocoques fécaux et des entérobactéries coliformes d'origine fécale dans le milieu aquatique est corrélée à une contamination, elle ne permet pas en revanche d'en identifier l'origine (humaine, animale). Pour préciser la nature de cette pollution, il est nécessaire de faire appel à des tests supplémentaires qui pourraient être réalisés sur les indicateurs eux même (profils biochimiques, sérotypes ou bien résistance aux antibiotiques *E.coli* selon l'origine des souches, distribution des streptocoques fécaux dans les matières fécales, rapport *E.coli*/streptocoques fécaux) ou à d'autres organismes susceptibles de différencier une contamination humaine d'une contamination animale (bactériophages, staphylocoques, *Rhodococcus*, bifidobactéries).

### 1.2.1. Biochimie, sérologie et résistance aux antibiotiques de *E. coli*

Bien que la densité de *E. coli* puisse être reliée à la présence d'animaux d'élevage en pâture et peut être décuplée lorsque le pâturage est intensif (Tiedemann *et al.* 1987), elle n'est cependant d'aucune utilité pour différencier une contamination humaine d'une contamination animale.

Parce que cette espèce est retrouvée en grande quantité dans toutes les fèces (exceptés chez les lapins), des auteurs se sont intéressés au profils biochimiques, sérologiques ou d'antibiorésistance dans le but de caractériser les souches selon leur origine.

#### Profils biochimiques.

Ochman *et al.* (1983) ont étudié l'activité de 10 enzymes (malate déshydrogénase, 6-phosphogluconate déshydrogénase, adénylate kinase, peptidase, glutamique oxaloacétique transaminase, isocitrate déshydrogénase, phosphoglucotransaminase, aconitase, mannose phosphate isomérase, glucose 6 phosphate déshydrogénase) sur des souches de *E.coli* dont 32 étaient d'origine animale et 40 d'origine humaine. Les profils enzymatiques varient d'un individu à l'autre indépendamment de l'origine, l'auteur n'a pu établir de corrélation entre les profils et la

provenance des bactéries. Cependant, il semblait envisageable, en utilisant d'autres activités enzymatiques de différencier les souches humaines des souches animales.

### Sérotypes.

L'intérêt porté aux sérotypes d' *E.coli* s'est accru en médecine humaine et vétérinaire en raison de leur rôle dans le processus pathologique et leur utilité dans les études épidémiologiques. (Orsko *et al.*, 1977). Bettelheim, (1978) a établi une liste des sérotypes de *E.coli* rencontrés chez les humains et les animaux . Plusieurs sérotypes d'origine animale semblent porter des antigènes flagellaires qui ne sont pas associés aux souches d'origine humaine: les sérotypes O2H8, O2H21, O4H8, O7H19 n'ont été décrits que parmi les souches isolées de matières fécales du bétail et n'apparaissent jamais parmi les souches d'origine humaine. En revanche, certains sérotypes n'ont été rencontrés que chez les nourrissons atteints de diarrhées (O26, O55, O111, O127, O128). Hinton et Allen (1982) ont identifiés 96 sérotypes O de *E.coli* parmi 2973 souches provenant de fèces de différents animaux de fermes (veaux, vaches, porcs, poulets), les sérotypes O8 et O9 étant les plus largement répandus dans les différents groupes animaux. Comme l'identification des sérotypes O demande des techniques lourdes, peu d'auteurs semblent avoir développé la voie sérologique pour différencier l'origine de la contamination. Seuls, Venkateswaran et Natarajan (1987) ont retrouvé des sérotypes typiquement humains cités par Bettelheim dans des eaux contaminées par des rejets d'origine humaine.

### Résistance des souches aux antibiotiques.

L'addition d'agents antimicrobiens dans l'alimentation animale visant à améliorer la production des élevages intensifs et à prévenir les maladies a entraîné une augmentation du nombre de souches présentant une multirésistance aux antibiotiques comme le montrent les travaux de Mercer *et al.* (1971) sur des souches isolées de différents animaux de fermes.

Langlois *et al.* (1983) ont comparé l'évolution du nombre de souches de *E.coli* résistantes à la tétracycline sur une période de 126 mois. Les souches de *E.coli* étaient régulièrement isolées de fèces de porcs élevés dans une ferme expérimentale et nourris depuis 1972 sans additifs

antimicrobiens. Dix mois après la suppression d'antibiotiques le taux de souches résistantes à la tétracycline étaient encore de 72% (alors qu'il était de 82% lorsque l'alimentation été complétée par des antibiotiques).

L'analyse de la résistance des souches aux principaux agents anti infectieux utilisés dans l'alimentation animale pourrait donc indiquer la présence d'une contamination dûe à des animaux d'élevage en raison de la forte proportion d'espèces résistantes aux antibiotiques.

Cependant, les résultats doivent être interprétés avec précaution car le développement des souches résistantes dépend de facteurs qui ne sont pas toujours maîtrisés: Langlois *et al.* ont observé que la proportion de *E.coli* résistantes était plus faible pour les animaux élevés en pâture que pour ceux ne sortant jamais de la porcherie. La répartition des souches résistantes parmi les animaux a montré que les porcs allaités présentaient une proportion de souches résistantes supérieure à celle des adultes (Langlois *et al.*, 1988).

Krumperman (1983) a comparé la résistance de souches de *E.coli* provenant d'animaux, d'humains et d'eaux usées urbaines vis à vis de 12 antibiotiques. Les résultats obtenus montrent que plus de 50% des souches isolées des eaux usées ou des animaux de fermes sont résistantes à au moins 3 antibiotiques alors que les souches d'animaux non traités étaient sensibles à tous les antibiotiques étudiés.

### **1.2.2. Distribution et caractérisation des streptocoques fécaux**

Dès le début du siècle, Andrewes et Horder ont proposé de différencier les contaminations des eaux de surface par l'identification des espèces de streptocoques fécaux. Ainsi, *S.faecalis*, que les auteurs distinguaient par la fermentation du mannitol, était constamment isolé de fèces humaines alors que *S. equinus*, caractérisé par l'absence de fermentation du lactose ne se retrouvait que dans les fèces d'animaux herbivores, en particulier de chevaux. Depuis, la répartition des streptocoques a fait l'objet de nombreuses études (tableau 5).

Tableau 5: Composition de la flore streptococcale d'animaux et d'humains  
selon différentes études.

Distribution des Streptocoques fécaux.						
ORIGINE et références	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. avium</i>	<i>S. bovis</i> / <i>S. equinus</i>	streptocoques non identifiés
<b>Humains</b>						
- 1	21	23,4	8	+	14,5	33,1
- 2	60	29	9	+	0	2
- 3	9,3	88	0,3	+	1,4	
- 4	46	31	9	+	0	14
- 5	26	17	11	+	0	46
- 7	+	26,2	+	+	0	
<b>Bovins</b>						
- 1	5,2	6,8	20,6	+	31	36,4
- 2	15	0	0	+	73	12
- 4	2,3	0,4	0	26	70	
- 5	10	5	0	+	69	16
- 6	6	6	0	+	64	24
- 7	+	4,1	+	+	66,2	
<b>Porcins</b>						
- 1	4,7	2,3	4,7	+	35,7	52,3
- 2	25	10	7	0	23	35
- 5	36	6	4	+	35	19
- 6	25	13	23	+	23	16
<b>Volailles</b>						
- 4	2	25	0	71	0	
- 5	30	10	0	+	10	50
- 6	30	0	0	+	0	70

- 1 : Kjellander(1960) : milieu de Rothe;
- 2 : Oragui et Mara(1980): KF medium;
- 3: Kuhn et al.(1988) : Todd Hewitt Agar + 6% NaCl;
- 4 : Rutkowski et Sjogren (1986) : M2 medium ;
- 5 : Wheeler et al. (1979) : Slanetz et Bartley medium ;
- 6 : Wheeler et al.(1979) : KF medium ;
- 7 : Geldreich et Kenner(1969) : KF medium ;
- + : espèces non reconnues par l'auteur

Bien que la distribution des espèces fluctue selon les auteurs en raison notamment de la sélectivité des différents milieux utilisés, les résultats montrent que dans l'ensemble la présence des espèces *E. faecium* et *E. durans* ne caractérise aucune origine, *E. faecalis* présent dans les matières fécales humaines est absent ou rare dans les fèces animales, *S. bovis* est caractéristique des matières fécales animales. Toutefois, *E. faecalis* a été isolé dans les matières fécales d'animaux sauvages (Mundt, 1963) et d'élevage tels les bovins, porcins, ovins (Devriese *et al.*, 1987).

*S. bovis* reste la seule espèce typique d'une origine animale même si certaines souches ont été rencontrées dans des cas cliniques. Ainsi, Besnier *et al.* (1990) et Falkman (1971) ont noté la présence de cette espèce dans des endocardites et récemment, deux cas de méningites dues à *S. bovis* ont été décrits par Purdy *et al.* (1990). L'intérêt de cette espèce comme indicateur de pollution animale se limite à nos régions puisque Mara et Oragui (1985) rapportent que si *S. bovis* est rarement isolé dans les matières fécales humaines dans les pays tempérés, il est en revanche excrété par une certaine proportion de la population humaine au Nigéria comme au Zimbabwe.

La caractérisation des souches de *E. faecalis* ou de *S. bovis* à l'aide de tests biochimiques a toutefois suscité un grand intérêt.

Ramadan et Sabir (1963) proposaient de classer les souches isolées de matières fécales à l'aide de 3 tests: réduction du vert Janus, résistance à l'action de la température (63°C pendant 30 minutes) et résistance à l'action combinée de la température et du tellurite. Les auteurs concluaient que les souches capables de survivre au test "tellurite" avaient une origine humaine, les souches incapables de réduire le vert Janus en 16 heures avaient une origine animale, les souches ayant un profil intermédiaire étaient d'origine indéterminée. Leurs travaux ont été repris par Tilton et Litsky (1967), qui ont particulièrement étudié la réduction du Chlorure de Triphényl Tétrazodium (TTC) en formazan et la résistance au tellurite. Les résultats obtenus par ces auteurs indiquent que la majorité des streptocoques fécaux ayant une origine humaine réduisait le TTC et résistait au tellurite contrairement aux souches d'origine animale (notamment *S. bovis*) qui ne réduisaient pas ou très faiblement le TTC et étaient sensibles à la présence de 0,04% de tellurite dans le milieu ce que confirment les résultats de Saleh (1980). En revanche, Falkman (1971) a isolé de matières fécales humaines des souches de *S. bovis* qui réduisaient le TTC.

Gross *et al.* (1975) différencient les souches d'origine humaine des souches d'origine animale par l'incapacité de ces dernières (*S. avium*, *S. bovis*) à hydrolyser l'arginine.

Abshire et Guthrie (1971) ont proposé une détection rapide de *S. faecalis* grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques.

La recherche de l'origine d'une contamination ne s'est pas orientée uniquement vers des tests biochimiques mais aussi vers la mise au point de milieux sélectifs permettant d'identifier les espèces les plus discriminantes (*S. faecalis* ou *S. bovis*).

Ainsi les travaux de Kjellander (1960) sur l'identification de streptocoques isolés de fèces humaines et animales ont montré qu'aucun test biochimique pris séparément ne permettait d'indiquer l'origine des souches. Seule, la fermentation du sorbitol paraissait être le caractère le plus discriminant puisque le nombre de souches fermentant ce carbohydrate était 5 fois plus important dans les prélèvements humains que dans les prélèvements animaux. Partant de ces données, Kjellander a développé un milieu (Sodium Azide Sorbitol Agar), spécifique selon lui de souches d'origine humaine. Cependant, d'une part, *E. faecalis* n'est pas systématiquement isolé des matières fécales humaines (Wheater *et al.*, 1979; Oragui et Mara, 1980), d'autre part, il existe des souches de *S. bovis* qui fermentent ce carbohydrate (Wheater *et al.*, 1979).

L'identification directe de *S. bovis* présente plus de difficultés en raison de l'extrême sensibilité de cette souche vis à vis des agents sélectifs (azoture de sodium, acétate de thallium). Medreck *et al.* (1960) ont observé que les colonies de *S. bovis* se distinguaient sur le milieu "Thallous Acetate Agar" des autres streptocoques fécaux par leur petite taille.

Oragui et Mara (1981) ont proposé un milieu sélectif permettant la croissance de *S. bovis*, cette espèce utilisant les sels d'ammonium comme unique source d'azote et ayant des besoins en vitamines différents des autres streptocoques fécaux (Deibel, 1964).

### 1.2.3. Rapport Coliformes fécaux/Streptocoques fécaux

La caractéristique des 2 groupes d'indicateurs étant leur présence dans les matières fécales des humains et des animaux homéothermes, leur dénombrement ne permet pas *a priori* de définir

l'origine d'une contamination. Néanmoins, dès les années 1960, Geldreich proposait l'utilisation du rapport Coliformes fécaux/Streptocoques fécaux (CF/SF) pour déterminer l'origine d'une pollution dans les eaux de surface. En effet, d'après ses résultats, les fèces humaines contiennent nettement moins de coliformes fécaux que de streptocoques fécaux (rapports  $CF/SF \geq 4$ ) alors que le phénomène inverse est observé dans les fèces animales (rapports  $CF/SF \leq 0,7$ ). Les rapports ayant une valeur comprise entre 0,7 et 4 ont une origine indéterminée.

L'utilisation de ce rapport qui présentait l'avantage de ne pas avoir à rechercher d'autres germes pour différencier l'origine d'une contamination a très vite été controversée.

#### 1.2.3.1. Evolution du ratio dans le temps:

Kjellander (1960) remarque que les streptocoques fécaux survivent plus longtemps que les coliformes. Cette observation a été confirmée depuis par de nombreux travaux. Une étude de Geldreich et Kenner (1969) sur la survie des indicateurs fécaux dans des eaux de ruissellements à des températures de 10 et 20°C effectuée en laboratoire montre que le temps de survie de *S. bovis* est nettement plus court que celui des coliformes fécaux, eux mêmes survivant moins longtemps que *S. faecalis*, quelle que soit la température de l'eau. La persistance des coliformes fécaux et de *S. faecalis* serait plus longue à 20°C qu'à 10°C alors que le phénomène inverse est noté pour *S. bovis*.

Mc Feters *et al.* (1974) ont suivi la survie de souches provenant d'eaux usées urbaines ou de matières fécales animales dans des chambres à membranes immergées dans de l'eau douce: Un taux de survie de 50% est obtenu respectivement en 18 et 22 heures pour les coliformes fécaux et les streptocoques fécaux, ce qui se traduit par une diminution du rapport CF/SF qui chute de 4,2 à 2,2 en 4 jours. En revanche, le nombre de streptocoques isolés des chambres à membraneensemencées avec des matières fécales de bovins diminue significativement plus vite que le nombre de coliformes fécaux, le rapport CF/SF de 0,25 lors de l'immersion de la chambre atteignant une valeur de 2 en 4 jours. Mc Feters explique l'évolution du rapport par la distribution des espèces dans les rejets humains et animaux: Le dénombrement de souches pures de streptocoques fécaux et de coliformes fécauxensemencées dans les chambres a montré que

*S. bovis* et *S. equinus* abondants dans les fèces de bovins, présentaient un taux de mortalité significativement supérieur à celui des coliformes fécaux et des autres streptocoques fécaux. Les travaux de Feachem (1975) confirment que les valeurs du rapport évoluent dans le temps et propose un système d'identification qui toutefois nécessite de connaître l'âge du rejet:

rapport initial CF/SF	évolution dans du rapport dans le temps	source fécale suspectée.
> 4	augmentation	incertaine
>4	diminution	humaine
<0,7	augmentation	animale
<0,7	diminution	incertaine

Wheater *et al.* (1979) observent que dans les matières fécales de bovins et de moutons, *S.bovis* représente 58 à 75% des streptocoques fécaux isolés. Après 72 heures d'immersion dans de l'eau usée urbaine préalablement chauffée 30 minutes à 80°C, ce pourcentage n'est plus que de 10 à 30%. Il atteint 0 à 8% en 96 heures.

Les résultats obtenus en eau de mer (Petitbonne *et al.*, 1978; Cambridge *et al.*, 1981; Barcina *et al.*, 1990) sont en accord avec les données observées en eau douce. Cambridge *et al.* rapportent que le taux de mortalité des germes indicateurs de pollution fécale dépend de l'irradiation solaire, l'action de la lumière entraînant un état de dormance (Barcina *et al.*, 1990). Toutes les études indiquent que *E. coli* est nettement plus sensible aux radiations que *S. faecalis*. Le rapport *E. coli*/*S. faecalis* diminue rapidement dans les eaux exposées à la lumière alors qu'il n'évolue pas ou très peu à l'obscurité. La validité du rapport est donc d'autant plus contestable que la contamination est ancienne.

#### 1.2.3.2. Indépendance du ratio avec l'origine des matières fécales

Les dénombrements des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux sur des matières fécales humaines et animales obtenus par Oragui et Opara (Oragui, 1978) montrent que indépendamment du milieu de culture, les rapports CF/SF varient pour une même espèce animale, d'un individu à l'autre. (tableau 6). De plus, de nombreux travaux montrent que non seulement la sélectivité des

milieux utilisés mais aussi la technique (filtration sur membrane ou ensemencement sur milieux liquides) influe sur les dénombrements des germes indicateurs (Bissonette *et al.*, 1977; Baudoin et Litsky, 1981; Kenner, 1978;).

Tableau 6: Valeurs du rapport Coliformes fécaux/ Streptocoques fécaux dans les matières fécales selon différentes études.

ORIGINE et références	nombre d'échantillons	rapport CF/SF
bovins		
1*	6	0,3 à 671
2	9	0,01 à 18,8
porcins		
1	4	0,6 à 235
2	10	0,3 à 134
3	11	0,04 en moyenne
poulets		
1	5	0,2 à 28
2	5	0,1 à 6
3	10	0,4 en moyenne
humains		
1	15	4,9 à 15200
2	12	3 à 6901
3	43	4,3 en moyenne
4	33	0,02 à 1333

\* 1: Opara , 1978 : Enriched Teepool broth et Slanetz et Bartley

2: Oragui, 1978: Enriched Teepool broth et milieu KF

3: Geldreich, 1969: E.C medium et milieu KF

4: d'après les données de Moriamez (1977): milieu MFC et milieu BEA

La signification du rapport change chaque fois que les rendements sont affectés soit par le choix des milieux soit par un quelconque facteur de l'environnement favorisant la croissance d'un indicateur sur l'autre.

Malgré la remise en cause du rapport, Venkateswaran et Natarajan (1987), Schoebitz et Montes (1985), Martins *et al.* (1984), Khalaf et Muhammad (1989) utilisent encore le rapport CF/SF pour identifier l'origine de pollutions dans des eaux douces.

Le concept de germes indicateurs présente des failles: le risque de multiplication de *E.coli* dans les eaux tropicales, la faible densité des streptocoques fécaux ou l'extrême persistance des *Clostridium* ont été mis en cause par certains auteurs. Seule l'identification des streptocoques fécaux est

susceptible d'indiquer l'origine d'une contamination fécale mais la présence dans une eau contaminée de *S.bovis* dont la survie est très faible ou de *S. faecalis*, parfois isolé dans certaines matières fécales d'animaux doit être interprétée avec précaution. Aussi les recherches se sont orientées vers d'autres indicateurs potentiels tels les bactériophages, les staphylocoques, *Rhodococcus*, ou les bifidobactéries.

#### 1.2.4. Bactériophages

Les bactériophages, virus parasites des bactéries, isolés de matières fécales et d'eaux usées ont été considérés comme indicateurs potentiels de pollution fécale dans l'environnement en raison de leur densité élevée dans les eaux usées et de leur résistance vis à vis du milieu aquatique identique à celle des entérovirus.

Les travaux de Saleh (1977) ont montré que certains phages étaient actifs sur *S.faecalis* alors qu'ils n'avaient aucune activité sur *S.faecium*, *S. durans* et *S.bovis*. Néanmoins, lors d'une étude sur la teneur en germes indicateurs du Rhône, Barbé (1973) remarque qu'il n'a pas été possible d'identifier les streptocoques isolés des eaux par la lysotypie bien que dans le domaine médical, les souches de streptocoques fécaux isolés au cours d'infection soient identifiables par l'appréciation de leur sensibilité aux bactériophages.

Il existe des phages spécifiques de *S.bovis* (Iverson, 1976) mais la faible densité de cette espèce dans les eaux et l'instabilité de ces virus ont remis en cause leur recherche à l'extérieur du tractus intestinal (Oragui, 1978).

Les bactériophages du type "F specific RNA" (F RNA phages) qui constituaient un groupe homogène et résistant au stress de l'environnement pouvaient présenter un intérêt comme indicateurs de contamination fécale (Furuse *et al.*, 1978; Havelaar *et al.*, 1986; Havelaar *et al.*, 1990). Havelaar *et al.* (1986) ont observé que ces phages rarement isolés dans les matières fécales d'humains, de chiens et de chats et de vaches abondaient dans les fèces d'animaux d'élevages (porcs, veaux, poulets), cette distribution pouvant être due soit au jeune âge des animaux en batterie, soit à l'addition régulière d'antibiotiques dans leur nourriture. Malheureusement, les dénombrements obtenus pour différents types d'eau ne permettent pas de corrélérer la présence de

ces phages à une pollution d'origine animale car malgré leur absence dans les matières fécales humaines, ils ont été retrouvés en grande quantité dans les eaux usées urbaines. Bien que le mécanisme ne soit pas encore connu, Havelaar *et al.* supposent que ces phages se multiplient dans l'environnement aquatique, leur présence indiquant plus une pollution urbaine qu'une pollution fécale.

### 1.2.5. Staphylocoques

La présence de ces cocci Gram+, catalase positifs, isolés principalement de la peau d'animaux et d'humains a été notée dans l'intestin. Comme ces germes sont retrouvés dans les eaux de loisirs fréquentées par des baigneurs, ils ont été proposés comme indicateurs potentiels de la qualité des eaux (Evans, 1977). Certaines espèces ont une gamme étendue d'hôtes mais la plupart sont associées à un seul habitat. Il existe des espèces typiquement humaines telles *S.epidermitis*, *S.hominis*, *S. haemolyticus* et *S.capitis* (Kloos *et al.*, 1976), tandis que d'autres sont exclusivement animales telles *S.scirius*, *S.lentus*, *S.hyicus subps.hyicus*, *S.hyicus subps.chromogenes*. Il est possible de distinguer l'origine des souches par leur sensibilité à la novobiocine (Devriese *et al.*, 1985): de nombreuses espèces résistantes à cet antibiotique, rarement retrouvées chez les humains, sont abondantes chez les animaux (exceptés les chiens et les chats). Malgré la possibilité de différencier les souches selon leur origine, les staphylocoques ne paraissent pas posséder les qualités requises pour identifier une contamination fécale du milieu aquatique en raison de leur faible densité dans le tube digestif (ils sont nettement moins nombreux que les coliformes et streptocoques fécaux) et de leur présence inconstante.

### 1.2.6. *Rhodococcus*

Les *Rhodococci*, actinomycètes aérobies, ont été proposés comme indicateurs de pollution animale par Rowbotham *et al* (1977) parce qu'ils sont fréquemment isolés dans les matières fécales d'animaux.

Mara et Oragui (1981) ont développé un milieu sélectif (Modified M3 Agar) permettant l'isolement d'une espèce abondante dans les fèces d'animaux de fermes (porcs, vaches, poulets) et absent des

fèces d'humains: *Rhodococcus coprophilum*. Pour pallier le manque d'information concernant la survie de ces germes dans les eaux de surface, ces auteurs (1983) ont comparé le taux de mortalité de *Rhodococcus coprophilum* à celui des indicateurs classiques dans des eaux usées préalablement stérilisées. *Rhodococcus coprophilum* présente des caractéristiques de survie proche de *Clostridium perfringens* puisqu'il peut survivre au moins 120 jours dans les eaux polluées. Malgré ses qualités (espèce exclusivement animale, abondante dans les fèces, pouvant survivre longtemps dans le milieu aquatique), *Rhodococcus coprophilum* présente l'inconvénient majeur d'avoir une culture de 3 semaines.

### 1.2.7. Bifidobactéries.

Depuis une trentaine d'années un genre bactérien (*Bifidobacterium*) dont les espèces actuellement décrites ont un habitat exclusivement humain ou animal a été proposé comme indicateur de pollution. Levin (1977) considère le genre *Bifidobacterium* comme un excellent indicateur. Les bifidobactéries ne se multiplient pas dans l'eau, leur seul habitat est l'intestin (à l'exception d'une espèce retrouvée aussi dans la bouche ou le vagin), leurs caractéristiques de survie dans le milieu naturel sont très proches de *E.coli* et surtout, l'identification des espèces permet de déterminer l'origine d'une contamination.

Bien qu'elles soient plus abondantes dans l'intestin que les streptocoques et coliformes fécaux les bifidobactéries pourtant décrites dès le début du siècle n'ont été proposées pour le contrôle de qualité des eaux qu'en 1960. Les principales raisons de ce manque d'intérêt est lié à leur caractère anaérobie strict et à l'absence de milieux sélectifs.

Depuis la description de *Bacillus bifidus* en 1900 par Tissier, le genre *Bifidobacterium* a été étudié avec un intérêt croissant en raison de son rôle important au sein de la flore intestinale en particulier des nouveaux nés (Leclerc et Moriamez, 1980; Biavati *et al.*, 1984; Mitsuoka, 1984).

Le genre *Bifidobacterium* regroupe des bactéries ayant les caractéristiques suivantes (Scardovi, 1986):

bacilles anaérobies stricts, ne formant pas de spores, Gram positifs, se présentant sous forme de bâtonnets incurvés irréguliers aux extrémités effilées, bifurquées ou spatulées. Certaines espèces se présentent sous forme de petits bacilles réguliers ou de coccoïdes. Les bifidobactéries sont catalase négatives, indole négatives, ne réduisent pas les nitrates, fermentent le glucose sans production de gaz.

Les genres *Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* se rapprochent du genre *Bifidobacterium* par leur morphologie mais peuvent être différenciés par quelques tests biochimiques (tableau 7). De plus, les bifidobactéries ne dégradent pas le glucose par la voie classique de la glycolyse mais utilisent la voie de l'hexose phosphocétolase, l'enzyme clé de cette dégradation étant la Fructose-6-Phosphate-Phosphocétolase (encore appelée F6PPK). Elle catalyse la réaction suivante:

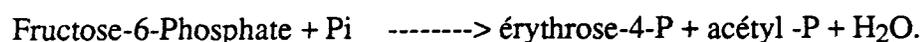


Tableau 7: Principaux tests permettant de différencier le genre *Bifidobacterium* des genres voisins

tests	<i>Bifidobacterium</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Propionibacterium</i>	<i>Eubacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>
Produits majeurs de fermentation	acide acétique acide lactique	acide succinique	acide propionique	acide butyrique acide formique	acide acétique
Tolérance à l'oxygène	-	+	V	-	V
Production de gaz à partir du glucose	-	-	-	V	V
indole	-	V	(+)	-	-
Catalase	-	-	V	-	-
Réduction des nitrates	-	(+)	(+)	V	-
Liquéfaction de la gélatine	-	(-)	(+)	V	-

Légendes : + : positif; - : négatif, (+) : souvent positif, (-) : souvent négatif, V: variable d'après Mitsuoka et Kaneuchi, 1977

Actuellement, le genre *Bifidobacterium* comprend 26 espèces: 10 d'origine humaine, 14 d'origine animale et 2 d'origine inconnue (tableau 8).

Tableau 8: Ecologie des bifidobactéries.

ESPECE	ORIGINE
<i>B.adolescentis</i>	intestins et fèces d'adultes humains , eaux usées
<i>B.catenulatum</i>	fèces d'adultes humains, vagin , eaux usées
<i>B.pseudocatenulatum</i>	fèces de nourrissons, d'enfants, d'adultes, eaux usées. Quelques souches ont été isolées de fèces de veaux allaités
<i>B.dentium</i>	fèces d'adultes humains, abcès, caries dentaires
<i>B.angulatum</i>	1 souche de fèces d'adulte humain, quelques souches isolées d'eaux usées
<i>B.breve</i>	fèces de nourrissons, vagin
<i>B.longum</i>	fèces de nourrissons, d'adultes humains, vagins Quelques souches ont été isolées de fèces de veaux allaités
<i>B.infantis</i>	fèces de nourrissons , vagin
<i>B.bifidum</i>	fèces d'adultes humains, nourrissons, veaux allaités, vagin
<i>B.gallicum</i>	1 souche, isolée de fèces d'adulte humain
<i>B.animalis</i>	fèces d'animaux divers: rats, poules, lapins, porcs, eaux usées
<i>B.globosum, B.pseudolongum</i>	fèces de chiens, singes, moutons, lapins, rats, agneaux, porcs, eaux usées
<i>B.choerinum</i>	fèces de porcs, eaux usées
<i>B.thermophilum</i>	fèces de porcs, veaux, rumen de bovin, eaux usées
<i>B.boum</i>	fèces de porcs, rumen de bovins
<i>B.merycicum, B.ruminantium</i>	rumen de bovins
<i>B.suis</i>	fèces de porcs
<i>B.cuniculi, B.magnum</i>	fèces de lapins
<i>B.pullorum, B. gallinarum</i>	fèces de poulets
<i>B.asteroides, B.coryneforme, B.indicum</i>	tube digestif d'abeilles
<i>B.subtile, B.minimum</i>	respectivement 5 et 2 souches isolées d'eaux usées

### Espèces d'origine humaine

Ce premier groupe a été initialement décrit par Reuter (1963) sur la base de caractères sérologiques et sur des profils de fermentation de carbohydrates. Il comprenait *B.infantis*, *B.liberorum*, *B.lactensis*, *B.longum* var. *a*, *b*, *B.breve*, *B.parvulorum* var. *a*, *b*, *B.adolescentis* var. *a*, *b*, *c*, *d* et *B.bifidum* var. *a*, *b*. Avec le développement des techniques d'hybridation ADN-ADN, L'espèce *B.adolescentis* (*sensu lato*) s'est scindé en 5 espèces *B.adolescentis* (*sensu stricto*) *B.dentium* (qui inclut des souches d'abord décrites comme *Actinomyces eriksonii*, Georg *et al.*, 1965; Mitsuoka *et al.*, 1974), *B.catenulatum*, *B.angulatum* (Scardovi *et al.*, 1971; Scardovi et Crociani, 1974) et *B.pseudocatenulatum* (Scardovi *et al.*, 1979) très proche sur le plan phénotypique et génomique de *B.catenulatum* (Lauer et Kandler, 1983) tandis que *B.infantis* incluait les 2 espèces *B.liberorum* et *B.lactensis* et que *B.breve* incluait l'espèce *B.parvulorum* (Scardovi *et al.*, 1971). La dernière espèce humaine décrite, *B.gallicum* (Lauer, 1990) n'est actuellement représentée que par une seule souche.

### Espèces d'origine animale

Ce groupe a été isolé de matières fécales d'oiseaux ou de mammifères. Il comprend actuellement *B. animalis* (Scardovi et Trovatelli, 1974) décrit en 1969 par Mitsuoka comme une sous-espèce de *B.longum* et isolé de matières fécales de divers animaux homéothermes, *B. thermophilum* (qui inclut l'espèce *B.ruminale* isolée par Scardovi *et al.* (1969), *B.pseudolongum* (Mitsuoka, 1969) et *B.globosum* (Scardovi *et al.*, 1969), *B.pseudolongum* (Mitsuoka, 1969) et *B.globosum* (Scardovi *et al.*, 1969) présentes dans des fèces de porcs ou dans le rumen de bovins, *B.suis*, présent dans les fèces de porcs (Matteuzzi *et al.*, 1971), *B.boum* et *B.choerinum* d'abord isolées de fèces de porcelets par Zani *et al.* (1974), puis retrouvées dans le rumen de bovins (Scardovi *et al.*, 1979). Deux espèces ont été isolées de matières fécales de lapins: *B.cuniculi* (Scardovi *et al.*, 1979) et *B.magnum* (Scardovi et Zani, 1974). *B.pullorum* (Trovatelli *et al.*, 1974) et *B.gallinarum* (Watabe *et al.*, 1983) ont été retrouvées dans les fèces de poulets. Les dernières espèces animales décrites sont *B.ruminantium* et *B.merycicum* présentes dans le rumen de bovins (Biavati et Mattarelli, 1991). A ces espèces présentes dans l'intestin d'animaux homéothermes, s'ajoutent 3 espèces dont l'intérêt écologique est moindre: *B.asteroïdes*, *B.indicum* et *B.coryneforme* (Scardovi et Trovatelli, 1969) qui ont pour habitat le tube digestif d'abeilles.

## Relations entre les groupes ADN homologues et les groupes phénotypiques

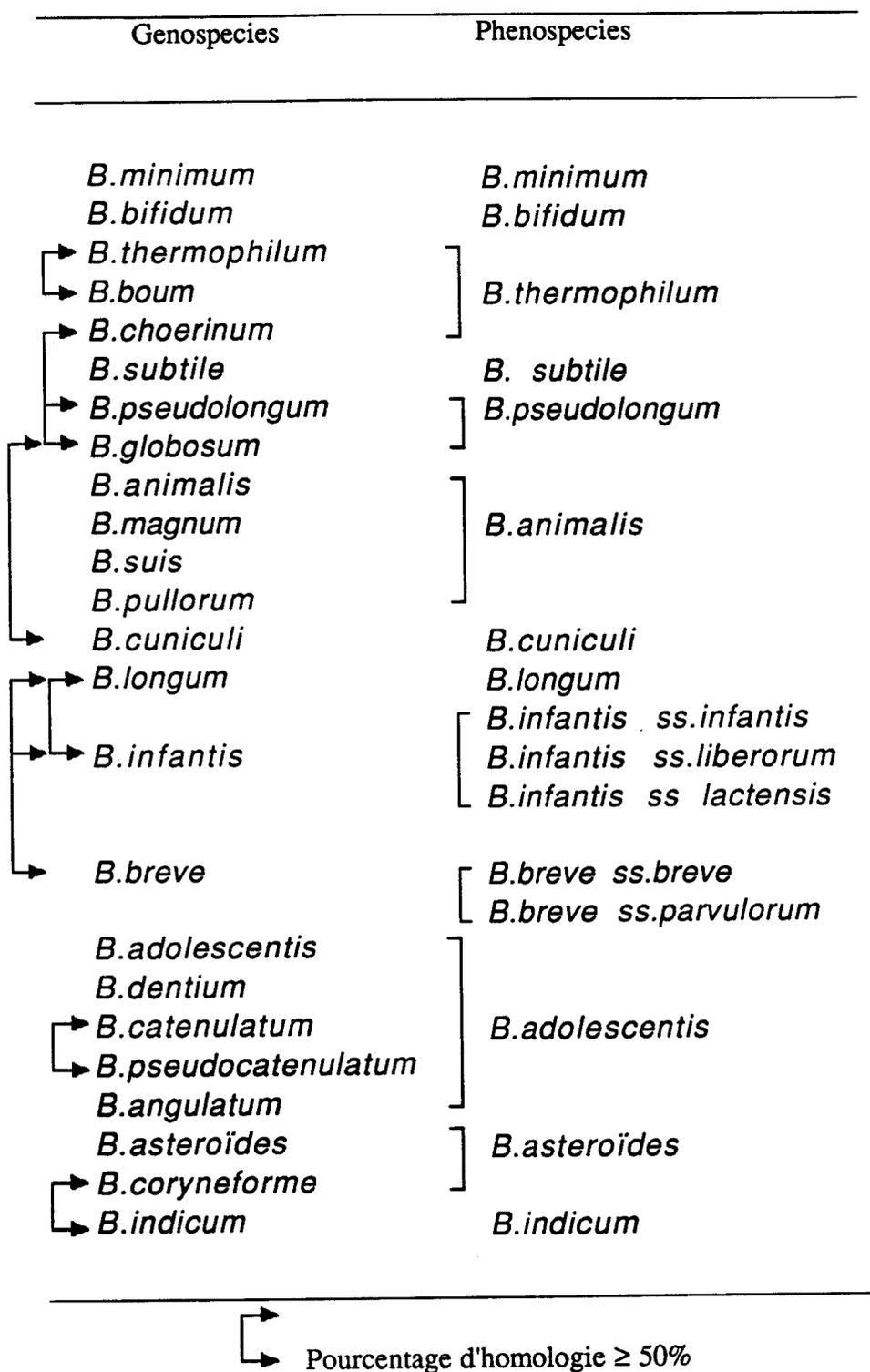


Schéma 1: D'après les données de Mitsuoka (1984)

### Espèces d'origine inconnue

Quelques souches, respectivement 2 et 5, ont permis la description des espèces *B.minimum* et *B.subtile* isolées d'eaux usées urbaines (Scardovi et Trovatelli, 1974).

Actuellement ni les tests de fermentation de carbohydrates ni l'électrophorèse des protéines solubles (Biavati *et al.*, 1982) ne permettent de différencier toutes les espèces définies sur le plan génomique comme le montre le schéma proposé par Mitsuoka. (schéma 1). Néanmoins certaines techniques permettent de séparer les souches d'origine humaine des souches d'origine animale telles la mobilité de la F6PPK sur gel d'amidon électrophorétique (Scardovi, 1971) ou certaines fermentations de carbohydrates (Mara et Oragui, 1984).

La taxonomie du genre *Bifidobacterium* reste encore confuse, les résultats d'hybridations ADN-ADN montrant que certaines espèces différentes sur le plan phénotypiques sont proches d'un point de vue génomique en raison de leurs taux d'homologie élevé. C'est le cas de *B.coryneforme* et *B.indicum.*, *B.globosum* et *B.pseudolongum*, *B.pseudocatenulatum* et *B.catenulatum*. et des 3 espèces *B.infantis*, *B.longum* et *B.suis*.

Malgré les problèmes taxonomiques qui ne sont pas à l'heure actuelle encore résolus, les bifidobactéries ont fait l'objet de travaux concernant d'une part leur survie dans le milieu naturel et d'autre part la mise au point de milieux sélectifs.

#### 1.2.7.1. Survie des bifidobactéries

Gylleberg *et al.* (1960) ont comparé la survie de bifidobactéries à celle des coliformes et streptocoques fécaux provenant de matières fécales de 25 adultes immergées dans de l'eau de lacs ou de puits. Les résultats obtenus par ces auteurs montraient qu'indépendamment du type d'eau et de l'origine du prélèvement, les bifidobactéries présentaient un même taux de survie que les coliformes fécaux.

Cependant aussi bien les études de survies de Resnick et Levin (1981) effectuées en laboratoire ou de Carillo *et al.* (1985) réalisées en chambre à membranes immergées dans le milieu naturel

indiquent que les bifidobactéries ont un taux de mortalité plus élevé que les coliformes fécaux. Resnick et Levin ont noté que les bifidobactéries (maintenues à 4, 12 ou 20°C dans de l'eau stérile) présentaient un taux de disparition de 80% en seulement 24 heures. Carillo *et al.* ont observé une reprise de croissance de *E.coli* alors que les densités de *B.adolescentis* déclinaient de plus de 50% en 48 heures dans des eaux douces tropicales. Tous ces auteurs concluent que la présence de bifidobactéries dans l'eau traduit une pollution fécale récente.

#### 1.2.7.2. Milieux sélectifs

Le milieu utilisé par Evison et James (1974) (modification du milieu de Gylleberg) pour dénombrer les bifidobactéries posait des problèmes de sélectivité. Les streptocoques fécaux, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus* se développaient sur ce milieu gênant le dénombrement des bifidobactéries, notamment dans les prélèvements de matières fécales animales. Il faut attendre les années 1980 pour que de nouveaux milieux soient développés:

- milieu PSN de Tanaka et Mutai (1980), étudié uniquement sur des souches d'origine humaine (provenant de collection ou de fèces humaines). L'agent sélectif est de l'acide nalidixique à raison de 100 µg / ml. Le pH est de 6,8.

- milieu YN6 de Resnick et Levin (1981), milieux YN17 et HBSA de Mara et Oragui (1984), étudiés sur des souches sauvages isolées de matières fécales humaines ou animales et sur des eaux de surface.

Le milieu YN6 contient 3 agents sélectifs: acide nalidixique (80 µg / ml), sulfate de néomycine (2,5 µg / ml) et vert de bromocrésol (300 µg / ml). Le pH est de 7.

Le milieu YN17 se différencie du milieu YN6 par la composition des antibiotiques: acide nalidixique (20 µg / ml), sulfate de kanamycine (50 µg / ml), polymixine B (50 UI / ml).

Mara et Oragui ont proposé le milieu HBSA (dérivé du YN17) permettant d'énumérer sélectivement des bifidobactéries d'origine humaine en se basant sur la caractéristique de certaines espèces d'origine humaine (*B.breve* et *B.adolescentis*) de fermenter le sorbitol contrairement à la

plupart des espèces animales. Les auteurs reconnaissent que ce milieu, moins sélectif que le YN17, ne permet pas la croissance des autres espèces d'origine humaine.

La composition de ce milieu se différencie de celle du milieu YN17 par l'addition du sorbitol et de pourpre de bromocrésol qui remplacent le lactose et le vert de bromocrésol et par les antibiotiques: acide nalidixique (30 µg / ml), polymixine B (10 UI / ml).

Malheureusement, aucun milieu n'est satisfaisant: le manque de sélectivité vis à vis des lactobacilles et streptocoques fécaux des milieux YN6 et YN17 et leur pouvoir inhibiteur trop fort vis à vis des bifidobactéries dû à l'addition d'antibiotiques ont été mis en cause respectivement par Mara et Oragui (1984) et Muñoa et Pares (1985, 1988).

- milieu BIM25 de Muñoa et Pares (1988): étudié sur des eaux usées urbaines et des eaux de surface

Les antibiotiques inclus sont identiques à ceux utilisés pour le YN17. Comme une des caractéristiques des bifidobactéries est de dégrader le glucose sans passer par la voie classique de la glycolyse (mais en utilisant la voie du Fructose 6 phosphate) Muñoa et Pares ont ajouté à un milieu non sélectif (Reinforced Clostridial Agar) outre des antibiotiques, de l'acide iodoacétique (inhibiteur de l'action de la glyceraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase, enzyme intervenant dans le cycle de la glycolyse). Les résultats obtenus par ces auteurs indiquent que la sélectivité du BIM25 est significativement plus élevée que celle des milieux YN6 et YN17 quelle que soit la nature du prélèvement.

- milieu de Beerens (1980): le dernier milieu décrit (Beerens, 1990) grâce à l'action combinée de l'acide propionique et d'un pH acide (pH ajusté à 5,0) qui provoque un blocage du cycle de la glycolyse a la particularité d'être non inhibiteur vis à vis des bifidobactéries (les résultats sont donnés pour 11 souches types) alors qu'aucun développement n'a été observé pour les souches d'*Acinetobacter* sp., de *Pseudomonas* sp., d'*Enterococcus* sp., de *Bacillus* sp., de *Lactobacillus* sp., de *Listeria* sp. de *Leuconostoc* sp. et de levures.

### 1.3. OBJECTIFS ET ORGANISATION DE L'ETUDE

Le but de notre travail était de rechercher d'éventuelles caractéristiques permettant de distinguer une pollution fécale animale et une pollution humaine. Dans cette optique, nous avons étudié 2 groupes de germes, les entérocoques (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*), le groupe *S. bovis-S. equinus* et *E. coli* d'une part, les bifidobactéries d'autre part.

#### Les streptocoques fécaux et *E. coli*:

Comme il n'existe pas actuellement de terme regroupant à la fois les entérocoques d'origine intestinale et les streptocoques d'origine fécale nous avons repris sous le terme "streptocoques fécaux" les entérocoques *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* ainsi que *S. bovis - S. equinus*.

L'identification rapide des *E. coli* et des streptocoques fécaux par la mise en évidence d'une activité enzymatique (Kilian et Bulow, 1976; Godsey *et al.*, 1983; Feng et Hartman, 1982; Littel et Hartman, 1983) à l'aide de substrats fluorogéniques nous a paru être une voie intéressante à développer.

Aussi, avons nous recherché et dénombré ces germes par la technique des microplaques (NPP 96 tubes) en incorporant aux milieux sélectifs pour *E. coli* et pour streptocoques fécaux respectivement du 4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -D glucuronide (MUG) et 4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -D glucoside (MUD).

Les études se sont alors orientées vers les axes suivants:

- dénombrement des streptocoques fécaux et de *E. coli* sur microplaques afin d'évaluer le rapport *E. coli*/ Streptocoques fécaux dans les prélèvements de matières fécales humaines et animales;
- étude de la répartition des streptocoques fécaux dans les matières fécales et les eaux usées urbaines;
- essai de différenciation des souches de streptocoques fécaux et de *E. coli* d'origine animale et humaine à l'aide de tests biochimiques ou de la sensibilité vis à vis des principaux antibiotiques utilisés dans l'alimentation animale;
- mise au point d'un kit d'identification rapide de *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *S. bovis*;

- recherche de *S.bovis* dans dans les eaux.

### Les bifidobactéries

Nous avons dirigé nos recherches sur les bifidobactéries bien que leur croissance nécessite l'anaérobiose, en raison de leur habitat exclusivement humain ou animal.

L'identification de ces germes par des caractères phénotypiques n'étant pas encore possible (Biavati et al., 1982; Mitsuoka, 1984), nous avons

- recherché les bifidobactéries dans des matières fécales d'animaux, dans des eaux usées urbaines et dans des eaux de surface en utilisant les 2 derniers milieux décrits (BIM 25 de Muñoa et milieu de Beerens) dont nous avons comparé la sélectivité;
- réalisé en parallèle une collection de bifidobactéries;
- effectué une analyse taxonomique du genre *Bifidobacterium* afin de sélectionner des tests biochimiques permettant de différencier les souches d'origine humaine et animale

Nous rappelons brièvement les principes de la taxonomie numérique:

Grâce au développement de l'outil informatique et à l'évolution des techniques miniaturisées permettant l'étude de multiples caractères biochimiques, la taxonomie a considérablement évolué.

La classification numérique conduit à la construction de groupes constitués d'après les similitudes globales de caractères existants entre des organismes étudiés. Un poids égal est accordé à tous les caractères analysés.

L'analyse numérique qui a été développée pour la classification bactérienne par Sneath (1978) fait appel à la statistique descriptive et comporte 2 méthodes:

- analyse factorielle qui donne une représentation continue de la population bactérienne étudiée.
- classification automatique qui permet de répartir les individus d'une population en groupes homogènes, chaque groupe étant bien différencié des autres.

Cette dernière méthode reste la plus utilisée puisque le but de la taxonomie numérique est de délimiter des groupes bactériens.

La classification automatique comprend plusieurs étapes.

## 1) Codification des caractères:

La plupart des caractères bactériens codés sont biochimiques (activité enzymatique, fermentation de carbohydrates) ou physiologiques (capacité de croissance à des températures ou salinités données). Les caractères s'expriment de façon binaire. Tout caractère présent ou positif est codé "1" et tout caractère absent ou négatif est codé "0".

## 2) Mesure de l'affinité entre les individus:

Un coefficient de similitude (S) ou un indice de distance (d) sont calculés à partir des caractères codés en mode binaire. L'indice de distance peut s'exprimer sous différentes formes:

$$d=1-S$$

$$\text{ou } d=1/S -1$$

$$\text{ou } d= \log 1/S$$

Un pourcentage de similitude est défini pour chaque combinaison de souches prises 2 à 2. Soient 2 souches A et B, leur nombre de similitudes positives (a) et négatives (d) et leur nombre de divergence (b et c) sont représentées dans le tableau suivant :

		B	
		+	-
A	+	a	b
	-	c	d

$$n = a + b + c + d$$

Parmi les coefficients de similitude, les plus connus sont

JACCARD:  $S_j = a/(a+b+c)$ . Il ne tient compte que des similitudes positives

SOKAL ET MITCHEMER:  $S_M = (a+d)/n$ . Il ne tient compte que des similitudes négatives

DICE:  $S_D = 2a / (2a + b + c)$ . Il ne tient pas compte des similitudes négatives. Cet indice qui permet de diminuer le temps de calcul a été retenu pour notre analyse numérique.

## 3) Classification:

Les méthodes de classification utilisées en taxonomie bactérienne sont basées sur l'agrégation.

La classification ascendante hiérarchique procède par agrégations successives d'individus.

Il existe différents critères d'agrégation:

- la distance minimale : elle présente l'inconvénient de réunir des ensembles distincts d'où des groupes mal séparés et hétérogènes.

- la distance maximale qui risque de créer des classes artificiellement. Les groupes sont nombreux mais ont un effectif très petit.

- la distance moyenne entraîne une déformation moindre de la structure de la population. Elle a été retenue dans notre analyse taxonomique pour cette raison.

Le principe de l'agrégation hiérarchique selon la distance moyenne est le suivant:

Soit 4 souches A, B, C et D qui présentent des pourcentages de similitude (% S)

<u>Souches 2 à 2</u>	<u>% S</u>
A : D	90
B : C	80
A : B	50
A : C	30
B : D	20
C : D	5

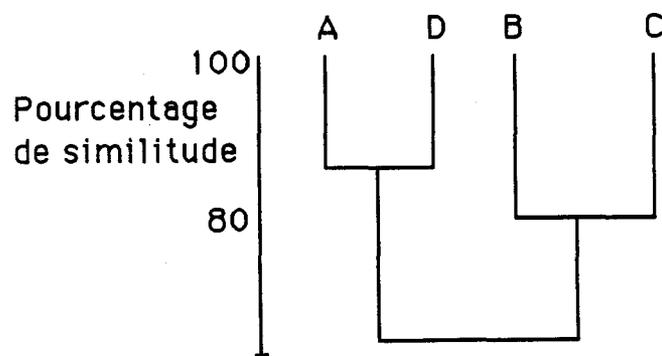
la construction du dendrogramme se fera de la manière suivante :

- 1) positionnement du couple A : D qui présente le pourcentage de similitude le plus élevé,
- 2) positionnement du couple B : C puis agrégation des 2 premiers couples A : D et A : C, à un niveau hiérarchique qui constitue la moyenne des valeurs de pourcentage de similitude pour les combinaisons A : B, A : C, B : D

et C : D soit :  $(50 + 30 + 20 + 5)/4 = 26,25$

Le résultat obtenu est une hiérarchie que l'on peut représenter par un dendrogramme.

Le choix du niveau de coupure pour lequel les souches se regroupent en ensembles suffisamment homogènes tout en se différenciant des autres groupes pose des difficultés. En général, on utilise plusieurs niveaux de coupures qui individualisent groupes et sous groupes.



## 2. MATERIEL ET METHODES

### 2.1. STREPTOCOQUES FECAUX ET *E.COLI*

#### 2.1.1. Collecte et traitement des échantillons

88 prélèvements ont été effectués dans les départements du Nord et du Pas de Calais:

nombre d'échantillons	nature du prélèvement
7	fèces de porcins
10	bovins
2	ovins
6	chevaux
1	lapins
7	poules
2	mouettes
12	humains
6	eaux usées urbaines
36	eaux de surface

Chaque échantillon d'origine animale a été obtenu en mélangeant les fèces de plusieurs animaux appartenant à un même élevage.

Les échantillons de matières fécales et d'eaux usées brutes ont été collectés dans des flacons stériles etensemencés dans les 3 heures qui ont suivi le prélèvement.

Des solutions mères, préparées à partir de 10 g de fèces ou de 10 ml d'eaux usées urbaines émulsionnées dans de l'eau physiologique (q.s.p 100 ml) ont été diluées jusqu'à  $10^{-8}$ .

### 2.1.2. Milieux de culture

#### milieu "MUG" :

pour le dénombrement de *E.coli* (Hernandez *et al.*, 1991)

milieu double concentration:

tryptone:	40 g
lactose:	10 g
NaCl:	10 g
salicine:	1, g
eau distillée	900 ml

Autoclavage 115°C pendant 15 minutes

une fois le milieu refroidi les composants suivants sont ajoutés:

Triton: 1 ml

4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -D glucuronide (MUG) dissout préalablement dans 0,1 ml de

N-N-diméthylformamide: 100 mg.

eau distillée: 100 ml

Le pH est ajusté à  $7,0 \pm 0,1$ .

#### milieu "MUD" :

pour la recherche de *S.bovis* et le dénombrement des streptocoques fécaux

milieu double concentration:

tryptose:	80 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> :	10 g
galactose:	2 g
tween 80:	1,5 ml.
eau distillée	900 ml

Autoclavage 115 °C pendant 15 minutes

une fois le milieu refroidi les composants suivants sont ajoutés:

TTC (Chlorure de Triphényl Tétrazodium ): 0,1 g

acétate de thallium acétate: 2 g

gentamicine: 5 mg

NaHCO<sub>3</sub> 4 g

eau distillée 100 ml

4-méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoside (MUD) dissout dans 0,1 ml de N-N-diméthylformamide: 150 mg.

Le pH est ajusté à  $7,0 \pm 0,1$ .

Les milieux MUD et MUG sont répartis en microplaques à 96 puits (à raison de 100 µl par puits) et déshydratés sous tunnel de séchage.

Les échantillons à analyser dilués ou non sont ensemencés à l'aide d'une micropipette à 8 canaux: 200 µl sont répartis dans chaque cupule de la microplaque. Une fois ensemencées, les microplaques sont incubées:

- 24 heures à 44,5°C pour la recherche des *E.coli*
- 36 heures à 37°C pour la recherche des streptocoques fécaux.

La fluorescence est effectuée par un lecteur de fluorescence à faisceau vertical (FLUOROSKAN TITERTEK)

Les puits présentant une culture et fluorescents sont considérés positifs. Le nombre de germes présents dans la solution mère à analyser est évalué par le Nombre le Plus Probable (De Man, 1975).

### Milieux pour *E.coli*

#### milieu de Schubert : pour l'identification de *E.coli*

tryptophane	0,2 g
acide glutamique	0,2 g
sulfate de magnésium	0,7 g
citrate de sodium	0,5 g
sulfate d'ammonium	0,4 g
chlorure de sodium	2 g
peptone	10 g
mannitol	7,5 g
phosphate dissodique	4 g
phosphate monopotassique	0,6 g
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à  $7,4 \pm 0,2$

Autoclavage 115°C pendant 10 minutes

Incubation 24 heures à  $44,5^\circ\text{C} \pm 0,5^\circ\text{C}$

milieux pour streptocoques fécauxmilieu MBA modifié pour la recherche de *S.bovis*

Azoture de sodium	0,05 g
inuline	4 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 g
raffinose	3 g
extrait de levure	0,1 g
sodium β- glycérophosphate	1 g
NaCl	1 g
pourpre de bromocrésol	0,05 g
KCl	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,2 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
Agar	12 g
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à 7,2± 0,2

Autoclavage 115°C pendant 10 minutes

Incubation 48 heures à 39,5 en anaérobiose°C

milieu de Slanetz:

dénombrement de souches pures de streptocoques (tests de comparaison de sélectivité des milieux)

tryptose:	20 g
extrait de levure	5 g
glucose	2 g
phosphate dipotassique	4 g
azoture de sodium	0,4 g
agar	10 g
eau distillée	1000 ml

le pH est ajusté à 7,2± 0,2

Autoclavage 110 °C pendant 20 minutes

Lorsque le milieu est refroidi à environ 45°C, 0,1 g de TTC sont ajoutés

Incubation 48 heures à 37°C

milieu de Rothe:

dénombrement de souches pures de streptocoques (tests de comparaison de sélectivité des milieux)

tryptose:	20 g
glucose	5 g
NaCl	5 g
phosphate dipotassique	2,7 g
phosphate monopotassique	2,7 g
azoture de sodium	0,2 g
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à  $6,8 \pm 0,2$

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

Incubation 48 heures à 37°C

milieu de Litsky à l'éthyl violet:

dénombrement de souches pures de streptocoques (tests de comparaison de sélectivité des milieux)

peptone	20 g
glucose	5 g
NaCl	5 g
phosphate dipotassique	2,7 g
phosphate monopotassique	2,7 g
azoture de sodium	0,3 g
solution à 0,01 g d'éthyl violet pour 100 ml d'eau distillée	5 ml
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à  $6,8 \pm 0,2$

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

Incubation 48 heures à 37°C

milieu BEA :

dénombrement de souches pures de streptocoques (tests de comparaison de sélectivité des milieux)

pastone	17 g
peptone pepsique de viande	3 g
extrait de levure	5 g
bile de bœuf déshydratée	10 g
NaCl	5 g
citrate de Sodium	1 g
esculine	1 g
citrate de fer ammoniacal	0,5 g

azoture de sodium	0,25 g
agar	13 g
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à  $7,1 \pm 0,2$

Autoclavage 120 °C pendant 15 minutes

Incubation 48 heures à 37°C

bouillon tryptocaséine-soja : pour la culture des souches pures.

hydrolysate tryptique de caséine	17 g
peptone de soja	3 g
NaCl	5 g
phosphate de potassium	2,5 g
glucose	2,5 g
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à  $7,3 \pm 0,2$

Autoclavage 120 °C pendant 15 minutes

Incubation 24 heures à 37°C

gélose Columbia +Esculine:

pour les tests d'identification des streptocoques fécaux

base Columbia

(Diagnostic Pasteur, ref. 64674)	37 g
esculine	2 g
citrate de fer ammoniacal	0,5
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à  $7,1 \pm 0,2$

Autoclavage 120 °C pendant 15 minutes

Incubation 24 heures à 37°C

milieu AMC:

pour les tests d'identification des streptocoques fécaux

glucose	10 g
extrait de viande	3 g
tryptone	20 g
NaCl	5 g
extrait de levure	3 g

agar 15 g  
eau distillée 1000 ml  
pH ajusté à  $7,2 \pm 0,2$   
Autoclavage  $115^{\circ}\text{C}$  pendant 15 minutes

Evaluation du pouvoir inhibiteur des milieux de Rothe, litsky, BEA, Slanetz et MUD vis à vis de *S.bovis* (étude qualitative)

Les milieux solides ont étéensemencés en étalant 0,1 ml de chaque suspension bactérienne, diluée dans de l'eau distillée jusqu'au point d'opacité correspondant à 1 Mac Farland. Les milieux liquides répartis en microplaques ont étéensemencés avec 200  $\mu\text{l}$  de chaque suspension par puits. Après 36 heures d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ , la croissance des souches (présence de colonies pour les milieux solides ou trouble bactérien dans les milieux liquides) ont été notées.

Evaluation du pouvoir inhibiteur des milieux de Rothe, litsky et MUD vis à vis de *S.bovis* et du milieu MUD vis à vis de *E.faecium*, *E.faecalis* et *E.durans* (étude quantitative)

Des dénombrements ont été effectués avec des souches sauvages, par référence à un milieu non sélectif, le bouillon Tryptocaséine-soja.

Pour chaque souche, une suspension de 100 germes /ml a été préparée.

200  $\mu\text{l}$  des dilutions au 1/2, 1/20, 1/200 ont été répartis dans les puits 1 à 4, 5 à 8 et 9 à 12 des microplaques à 96 puits contenant 100  $\mu\text{l}$  des milieux déshydratés

Après 36 heures d'incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ , les dénombrements (exprimés en germes par ml) sont évalués par la méthode du NPP à 4 tubes par dilution, présentant ainsi une même précision quel que soit le milieu utilisé.

### 2.1.3. Tests biochimiques

#### Galerie API 20 E:

utilisées pour l'identification des germes se développant sur le Milieu MUG et n'ayant pas les caractéristiques de *E.coli* (indole +, gaz +) dans le milieu de Schubert.

#### Galerie API 20 Strep:

utilisées pour l'identification des germes se développant sur le milieu MUD.

#### Galerie API Zym:

pour la recherche de l'activité enzymatique (Annexe 1) sur des souches de streptocoques fécaux et de *E.coli* isolés des matières fécales animales et humaines .

Le système API Zym permet d'étudier simultanément 19 activités enzymatiques. L'activité enzymatique se traduit par le développement d'un chromatophore.

#### Activité enzymatique sur microplaques

Parmi la vingtaine de composés fluorescents commercialisés, 10 substrats (non fluorescents sous forme complexée et miscibles à l'eau) ont été incorporés dans du milieu de culture réparti en microplaque (annexe 1). L'activité enzymatique bactérienne se traduit par l'apparition d'une fluorescence dans les puits.

Les substrats préalablement dissous dans du N-N-diméthylformamide sont ajoutés à la base des milieux MUG et MUD à raison de 100 mg /l. Chaque solution ainsi préparée est distribuée dans les puits de la microplaque (100 µl /cupule). Après déshydratation les microplaques sontensemencées à raison de 200 µl par puits avec les suspensions bactériennes (de turbidité correspondant au tube Mac Farland 5) dans 5 ml d'eau distillée .

La fluorescence est lue avec le lecteur Fluoroskan Titertek.

mini galerie d'identification des streptocoques fécaux:

elle comprend les étapes suivantes:

1) isolement sur une gélose Columbia + esculine: mise en évidence de l'hydrolyse de l'esculine (test "ESC").

incubation: 24 heures, 37°C

2) ensemencement d'une colonie isolée esculine positive (halo noir) sur un quartier de gélose Columbia contenant du 4-méthylumbelliferyl-phosphate (à raison de 100 mg/l): production de phosphatase alcaline (test "PAL").

incubation 24 heures à 37°C

3) ensemencement d'un tube AMC (production d'acéthylméthylcarbinol, test "AMC" ou VP), d'un tube de bouillon à 6,5% en NaCl (croissance en milieu hyper salé, test "SEL") et d'une galerie sur microplaque.

La galerie simplifiée regroupe 8 tests :

- production de l'  $\alpha$ -galactosidase (test " $\alpha$ -gal") , de la  $\beta$ -D glucuronidase (test " $\beta$ -gur") et de l'arginine dihydrolase (test "ADH");

- fermentation du ribose, L-arabinose, raffinose, mannitol et du sorbitol;

le milieu de base pour la mise en évidence de l'arginine dihydrolase est le milieu de Moëller (51 g/l) additionné d'arginine (20 g/l) et de 20 mg de 4-méthylumbelliférone.

Le milieu de base dans lequel sont incorporés les carbohydrates, le 4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -galactoside et le 4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -D glucuronide est préparé en double concentration:

chlorhydrate de cystéine	1 g
tryptone	40 g
NaCl	10 g
sulfate de Na	1 g
eau distillée	1000 ml

pH ajusté à 7,8

Autoclavage 120 °C pendant 15 minutes

A cette base sont ajoutés:

- soit 100 mg de 4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -galactoside soit 100 mg de de 4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -D glucuronide;

- soit 20 mg de 4-méthylumbelliférone et les différents carbohydrates (à une concentration de 10 g/l).

Chaque base est incorporée dans 12 puits (soit une rangée) à raison de 100 µl par cupule d'une microplaque à raison de 100 µl par cupule (cf schéma).

Après déshydratation, 200 µl d'une suspension bactérienne émulsionnée dans 5 ml d'eau distillée (de turbidité correspondant au tube Mac Farland 5) sontensemencés dans chaque puits. Les cupules correspondant aux tests de fermentation des carbohydrates et à l'hydrolyse de l'arginine sont recouvertes de paraffine. Les microplaques et les tubes "AMC" et "SEL" sont incubés 24 heures à 37°C.

Le principe de la lecture est le suivant:

l'intensité de la fluorescence émise par le 4-méthylumbelliférone incorporé dans le milieu est d'autant plus forte que le pH est élevé. La fermentation des carbohydrates qui entraîne une acidification du milieu se traduit par une diminution de la fluorescence du puits. En revanche, l'hydrolyse de l'arginine qui alcalinise le milieu se traduit par une augmentation de la fluorescence. La production d' $\alpha$ -galactosidase ou de la  $\beta$ -D-glucuronidase libérant le 4-méthylumbelliférone entraîne aussi une augmentation de fluorescence.

La lecture de la fluorescence des puits des microplaques se fait au temps 0 et après 24 heures.

l'intensité de la fluorescence est chiffrée par le Fluoroskan Titertek.

Il est possible d'ensemencer 11 souches et un témoin (à raison de une souche par colonne) par microplaque.

		n° des souches													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	T	tests biochimiques inclus dans la microplaque	évolution de l'intensité de la fluorescence pour une réaction positive
A														$\alpha$ -galactosidase	augmentation
B														$\beta$ -D-glucuronidase	"
C														hydrolyse de l'arginine	"
D														fermentation du ribose	diminution
E														fermentation de l'arabinose	"
F														fermentation du mannitol	"
G														fermentation du sorbitol	"
H														fermentation du raffinose	"

Nous avons appliqué la codification utilisée pour la lecture des galeries API. Le principe du codage est de condenser les informations binaires (+ ou -), en un profil numérique en distinguant 4 groupes de tests de poids 1, 2, ou 4 .

tests	ESC	PAL	AMC	sel	$\alpha$ -gal	$\beta$ -gur	ADH	ribose	arabinose	mannitol	sorbitol	raffinose
codes	1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4
exemple	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-

le code obtenu dans l'exemple, 5371 correspond à *E. faecium*.

La galerie a été étudiée sur des souches de référence et des souches sauvages.

Les souches de collection sont les suivantes:

<i>S.salivarius</i>	ATCC 13419
<i>S.bovis</i>	CCM 5614
<i>S.uberis</i>	NCFB 2039
<i>S.hyointestinalis</i>	NCDO 586
<i>S.cecorum</i>	SP 4610
<i>E.hirae</i>	CCM 2424
<i>E.malodoratus</i>	NCDO 847
<i>E.gallinarum</i>	NCDO 2313
<i>E.faecium</i>	CCM 2518
<i>E.durans</i>	CCM 5612
<i>E.faecalis</i>	CCM 2541
<i>E.casseliflavus</i>	CCM 2478
<i>Proteus vulgaris</i>	ATCC 13-315
<i>Morganella morganii</i>	ATCC 25830
<i>Proteus rettgeri</i>	CIP 6924
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 9144
<i>Bacillus subtilis</i>	CCM 7718
<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 6514

CCM:Czechoslovak Collection of Microorganisms, J.E. Purkyne University, Trida Obrancu miru 10, 662 43 - Brno Czechoslovakia.

CIP: Collection de bactéries de l'Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75724 Paris CEDEX, France.

NCDO: National Collection of Dairy Organisms, Shinfield, Reading, U.K.

SP: Collection de bactéries, Faculty of Veterinary Medicine, University of Gent, Belgium.

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, Md, U.S.A.

NCFB: National Collection of Food Bacteria, Shinfield, Reading, Berks, RG2 9AT, U.K.

#### 2.1.4. Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité des souches d'origine humaine et animale a été étudiée par la méthode de diffusion en gélose.

Nous avons sélectionné les antibiotiques les plus utilisés dans l'alimentation animale (Annexe 3):

Les souches pures ont étéensemencées dans un bouillon Tryptocaséine Soja et incubées 18 heures à 37°C. Les cultures ont été diluées dans de l'eau peptonée au 1/300 pour les souches de *E.coli* et au 1/100 pour les souches d'entérocoques et de *S.bovis*.

antibiotique	référence	charge du disque	diamètre d'inhibition en mm	
			résistante	sensible
Diméridazole	SIGMA D425	4 µg	≤ 15	≥ 20
Oxytétracycline	SIGMA O5750	30 µg	≤ 19	≥ 23
Triméthoprim	SIGMA T7883	5 µg	≤ 16	≥ 20
Virginiamycine	SIGMA V2753	15 µg	< 19	≥ 19
Spiramycine	SIGMA S9132	100 µg	≤ 22	≥ 26
Chlortétracycline	SIGMA C4881	30 µg	≤ 19	≥ 23
Bacitracine	7200000 unités SIGMA B0125, 250000 unités	130 µg	≤ 16	≥ 20
Tylosine	SIGMA T3397	de 10 à 500 µg	-	-
Monensin Sodium	SIGMA M5273	de 10 à 500 µg	-	-

3 ml de suspension bactérienne diluée ont été étalés sur gélose Mueller Hinton. Les disques antibiotiques ont été déposés dans chaque quartier de la boîte de Petri. Les rayons d'inhibition sont mesurés après 24 heures d'incubation à 37°C.

Nous avons complété l'étude de la résistance aux antibiotiques par l'ensemencement des souches de *E. coli* sur galerie API ATB Gram - qui comprend 14 antibiotiques (AMP: Ampicilline; AMC: Amoxicilline + acide clavulanique; MZL: Mezlocilline; CEX: Cefalexine; CTX: Cefotaxime; CFP:

Cefoperazone; TOB: Tobramycine; AKN: Amikacine; GEN: Gentamicine; NET: Netilmicine; DOT: Doxycycline; Nal: Acide nalidixique; PEF: Pefloxacine; TSU: Cotrimoxazole).

## 2.2. BIFIDOBACTERIES

### 2.2.1. Collecte et traitement des échantillons

Cent trois prélèvements ont été réalisés sur des eaux et des matières fécales d'animaux.

nombre d'échantillons	nature du prélèvement
20	fèces de porcins
11	bovins
8	ovins
2	caprins
6	chevaux
6	lapins
13	poules
10	eaux usées urbaines
27	eaux de surface

Des souches isolées de matières fécales humaines et animales (porcs, chien) nous ont été fournies par le laboratoire de microbiologie de la faculté de pharmacie de Lille.

Chaque prélèvement de matières fécales animales effectué avec un écouvillon stérile a été conservé en anaérobiose dans un système de transport pour germes anaérobies ("Culturette anaérobie" Biolyon). Chaque écouvillon a été pesé avant et après le prélèvement.

Les échantillons d'eaux usées ou de surface ont été transportés dans des flacons stériles.

Tous les échantillons de matières fécales ont étéensemencés dans les 4 heures qui ont suivi le prélèvement et dilués jusqu'à la dilution  $10^{-8}$  dans une solution de Ringer cystéiné au quart.

0,1 ml de chaque dilution a été étalé sur les milieux de culture.

Les eaux de surface ont été filtrées sur membrane de porosité 0,45 µm déposée sur les milieux.

Les milieux ont été incubés 72 heures à 39°C en chambre anaérobie contenant un mélange gazeux (80% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>).

### 2.2.2. Solutions et Milieux de culture

#### solution de Ringer cystéiné au quart:

NaCl	9 g
KCl	0,42 g
CaCl <sub>2</sub>	0,48
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0,2 g
chlorhydrate de cystéine	1,2 g
eau distillée	4000 ml
pH ajusté à 6,5± 0,2	
Autoclavage 120 °C pendant 15 minutes	

#### milieu TPY:

trypticase	10 g
phytone	5 g
glucose	5 g
extrait de levure	2,5 g
tween 80	1 ml
chlorhydrate de cystéine	0,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 g
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,5 g
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,25 g
CaCl <sub>2</sub>	0,15 g
FeCl <sub>3</sub>	0,0054 g
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à 6,5± 0,2

Autoclavage 120 °C pendant 25 minutes

#### Milieu BIM 25:

base Reinforced Clostridial Agar

(DIFCO; ref.1813-17-6)	51 g
eau distillée	950 ml

Le pH est ajusté à 7,1± 0,2

Autoclavage 120 °C pendant 15 minutes

après refroidissement sont ajoutés les antibiotiques et l'acide iodoacétique filtrés à 0,2 µm:

acide nalidixique	0,02 g
sulfate de polymixine	0,0085 g
sulfate de kanamycine	0,05 g
acide iodoacétique	0,025 g
TTC	0,025 g
eau distillée	50 ml

milieu de Rosenow cystéiné:

peptone	10 g
extrait de viande	3 g
NaCl	5 g
glucose	2 g
chlorhydrate de cystéine	0,3 g
fuschine acide à 5%	10 ml
marbre blanc	1 morceau (par tube)
cervelle lyophilisée	1 morceau (par tube)

Le pH est ajusté à  $7,2 \pm 0,2$

Autoclavage 120 °C pendant 20 minutes

milieu de Beerens:

base Columbia	
(Diagnostic Pasteur; ref. 64674)	37 g
glucose	5 g
chlorhydrate de cystéine	0,5 g
agar	5 g
eau distillée	1000 ml

faire bouillir

après refroidissement ajouter 5 ml d'acide propionique pur

ajuster le pH à  $5 \pm 0,1$

milieu Columbia Cystéiné:

base Columbia	
(Diagnostic Pasteur; ref. 64674)	37 g
glucose	5 g
chlorhydrate de cystéine	0,5 g
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à  $6,5 \pm 0,2$

Autoclavage 120 °C pendant 25 minutes

milieu VL:

peptone	10 g
NaCl	5 g
extrait de viande	2 g
extrait de levure	5 g
chlorhydrate de cystéine	0,3 g
glucose	2 g
agar	6 g
eau distillée	1000 ml

Le pH est ajusté à  $6,7 \pm 0,2$

Autoclavage 115 °C pendant 20 minutes

### 2.2.3. Tests biochimiques

Chaque colonie isolée des milieux Columbia Cystéiné, de Muñoa (BIM 25) ou de Beerens a été repiquée sur du milieu Columbia Cystéiné.

Les tests biochimiques suivants ont été effectués:

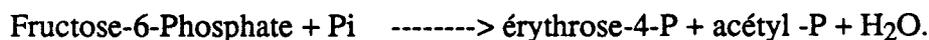
bouillon TPY sans glucose : production d'indole

" " avec addition de nitrate de potassium à 1 g/l : réduction des nitrates

" " avec addition de pourpre de bromocrésol à 0,03 g/l : fermentation du glucose.

La F6PPK (Fructose-6- Phosphate- Phosphocétolase) a été mise en évidence selon la technique décrite par Scardovi (1986):

Mise en évidence de la réaction:



Réactifs utilisés:

- solution 1 : Tampon phosphate 0,05 M , pH 6,5 + cystéine à 500 mg/l

pour le lavage des germes

- solution 2 : NaF à 6 mg/ ml + iodoacétate de K ou de Na à 10 mg/ml

- solution 3 : solution extemporanée d'hydroxylamine HCl à 13,9 g/100 ml ajusté avec NaOH à pH 6,5

- solution 4 : Acide Trichloroacétique: 15 g/100 ml
- solution 5 : HCl 4 M
- solution 6 : FeCl<sub>3</sub>, 6H<sub>2</sub>O: 5 g dans 100 ml de HCl 0,1 N
- solution 7 : Fructose-6-phosphate (sel de Na: 70% de pureté) : 80 mg/ ml

Mode opératoire:

- culture de 24 ou 48 heures en anaérobiose dans du bouillon TPY
- transvaser les bouillons TPY(10 ml) dans des tubes à centrifugation
- centrifuger pendant 10 mn à 2000 tours/minute
- éliminer le surnageant et suspendre le culot dans 10 ml de solution 1 (1<sup>er</sup> lavage) et centrifuger
- reprendre le culot avec 10 ml de solution 1 et centrifuger (2<sup>ème</sup> lavage)
- suspendre le culot dans 1,5 ml de solution 1
- soniquer 2 minutes dans un bac de glaçons
- mettre 1 ml de suspension (après sonication) dans 1 tube à essai
- ajouter 0,25 ml de solution 2 et 0,25 ml de solution 7
- incuber 30 à 60 mn à 37°C
- ajouter 1,5 ml de solution 3
- agiter et laisser 10 mn à température ambiante
- ajouter 1 ml de solution 4
- ajouter 1 ml de solution 5
- révéler avec 1 ml de solution 6

L'hydroxylamine réagit avec l' acétyl-P pour donner des acides hydroxamiques stables.

Une réaction d'oxydo-réduction se produit entre les ions ferriques et les hydroxamates aboutissant à la formation d'un composé présentant un maximum d'absorption à 505-510 nm.

Une couleur violette indique une réaction positive. Si la couleur jaune de la solution 6 persiste, le résultat est négatif . La comparaison est faite par rapport à un témoin ne contenant pas de fructose-6-phosphate.

#### 2.2.4. Analyse taxonomique

##### souches.

L'échantillonnage de 156 souches se répartit en 41 souches types (<sup>T</sup>) ou de référence provenant de diverses collections et 115 souches sauvages. Nous avons inclus dans l'analyse toutes les souches types décrites dans la littérature en 1990 à l'exception de la souche type de *B. bifidum* qui ne se développait pas ou trop faiblement dans les milieux non sélectifs habituellement utilisés pour la croissance des bifidobactéries. D'autre part, nous avons inclus dans l'étude 2 souches types de *B. breve* reçues de 2 collections différentes (NCFB et DSM). Parmi les 115 souches sauvages, 41 sont d'origine humaine (adultes ou enfants) et proviennent des bronches, de la bouche, du vagin, de l'intestin ou des fèces. Cinquante six souches ont été isolées de fèces d'animaux (36 souches de porcs, 2 de lapins, 1 de chien, 2 de chèvres, 2 de moutons, 2 de poules, 3 de chevaux, 3 de vaches, 5 de veaux). Dix souches ont été isolées d'eaux de surface et 8 d'eaux usées urbaines. L'isolement de ces souches a été effectué sur le milieu de Beerens.

##### Caractérisation phénotypique

Les tests enzymatiques et l'acidification des carbohydrates réalisés respectivement sur les galeries API ZYM (90 tests) et API 50 CH (CH= Carbohydrates; 49 tests) sont présentés en annexe 4. Les activités enzymatiques étudiées sont les suivantes: peptidases (59), estérases (10) et glycosidases (20). L'ensemencement des galeries ainsi que la révélation de l'activité enzymatique (après incubation à 39°C pendant 5 heures en aérobiose) ont été effectués selon la technique préconisée par le fabricant. Pour les 48 tests d'acidification et l'hydrolyse de l'esculine, les souches ont été ensemencées sur les milieu API 50 CHL (initialement destiné à l'identification du genre *Lactobacillus*) additionné de chlorure de cystéine (0,05%). L'acidification des carbohydrates a été lue après 48 heures d'incubation à 39°C en anaérobiose. Deux tests supplémentaires ont été réalisés en bouillon TPY. Il s'agit de la croissance à 46°C et de la croissance en présence de différentes concentrations de NaCl (0; 0,8; 3 et 5 %).

La croissance à 46°C ou en présence de NaCl a été lue après 2 et 8 jours d'incubation en anaérobiose.

Analyse numérique:

Elle consiste en une classification hiérarchique ayant comme critère d'agrégation la distance moyenne.

Les caractères ont été codés sous forme binaire 1 ou 0

réponse positive = 1

réponse négative = 0

Dans l'étude, 26 tests qui étaient soit positifs, soit négatifs pour l'ensemble des souches n'ont pas été inclus dans l'analyse numérique (annexe 4). Parmi les 114 caractères codés, les 2 tests supplémentaires réalisés en bouillon TPY (croissance à 46°C et en présence de NaCl) ont été subdivisés de la façon suivante:

- culture négative à 3% et 5% de NaCl: 0
- culture positive à 3%, pas de culture à 50% de NaCl : 1
- culture positive à 3% et à 5% de NaCl : 2
  
- culture à 46°C négative en 7 jours : 0
- culture à 46°C positive en 3 à 7 jours : 1
- culture à 46°C positive en 2 jours : 2

La mesure de l'affinité entre les individus a été évaluée par le calcul de l'indice de Dice.

### **2.2.5. Tests de température**

L'action de la température d'incubation sur la croissance des bifidobactéries a été étudiée sur les 156 souches: les bouillons TPYensemencés avec 20 µl d'une suspension de bactéries (à 10<sup>8</sup> germes /ml) et recouverts de paraffine ont été incubés dans des bains-marie thermostatés pendant 48 heures à des températures allant de 42 à 47 °C. Un bouillon TPY incubé à 39°C en chambre anaérobie a toujours étéensemencé en parallèle afin d'avoir un témoin de croissance positif. Le test est considéré comme positif si une culture bactérienne apparaît en 48 heures.

### 2.2.6. Extraction de L'ADN et hybridation des bifidobactéries.

Nous avons utilisée une technique d'extraction de l'ADN des bifidobactéries, dérivée de la méthode de Marmur (1961), (Driss Bahaka, communication personnelle).

L'ADN extrait est conservé dans une solution de 1SSC (Sodium Saline Citrate)

solution de 1 SSC : NaCl, 0,15 M et citrate trisodique, 0,015 M à pH 7,0

La température de dénaturation est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Kontrol model, UVIKON 820) équipé d'un programmeur de températures (HAACKE PG 20). La valeur du GC% (nombre de couples Guanine + Cytosine pour cent couples de bases) est calculée d'après l'équation de De Ley (1970).

Le pourcentage d'hybridation existant entre 2 souches est déterminé par la méthode de renaturation optique (De Ley, 1970).

Cette méthode consiste à mesurer la vitesse de renaturation des deux ADN pris séparément et celle de leur mélange.

Les taux de renaturation des deux ADN et de leur mélanges sont mesurés dans des cuves contenant 2,4 ml de SSC concentré 2 fois et 70 µg d'ADN. Les ADN sont dénaturés dans un bain marie à 105°C pendant 10 minutes puis refroidis brutalement dans de la glace pendant une minute. La renaturation, réalisée à la température optimale de renaturation et calculée en fonction du GC% est déterminée à partir des variations de densités optiques obtenues à une longueur d'onde de 260 nm pendant 40 minutes. Les valeurs des densités optiques sont ajustées à des droites de régression selon la méthode des moindres carrés. Le pourcentage d'hybridation est calculé avec l'équation de De Ley (1970).

### 3. RESULTATS ET DISCUSSION

#### 3.1. STREPTOCOQUES FECAUX ET *E.COLI*

##### 3.1.1. Comparaison du pouvoir inhibiteur du milieu MUD et des Milieux sélectifs

Donnelly et Hartman (1978) ont développé un milieu (GTC, Gentamicin Thallous Carbonate) dont l'agent sélectif est l'acétate de thallium, moins inhibiteur vis à vis de *S.bovis* que les milieux sélectifs habituellement utilisés (milieux KF, milieu de Barnes). Littel et Hartman (1983), en incorporant dans le milieu GTC du 4-méthylumbelliferyl- $\alpha$ -D-galactoside mettent en évidence par la lecture de la fluorescence une activité de l' $\alpha$ -D-galactosidase qu'ils trouvent être spécifique de *E.faecium* et de *S.bovis*.

Le milieu MUD, réparti en microplaques à 96 puits reprend la composition du milieu GTC en ajoutant du TTC (0,05 g/l) et en remplaçant le substrat fluorescent par du 4-méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoside, la  $\beta$ -D-glucosidase étant, d'après les données de ces auteurs, produite par toutes les souches de *E.faecium*, *E.faecalis*, *E.durans* et *S.bovis* étudiées. Le milieu ainsi transformé présente l'avantage de dénombrer les entérocoques et *S.bovis*.

Le pouvoir inhibiteur de ce milieu a été comparé à celui des milieux solides (BEA et Slanetz) et liquides (Rothe et Litsky) utilisés dans les dénombrements réglementaires des streptocoques fécaux.

Dans un premier temps nous avons comparé qualitativement la croissance de 41 souches sauvages: *E.faecium* (12 souches), *E.faecalis* (12 souches), *E.durans* (7 souches), *S.bovis* (11 souches), identifiées sur galerie API 20 STREP.

Alors que toutes les souches d'entérocoques étudiées se sont multipliées quel que soit le milieu, les 11 souches de *S.bovis* ne se sont développées que sur les milieux MUD et Rothe. Elles ont présenté des colonies à peine visibles à l'œil sur le milieu BEA et 7 souches ne se sont pas développées sur les milieux de Slanetz et de Litsky.

Il s'avère que les souches de *S.bovis* semblent inhibées par une concentration d'azoture de sodium supérieure à 0,2 g/l, les milieux de Slanetz, de Litsky, BEA et de Rothe contenant respectivement 0,4; 0,3; 0,25 et 0,2 g d'azoture de sodium par litre de milieu.

Dans un deuxième temps, nous avons comparé quantitativement le pouvoir inhibiteur des milieux de Rothe, Litsky et MUD par rapport à un milieu de référence non sélectif (bouillon Tryptocaséine soja) vis à vis de *S.bovis*. (tableau 9). Nous avons ensuite mesuré le pouvoir inhibiteur du milieu MUD sur les souches d'entérocoques (*E.faecium*, *E.faecalis* et *E.durans*) (tableau 10).

Tableau 9: Dénombrements de *Streptococcus bovis* dans différents milieux (exprimé en log de germes/ml).

SOUCHES	Milieu de référence	ROTHER	LITSKY	MILIEU MUD
B1	8,89	8,11	8,11	8,85
B2	8,81	6,85	<3,11	4,07
B3	8,85	6,34	<3,11	6,14
B4	7,11	6,11	3,47	5,34
B5	8,85	6,34	<3,11	7,49
B6	7,11	7,04	<3,11	<3,11
B7	8,85	8,14	<3,11	3,47
B8	8,85	7,34	<3,11	7,14
B9	8,89	6,34	<3,11	8,04
B10	8,85	7,34	<3,11	5,04
B11	8,89	7,34	<3,11	3,11

Tableau 10: Dénombrements des souches d'entérocoques sur le milieu MUD (en log de germes/ml).

SOUCHE	Milieu de référence	Milieu MUD
<i>E. faecalis</i>		
Fl 1	9,15	9,15
Fl 2	9,15	9,15
Fl 3	9,15	9,15
Fl 4	9,15	9,15
Fl 5	9,15	8,90
Fl 6	8,90	9,15
Fl 7	9,15	8,90
Fl 8	9,15	8,86
Fl 9	9,15	8,90
Fl 10	9,15	9,15
Fl 11	9,15	9,15
Fl 12	9,15	9,15
Fl 13	9,15	9,15
<i>E. durans</i>		
D1	9,15	9,15
D2	9,15	9,15
D3	8,90	9,15
D4	8,81	8,90
D5	9,15	8,81
D6	8,86	9,15
D7	8,86	8,90

SOUCHE	Milieu de référence	Milieu MUD
<i>E. faecium</i>		
Fm 1	8,15	9,15
Fm 2	8,86	9,15
Fm 3	8,85	8,86
Fm 4	8,85	8,86
Fm 5	8,86	8,81
Fm 6	8,90	8,86
Fm 7	8,90	8,81
Fm 8	8,90	8,86
Fm 9	9,15	8,86
Fm 10	9,15	9,15
Fm 11	8,90	8,86
Fm 12	8,86	9,15
Fm 13	8,86	8,15
Fm 14	8,81	8,81
Fm 15	8,15	8,15
Fm 16	8,90	9,15
Fm 17	9,15	9,15
Fm 18	8,90	9,15

Les 3 milieux sélectifs ont un effet inhibiteur sur 10 des 11 souches de *S.bovis* : on observe par rapport au bouillon Tryptocaséine-soja une chute moyenne de 1 log pour le milieu de Rothe, de 3 log pour le milieu MUD et de 5 log pour le milieu de Litsky qui de loin est le plus inhibiteur.

L'inhibition exercée sur les souches de *S.bovis* par les différents milieux sélectifs implique une sous estimation de la pollution fécale animale notamment avec la technique classique du NPP 3 tubes qui utilise le bouillon de Litsky, comme milieu confirmatif.

Le milieu MUD n'exerce aucun effet inhibiteur sur les souches d'entérocoques étudiées quelle que soit l'espèce. Les dénombrement obtenus sur le milieu de référence et le milieu MUD ne diffèrent pas significativement (au seuil de 5%).

Au cours de cette étude, nous avons constaté que toutes les souches d'entérocoques et de *S.bovis* présentaient effectivement une activité  $\beta$ -D-glucosidasique se traduisant par une fluorescence des puits. Cependant les souches de *S.bovis* ne réduisaient pas ou très faiblement le TTC incorporé dans le milieu MUD et pouvaient ainsi se différencier des entérocoques par l'absence de précipité rouge dû au formazan. Ces résultats sont en accord avec les données observées par Tilton et Litsky (1966) et Saleh (1980).

Moins inhibiteur que le milieu de Litsky vis à vis de *S.bovis*, le milieu MUD associé à la technique de la microplaque présente l'avantage de différencier *S.bovis* des entérocoques par l'absence de réduction du TTC.

### **3.1.2. Dénombrement de *E.coli* et des streptocoques fécaux. Rapport *E.coli*/streptocoques fécaux**

Nous avons analysé quantitativement des échantillons de matières fécales d'origine humaine et animale ainsi que des eaux usées brutes de stations d'épuration. Chaque prélèvement a étéensemencé sur les milieux MUD (recherche des streptocoques fécaux) et MUG (recherche des *E.coli*) en microplaques de 96 puits.

Les densités de *E.coli* et de streptocoques fécaux, exprimés en nombre de germes par gramme de fèces ou par 100 ml (pour les eaux usées) ont été évaluées en dénombrant sur les milieux MUG et

MUD les puits fluorescents. Après 36 heures d'incubation à 44°C (pour *E.coli*) ou 37°C (pour les streptocoques fécaux), les cultures dans les puits fluorescents correspondant aux dilutions les plus fortes ont été repiquées sur un milieu non sélectif (Columbia) puis identifiées par repiquage sur milieu de Schubert pour les souches isolées du milieu MUG et sur galeries API 20 Strep pour les souches isolées du milieu MUD.

Sur les 316 souches isolées (provenant de 320 puits fluorescents) du milieu MUD, 94% ont été identifiées comme streptocoques fécaux, les autres germes étant *Aerococcus viridans* et *Providencia rettgeri*. Parmi les 306 souches isolées (de 309 puits) du milieu MUG, 95% étaient des *E.coli*, les germes "faux positifs" se développant sur ce milieu correspondaient à *Citrobacter freundii* et *Bacillus sp.*

Nous avons reporté dans le tableau 11 les valeurs minimales et maximales des densités d'indicateurs fécaux obtenues pour chaque groupe de prélèvements. Les valeurs moyennes n'avaient ici aucune signification en raison de la trop forte variabilité des densités de germes observée pour une même espèce animale.

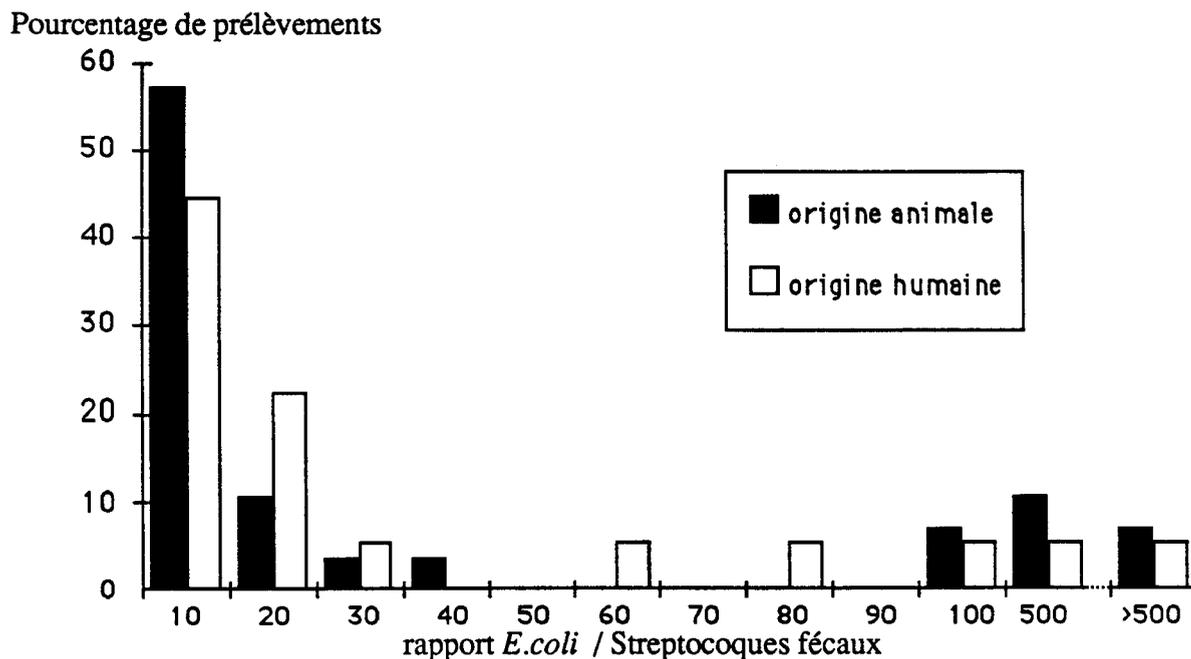
Les densités de *E.coli* et de streptocoques fécaux les plus basses ont été observées dans les matières fécales de mammifères herbivores alors que les valeurs les plus élevées ont été retrouvées dans les fèces de poulets. Indépendamment de l'origine, 88% des échantillons analysés présentent des densités de *E.coli* supérieures à celles des streptocoques fécaux.

Les rapports *E.coli*/ streptocoques fécaux qui varient de 0,022 à 2379 ne peuvent pas être corrélés à l'origine humaine ou animale des échantillons comme le montre la distribution des rapports (fig 1). Les valeurs proposées par Geldreich et Kenner (1969) (pollution fécale animale pour un rapport < 0,7, pollution fécale humaine pour un rapport > 4) n'ont pas de signification ici. En effet, parmi les 18 prélèvements d'origine humaine (matières fécales et eaux usées brutes urbaines), 39% présentent un rapport inférieur à 4 alors que 86% des 28 échantillons de fèces animales ont un rapport supérieur à 0,7. Pour Martins *et al.* (1984), un rapport supérieur à 2 indiquerait une pollution d'origine humaine. Dans notre étude, 72,3% et 79% des échantillons humains et animaux (différence non significative au seuil de 5%) présentent un rapport supérieur à 2 qui paraît être une valeur sans signification. Nos résultats en revanche sont en accord avec les observations d'Oragui (1978) qui remettaient en cause l'intérêt de l'utilisation du rapport *E.coli*/ streptocoques fécaux.

Tableau 11: Dénombrement de *Escherichia coli* et Streptocoques fécaux par gramme de fèces humides chez l'Homme ou chez différents animaux.

origine	nombre d'échantillons	<i>E.coli</i>		SF.*		rapport <i>E. coli</i> / SF.*	
		nombre de germes/g de fèces ou /100 ml		nombre de germes/g de fèces ou /100 ml			
		valeur minimale observée	valeur maximale observée	valeur minimale observée	valeur maximale observée	valeur minimale observée	valeur maximale observée
Humains	12 individus	$1,2 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^8$	$9,0 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^8$	0,1	1823
Bovins	8 (mélange de fèces)	$6,0 \cdot 10^3$	$6,9 \cdot 10^7$	$7,0 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^5$	0,54	2379
Porcins	6 (mélange de fèces)	$1,0 \cdot 10^6$	$5,1 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^6$	$8,0 \cdot 10^7$	0,022	15
Chevaux	4 (mélange de fèces)	$1,2 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^7$	0,1	19
Moutons	2 (mélange de fèces)	$1,4 \cdot 10^5$	$1,8 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^3$	$3,4 \cdot 10^4$	4,1	947
Poules	6 (mélange de fèces)	$6,0 \cdot 10^7$	$3,1 \cdot 10^8$	$7,0 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^8$	1,2	338
Mouettes	2 (mélange de fèces)	$1,2 \cdot 10^5$	$5,5 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^4$	$1,5 \cdot 10^6$	3,7	5,5
Eaux usées	6 eaux brutes	$1,8 \cdot 10^7$	$9, \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^8$	0,12	272

\*SF: entérocoques+*Streptococcus bovis*

Fig 1: Distribution des rapports *E.coli* / Streptocoques fécaux selon l'origine du prélèvement

### 3.1.3. Distribution comparée des espèces de streptocoques fécaux dans les échantillons d'origine humaine et animale

Les espèces identifiées provenant du milieu MUD regroupent *E.faecium*, *E.faecalis*, *E.durans* et *S.bovis*.(tableau 13). Sur 308 souches, cocci Gram +, catalase - isolées, 10 ont présenté des profils ne correspondant à aucune espèce sur la galerie API 20 Strep.

Le pourcentage d'entérocoques est significativement plus élevé ( $p < 0,02$ ) chez les humains et les oiseaux que chez les autres mammifères (tableau 12).

Tableau 12: Proportion d'entérocoques et de *Streptococcus bovis* selon différentes origines.

origine	nombre d'échantillons	nombre de souches identifiées	Entérocoques pourcentage	<i>Streptococcus bovis</i> pourcentage
Humains	18	109	91	9
Autres mammifères	26	140	53,5	46,5
Oiseaux	9	49	98	2

La présence des espèces *E. faecium* et *E. durans*, rencontrées respectivement dans 65% et 20% des échantillons n'est caractéristique d'aucune origine (tableau 13). Il n'y a pas de différence significative (au seuil de 5%) entre les proportions de *E. faecium* ou de *E. durans* isolées chez les humains et les animaux.

Tableau 13: Identification des souches isolées de différentes origines.

origine	nombre d'échantillons	nombre de souches	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. durans</i>	<i>S. bovis</i>	<i>streptococci</i> non identifiés
			nombre %	nombre %	nombre %	nombre %	nombre %
Humains	12	72	32 (44)	27 (37)	3 (4)	9 (12)	1 (1)
Rejets urbains	6	38	13 (34)	20 (52)	4 (10)	1 (3)	0 -
Bovins	10	56	14 (25)	0 -	0 -	40 (71)	2 (4)
Porcins	7	45	18 (40)	3 (6)	2 (4)	19 (42)	3 (7)
Chevaux	6	28	19 (68)	1 (3)	4 (14)	4 (14)	0 -
Moutons	2	12	3 (25)	0 -	6 (50)	2 (17)	1 (8)
Lapins	1	5	4 (80)	0 -	1 (20)	0 -	0 -
Poules	7	42	29 (69)	8 (19)	1 (2)	1 (2)	3 (7)
Mouettes	2	10	1 (10)	7 (70)	2 (20)	0 -	0 -
Total	53	308	133	66	23	76	10

L'espèce la plus discriminante, parmi les entérocoques, *E.faecalis*, présente dans 13 des 18 échantillons d'origine humaine, absente des fèces de bovins et de moutons, a été rarement isolée des matières fécales de porcs et de chevaux. Elle a cependant été retrouvée dans 6 des échantillons d'oiseaux.

L'espèce *S.bovis*, rare ou absente des fèces d'origine humaine ou d'oiseaux (elle n'a été isolée que dans les matières fécales de 2 humains) caractérise les bovins (elle représente 74 % des streptocoques fécaux identifiés) et dans une moindre mesure les porcins (45% des streptocoques fécaux identifiés).

Ces résultats sont dans l'ensemble en accord avec les travaux antérieurs effectués sur d'autres milieux sélectifs: Wheeler *et al.*, 1979 (Slanetz et Bartley medium); Oragui et Mara, 1981 (KF medium); Kuhnen *et al.*, 1988 (Todd Hewitt Agar + 6% NaCl). Rutkowski et Sjogren (1987) qui utilisaient un milieu non sélectif (permettant la recherche des streptocoques fécaux ou non) ont isolé fréquemment l'espèce *E.avium* dans les fèces de volailles alors qu'elle n'a pas été retrouvée au cours de notre travail dans les 9 échantillons d'oiseaux. Le milieu MUD ne semble pourtant pas inhibiteur vis à vis de cette espèce puisqu'elle a été isolée par la suite d'eaux de surface avec ce même milieu. Nos résultats sont en accord avec les données de Devriese *et al.* (1987) qui n'ont pas non plus identifié cette espèce dans les matières fécales de volaille.

Les proportions de *E.faecalis* et de *S.bovis* étant non significativement différentes (au seuil de 5%) dans les fèces humaines et de volailles, il ne semble pas possible de distinguer une pollution humaine d'une pollution due à un élevage. Seule une contamination liée à la présence de bovins ou porcins paraît détectable par la recherche de *S.bovis*.

Sur l'ensemble des souches repiquées de puits fluorescents sans précipité rouge (TTC-), 95% ont été identifiées comme étant *S.bovis* alors que seules, quelques souches de *E.faecium* (soient 2% des entérocoques) ont été isolées de puits présentant ses caractéristiques.

De plus, 80% des souches de *S.bovis* (toutes origines confondues) provenaient de puits TTC-, ce pourcentage augmentant jusqu'à 90% pour les souches isolées de bovins.

Pour cette étude, le pourcentage de faux positifs est seulement de 6% sur le milieu MUD malgré la nature fécale (comprenant de nombreux autres genres bactériens) des prélèvements. En la couplant

à la technique du dénombrement par microplaque il a été possible de détecter la présence de *S.bovis*. Lorsque cette espèce appartient à la flore streptococcale dominante, les souches sont présentes dans les dernières dilutions pour lesquelles les puits ne contiennent plus qu'une seule souche soit TTC+ (entérocoque), soit TTC- (*S.bovis*). Etant donné la forte proportion de *S.bovis* (TTC-) dans les matières fécales de bovins et de porcins, nous avons supposé qu'une eau fraîchement contaminée par ces animaux contiendrait des souches de *S.bovis* repérables par des puits TTC-. Ceci a fait l'objet d'une étude réalisée sur des eaux de surface développée dans les paragraphes 3.1.6 et suivants.

Diverses approches infructueuses ont auparavant été écartées.

### 3.1.4. Recherche de *S.bovis* sur le milieu MBA

Le milieu MBA d'Oragui et Mara (1984) décrit comme sélectif de *S.bovis* a été ensemencé par la technique de filtration à partir de 13 prélèvements dont 3 d'origine humaine et 10 d'origine animale.

54 colonies se développant sur les boîtes des dernières dilutions ont été repiquées et identifiées (tableau 14).

Tableau 14: Proportions des différentes espèces isolées sur le milieu MBA.

souche	pourcentage *
<i>S.bovis</i>	30
<i>E.faecium</i>	24
<i>E.faecalis</i>	9
<i>E.durans</i>	7
bacilles Gram -	30

\*proportion de souches isolées de chaque espèce par rapport au nombre total de souches isolées

Les proportions des différentes espèces isolées indiquent que 70% des colonies repiquées étaient des faux positifs, représentés non seulement par des entérocoques mais aussi par des bacilles Gram négatif. En raison de ce manque de sélectivité, nous n'avons plus utilisé ce milieu pour la recherche de *S.bovis*.

### 3.1.5. Essai de différenciation des souches de *E.coli* et de streptocoques fécaux selon leur origine humaine ou animale

Une collection de 116 souches composée de 57 *E.coli* et de 59 streptocoques fécaux a été réalisée à partir des échantillons fécaux humains et animaux.

Les tests enzymatiques ont été effectués sur galerie API Zym et sur microplaques.

#### 3.1.5.1. Tests enzymatiques

Nous avons reporté dans les tableaux 15 et 16 les proportions de réponses positives obtenues avec 2 techniques (API ZYM et composés fluorescents en microplaques) pour chaque activité enzymatique selon l'origine des souches, humaine ou animale pour les entérocoques et bovine ou porcine pour *S.bovis*. Nous avons regroupé les origines des souches de *E.coli* en 4 catégories constituées d'herbivores, de porcs, d'oiseaux et d' humains.

Tableau 15: Activité enzymatique des entérocoques, de *S.bovis* et d'*E.coli* par la technique des microplaques : en % de réponses positives.

Souches	<i>E.faecium</i>		<i>E.faecalis</i>		<i>S.bovis</i>	
	animaux	humains	animaux	humains	vaches	porcs
origine						
nombre de souches	10	10	10	10	13	6
$\beta$ glucuronidase	0	0	0	0	0	83
arabinosidase	60	50	50	90	23	16
cellobiosidase	100	100	10	40	100	100
$\beta$ -D glucosidase	100	100	100	100	100	100
glucosaminidase	100	100	100	100	62	33
$\beta$ galactosidase	90	100	100	100	100	100
$\alpha$ galactosidase	50	70	0	0	100	100
$\beta$ -D fucosidase	0	0	0	0	0	0
mannosidase	0	0	0	0	0	0
sulfatase	0	0	0	0	0	0

Tableau 15 (suite).

Souches	<i>E.coli</i>			
origine	herbivores	porcs	oiseaux	humains
nombre de souches	24	8	15	10
$\beta$ glucuronidase	100	100	100	100
arabinosidase	96	100	100	100
cellobiosidase	16	50	0	50
$\beta$ -D glucosidase	100	100	100	100
glucosaminidase	46	100	54	100
$\beta$ galactosidase	100	100	100	100
$\alpha$ galactosidase	100	75	61	100
$\beta$ -D fucosidase	0	0	0	0
mannosidase	25	25	20	0
sulfatase	0	0	0	0

Tableau 16: Activité enzymatique des entérocoques, de *S.bovis* et de *E.coli* par la technique API en % de réponses positives.

SOUCHES	<i>E.faecium</i>		<i>E.faecalis</i>		<i>S.bovis</i>	
	animaux	humains	animaux	humains	vaches	porcs
origine						
nombre de souches	10	10	10	10	13	6
Phosphatase alcaline	0	0	0	0	0	0
Estérase (C4)	100	100	100	100	0	0
Estérase lipase (C14)	100	100	100	100	0	0
Lipase (C14)	0	0	0	0	0	0
Leucine arylamidase	100	80	100	100	100	100
valine arylamidase	60	80	40	40	8	33
Cystine arylamidase	60	60	100	100	0	33
Trypsine	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ Chymotrypsine	70	60	80	60	0	0
Phosphatase acide	90	60	100	100	8	66
Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase	80	100	100	100	85	66
$\alpha$ galactosidase	40	20	0	0	92	100
$\beta$ galactosidase	70	80	70	30	0	83
$\beta$ glucuronidase	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ glucosidase	10	20	70	80	100	100
$\beta$ glucosidase	100	100	100	70	54	100
N-acetyl- $\beta$ glucosaminidase	50	40	10	0	0	0
$\alpha$ mannosidase	0	0	0	0	0	0
$\alpha$ fucosidase	0	0	0	0	0	0

Tableau 16 (suite).

espèce	<i>E.coli</i>			
	origine nombre de souches	herbivores 24	porcs 8	oiseaux 11
Phosphatase alcaline	0	0	0	0
Estérase (C4)	100	100	100	100
Estérase lipase (C14)	100	75	66	100
Lipase (C14)	0	0	0	0
Leucine arylamidase	100	100	100	100
valine arylamidase	100	100	100	100
Cystine arylamidase	16	0	13	0
Trypsine	87,5	87	100	90
$\alpha$ Chymotrypsine	0	0	0	0
Phosphatase acide	100	100	100	100
Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase	0	0	0	0
$\alpha$ galactosidase	100	100	80	90
$\beta$ galactosidase	100	100	100	100
$\beta$ glucuronidase	71	87	80	90
$\alpha$ glucosidase	0	12	47	30
$\beta$ glucosidase	29	25	33	60
N-acetyl- $\beta$ glucosaminidase	0	0	0	0
$\alpha$ mannosidase	0	0	0	0
$\alpha$ fucosidase	0	0	0	0

Deux résultats ont pu être mis en évidence:

1) Parmi les tests biochimiques, 6 activités enzymatiques ( $\alpha$  galactosidase,  $\beta$  galactosidase,  $\beta$  glucuronidase,  $\beta$  glucosidase, N-acetyl- $\beta$  glucosaminidase,  $\alpha$  mannosidase) ont été étudiées à la fois en utilisant comme substrat la 4 méthylumbelliférone (technique des microplaques) ou le naphtol (technique API). A une exception près (l'activité de l' $\alpha$  galactosidase, pour 5 souches de *E.coli* a été mise en évidence seulement par la technique API), la méthode basée sur la détection de l'activité enzymatique par la lecture de la fluorescence a toujours présenté une sensibilité au moins égale à la technique API.

2) Malgré la différence de sensibilité des 2 méthodes, quelle que soit la technique utilisée les profils enzymatiques des souches ne diffèrent pas significativement (au seuil de 5%) au regard de leur origine animale et humaine.

Cependant, les souches de *S.bovis* isolées de porcins pourraient se distinguer des souches de *S.bovis* isolées de bovins par l'activité de la  $\beta$ -D-glucuronidase (uniquement par la technique utilisant les substrats fluorescents) ou par l'activité de la  $\beta$  galactosidase (uniquement sur galerie API).

### 3.1.5.2. Etude de la résistance aux antibiotiques

Le diamètre d'inhibition des souches sauvages de streptocoques fécaux et de *E.coli*, vis à vis des principaux agents anti-infectieux utilisés dans l'alimentation animale étudiée par la méthode de diffusion en gélose est présentée en annexe 5. Les proportions de souches sensibles à ces antibiotiques selon leur origine sont données dans le tableau 17.

Tableau 17: Résistance des souches de streptocoques fécaux et de *E. coli* à différents antibiotiques.

pourcentage de souches sensibles aux différents antibiotiques							
espèce	nombre de souches	origine	Oxytétracycline	Chlortétracycline	Spiramycine	Triméthoprime	Virginiamycine
<i>E. faecium</i>	5	poules	0	20	60	20	0
	9	animaux <sup>a</sup>	60	40	60	10	0
	10	humains	100	100	40	10	0
<i>E. faecalis</i>	4	poules	0	0	0	0	0
	7	animaux <sup>b</sup>	0	43	0	0	0
	8	humains	0	87,5	12,5	25	0
<i>S. bovis</i>	7	porcs	29	0	29	0	85
	12	vaches	100	100	100	0	100

<sup>a</sup> 5 porcs + 2 chevaux + 2 vaches; <sup>b</sup> 3 porcs + 2 mouettes + 1 oie + 1 lapin;

Tableau 17 (suite)

pourcentage de souches sensibles aux différents antibiotiques					
espèce	nombre de souches	origine	Oxytétracycline	Chlortétracycline	Spiramycine
<i>E.coli</i>	5	poules	20	20	0
	16	animaux <sup>c</sup>	31	62	0
	13	humains	23	46	0

<sup>c</sup> 8 porcs + 1 cheval + 7 vaches

Les résultats obtenus avec la bacitracine et le diméridazole n'ont pas été reportés dans le tableau car toutes les souches qu'elles soient humaines ou animales étaient résistantes à ces antibiotiques aux concentrations étudiées.

La sensibilité des souches de *E.faecium* isolées de fèces d'humains et des autres mammifères ne diffère pas significativement quel que soit l'antibiotique. Seuls, les germes provenant de matières fécales de poules se distinguent des souches humaines par leur résistance à l'oxytétracycline et dans une moindre mesure à la spiramycine. Le même phénomène est observé pour les souches de *E.faecalis*, les souches isolées de fèces de poules se différenciant des souches humaines par leur résistance à la chlortétracycline. Par contre, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence pour les souches de *E.coli*. Les souches de *S.bovis* se distinguent des entérocoques et de *E.coli* par une plus grande sensibilité (en particulier celles isolées de matières fécales de bovins; annexe 5). D'autre part, les germes isolés d'origine porcine sont plus résistants aux tétracyclines et à la spiramycine que ceux d'origine bovine ce qui n'est pas surprenant puisque les porcs ingèrent plus d'aliments comportants des éléments anti-infectieux (notamment des tétracyclines) que les bovins adultes.

Nous avons étudié d'autres agents anti infectieux, tylosine, monensin sodium, (utilisés également dans l'alimentation animale) sur une gamme de concentrations de 10 µg à 500 µg (annexe 5) Quelle que soit la concentration en agent anti infectieux indépendamment de l'origine des entérocoques ou des *E.coli*, les diamètres d'inhibition n'ont pas varié significativement. Une fois

encore, les souches de *S.bovis* isolées de matières fécales de bovins se sont révélées plus sensibles que les souches provenant de porcins.

L'ensemencement des souches de *E. coli* en galerie Api ATB (tableau 18) montre que les germes présentent une même résistance vis à vis des antibiotiques inclus dans la galerie quelle que soit leur origine (humaine ou animale).

Tableau 18: Pourcentage de souches de *E. coli* sensibles aux antibiotiques de la galerie ATB.

antibiotique	TSU	PEF	NAL	DOT	NET	GEN	AKN	TOB	CFP	CTX	CEX	MZL	AMC	AMP
origine														
animale (21 souches)	91	100	100	66	100	100	100	100	95,5	100	38	81	86	53
humaine (13 souches)	85	100	100	62	100	100	100	100	82,5	100	69	69	77	62

(AMP: Ampicilline; AMC: Amoxicilline + acide clavulanique; MZL: Mezlocilline; CEX: Cefalexine; CTX: Cefotaxime; CFP: Cefoperazone; TOB: Tobramycine; AKN: Amikacine; GEN: Gentamicine; NET: Netilmicine; DOT: Doxycycline; Nal: Acide nalidixique; PEF: Pefloxacin; TSU: Cotrimoxazole).

De ces tentatives de différenciation des germes en fonction de leur origine, il ressort 2 résultats:

- d'une façon générale, impossibilité de distinguer les souches humaines des souches animales que ce soit par la mise en évidence de tests enzymatiques ou de résistance aux agents anti-infectieux. (Les souches de *E.faecium* et de *E.faecalis* étudiées, isolées de matières fécales d'origine humaine et des poules se différencient par leur sensibilité vis à vis de certains antibiotiques mais ce résultat n'a été obtenu qu'à partir d'un faible nombre de germes).
- possibilité de distinguer les *S.bovis* de porcins et de bovins soit par la recherche d'activités enzymatiques, soit par l'étude de leur sensibilité vis à vis des antibiotiques utilisés dans l'alimentation animale.

### 3.1.6. Mise au point d'une galerie rapide d'identification des streptocoques fécaux.

L'utilisation du milieu MUD associé à la technique des microplaques pour la recherche de *S.bovis* dans les eaux de surface nécessitait l'identification des souches isolées de puits fluorescents.

Nous avons donc mis au point une galerie d'identification fondée sur 12 tests permettant d'identifier les germes cultivant sur le milieu MUD.

Les entérocoques d'origine fécale hydrolysent tous l'esculine, ont une réaction de Voges Proskauer (VP) positive, ne synthétisent pas de phosphatase alcaline et se développent en milieu hypersalé (6,5% en NaCl). Ces 4 tests ont été sélectionnés pour différencier les streptocoques fécaux des éventuels faux positifs. Par ailleurs, les profils des souches sauvages identifiées avec le système API 20 strep, présentés en annexe 6, nous ont permis de retenir certains tests caractéristiques des différentes espèces de streptocoques fécaux (tableau 19).

Tableau 19: Caractères discriminants

espèces	nombre de souches	caractères discriminants retenus, retrouvés pour chaque profil
<i>S.bovis</i>	76	Arginine DiHydrolase (ADH) + , ribose -, raffinose +
<i>E.durans</i>	23	mannitol -, sorbitol -
<i>E.faecium</i>	133	mannitol +, arabinose +
<i>E.faecalis</i>	66	mannitol +, sorbitol +, $\alpha$ galactosidase -

D'après les résultats obtenus sur la galerie API, nous avons sélectionné les tests les plus discriminants qui se résument en 5 fermentations de carbohydrates (ribose, arabinose, mannitol, sorbitol et raffinose) et 2 activités enzymatiques (ADH et  $\alpha$  galactosidase). Nous avons complété

la galerie par la recherche de l'activité de la  $\beta$ -D-glucuronidase qui permettait en utilisant la technique des substrats fluorescents de différencier les souches de *S.bovis* isolées de matières fécales de porcins et de celles des bovins. Ces 8 tests ont été réalisés sur microplaques à 96 puits (11 souches par plaque).

Les profils des souches sauvages et de collection obtenus avec cette galerie sont présentés en annexe 2.

Une classification hiérarchique ascendante selon la distance maximale et utilisant l'indice de Jaccard (logiciel STATITCF) a été réalisée sur les profils d'un ensemble de souches sauvages comprenant d'une part les streptocoques fécaux, d'autre part des faux positifs susceptibles de se développer sur le milieu MUD tels *Bacillus*, *Proteus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* et *Aerococcus viridans*.

#### Caractérisation des streptocoques fécaux et de *A.viridans*

Les streptocoques fécaux possèdent tous les mêmes caractères communs :

- Esculine +
- PAL -
- VP. +

Les espèces se différencient par les autres tests biochimiques:

- *E.faecium*, dont les 15 souches incluses dans l'analyse sont regroupées en une seule classe est caractérisé par la fermentation de l'arabinose;
- *E.durans* par l'absence de fermentation du mannitol;
- *E.faecalis* par la fermentation du sorbitol et l'absence de production d'  $\alpha$  galactosidase;
- *S.bovis* (11 souches) forment 5 classes. Les tests les plus discriminants sont l'incapacité à se développer en milieu hypersalé et à produire l'arginine dihydrolase, l'absence de fermentation du ribose et la fermentation du raffinose;
- Les 9 souches d'*Aerococcus viridans* se regroupent en 4 classes. La majorité des souches (6 souches sur 9) se distingue des entérocoques par l'absence de culture en milieu hypersalé. Pour 5

souches le caractère le plus significatif est le test Voges Proskauer (VP) négatif, puis pour 3 souches, la fermentation du raffinose.

### Caractérisation des faux positifs

Les faux-positifs sont plus difficiles à identifier avec les tests de cette galerie. Il faut augmenter le nombre de classes pour pouvoir séparer les genres car les souches appartenant à un même genre ne répondent pas toutes de la même manière aux différents tests d'identification. Mais l'objectif de la galerie simplifiée est avant tout l'identification des streptocoques fécaux et la distinction entre streptocoques et faux-positifs.

La seule classe homogène est celle regroupant *Aerococcus viridans* qui se distingue des autres faux positifs par l'absence de culture en milieu salé et la non fermentation du ribose (3 souches sur 9). Les *Bacillus*, les *Micrococcus*, les *Proteus* et les *Staphylococcus* sont caractérisés par leur incapacité à hydrolyser l'esculine et par la production de phosphatase alcaline alors que les souches de streptocoques fécaux et *Aerococcus viridans* sont PAL -.

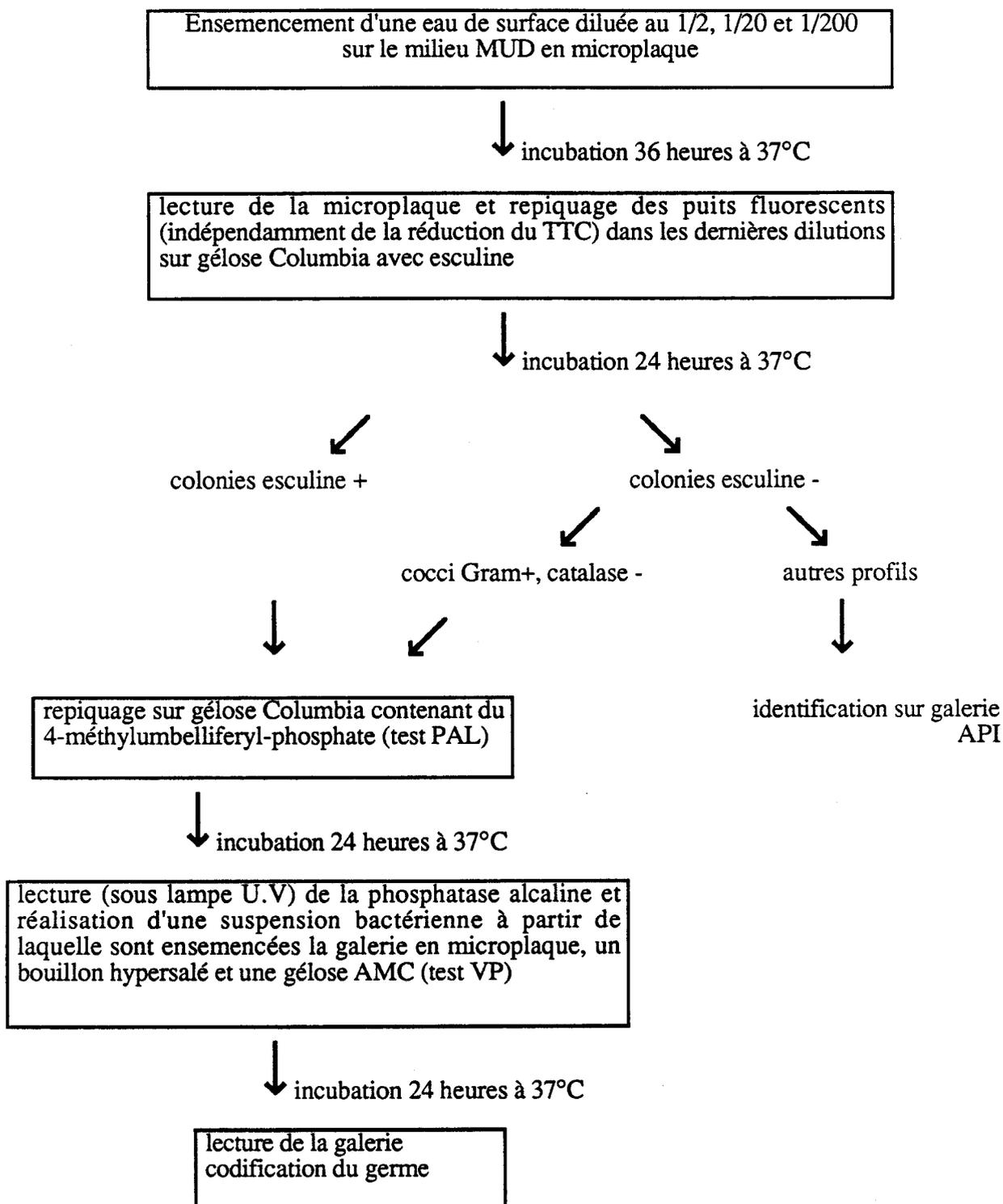
Utilisée dans le cadre d'un programme de recherches des indicateurs de pollution dans les eaux de surface, cette galerie permet une bonne distinction à 2 niveaux :

- distinction entre streptocoques fécaux et faux positifs;
- différenciation des espèces de streptocoques fécaux.

#### 3.1.7. Répartition des streptocoques fécaux dans les eaux de surface

D'après les données observées sur les matières fécales, *S.bovis* apparaissait comme l'espèce la plus intéressante pour la différenciation des contaminations humaine et animale. Nous avons donc étudié, par la technique des microplaques, la répartition des streptocoques fécaux dans des eaux de rivières.

Trente - six eaux de rivières ou de mer reçues au laboratoire ont étéensemencées sur le milieu MUD. Quel que soit l'échantillon, 3 dilutions ont été effectuées (au 1/2, 1/20 et 1/200) en eau distillée stérile etensemencées chacune dans 32 puits de la microplaque. Chaque eau a été traitée selon le schéma suivant :



Au total, 285 souches ont été identifiées. La répartition des espèces, leur fréquence d'apparition dans les eaux ainsi que leur provenance (puits TTC+ ou TTC-) sont reportés dans le tableau 20.

Tableau 20: Flore bactérienne de 36 eaux de surface se développant sur le milieu MUD.

espèces	répartition des espèces Pourcentage <sup>a</sup>	répartition des souches TTC- pour chaque espèce Pourcentage <sup>b</sup>	fréquence d'apparition des espèces dans les 36 eaux (en %)
<i>E.faecium</i>	57,5	14	100
<i>E.faecalis</i>	11,5	0	44
<i>E.durans</i>	13	8	36
<i>E. avium</i>	1	0	3
<i>S.bovis</i>	7	81	17
<i>Aerococcus viridans</i>	2,5	43	11
bacilles Gram+ou -	6,5	39	38

<sup>a</sup>: proportion de souches de chaque espèce par rapport au nombre total de souches identifiées

<sup>b</sup>: pour chaque espèce, proportion de souches isolées de puits fluorescents, TTC- par rapport au nombre de souches isolées de puits fluorescents (TTC + ou -)

91% des souches isolées sur le milieu MUD sont des streptocoques fécaux parmi lesquels une espèce domine: *E.faecium*, caractéristique d'aucune origine, a en effet été identifiée dans toutes les eaux et représente à elle seule 57,5% des germes isolés. Viennent ensuite *E.durans* et *E.faecalis*. Cette dernière espèce pourtant abondante dans les effluents des rejets urbains (52% des streptocoques fécaux isolés des 6 prélèvements) ne représente que 11,5% des germes et n'a été retrouvée que dans 16 échantillons. En revanche, les proportions de *E.durans* ne diffèrent pas significativement dans les rejets urbains et dans les eaux de surface. *E.avium*, absente dans les matières fécales analysées a été retrouvée dans une eau de rivière. *S.bovis*, seule espèce caractéristique d'une origine (bovine ou porcine) reste rare dans les eaux. De même que les faux positifs, cette espèce représente moins de 10% des germes isolés. Comme nous l'avons déjà souligné lors de l'étude de la flore streptococcalle des matières fécales, la majorité des souches de

*S.bovis* ne réduit pas le TTC incorporé dans le milieu MUD. Cependant, parmi les faux positifs, quelques germes ont été isolés de puits TTC- ainsi que certaines souches de *E.faecium* .

En conclusion, des méthodes ont été développées ou améliorées pour le dénombrement des *E.coli* et surtout des streptocoques fécaux. Ces méthodes présentent un intérêt pour l'amélioration des analyses d'eau (rapidité, sélectivité, miniaturisation). La recherche d'un indicateur sûr de l'origine humaine ou animale de la pollution fécale des eaux de surface se résume à *S.bovis* qui caractérise bien les fèces de bovins et dans une moindre mesure les porcins. Néanmoins, même s'il paraît possible de repérer la présence de cette espèce en utilisant la technique des microplaques associée au milieu MUD, la faible survie de cette espèce dans le milieu naturel (Geldreich et Kenner, 1969) semble limiter l'utilisation de ce germe comme indicateur.

Les autres approches suivies se sont également révélées infructueuses: évaluation du rapport *E.coli*/ Streptocoques fécaux; étude des antibiorésistances.

Aussi ce travail a t- il été ensuite orienté vers un groupe très différent, les bifidobactéries.

### 3.2. BIFIDOBACTERIES

#### 3.2.1. Comparaison du pouvoir sélectif et du pouvoir inhibiteur des milieux de Beerens et BIM 25

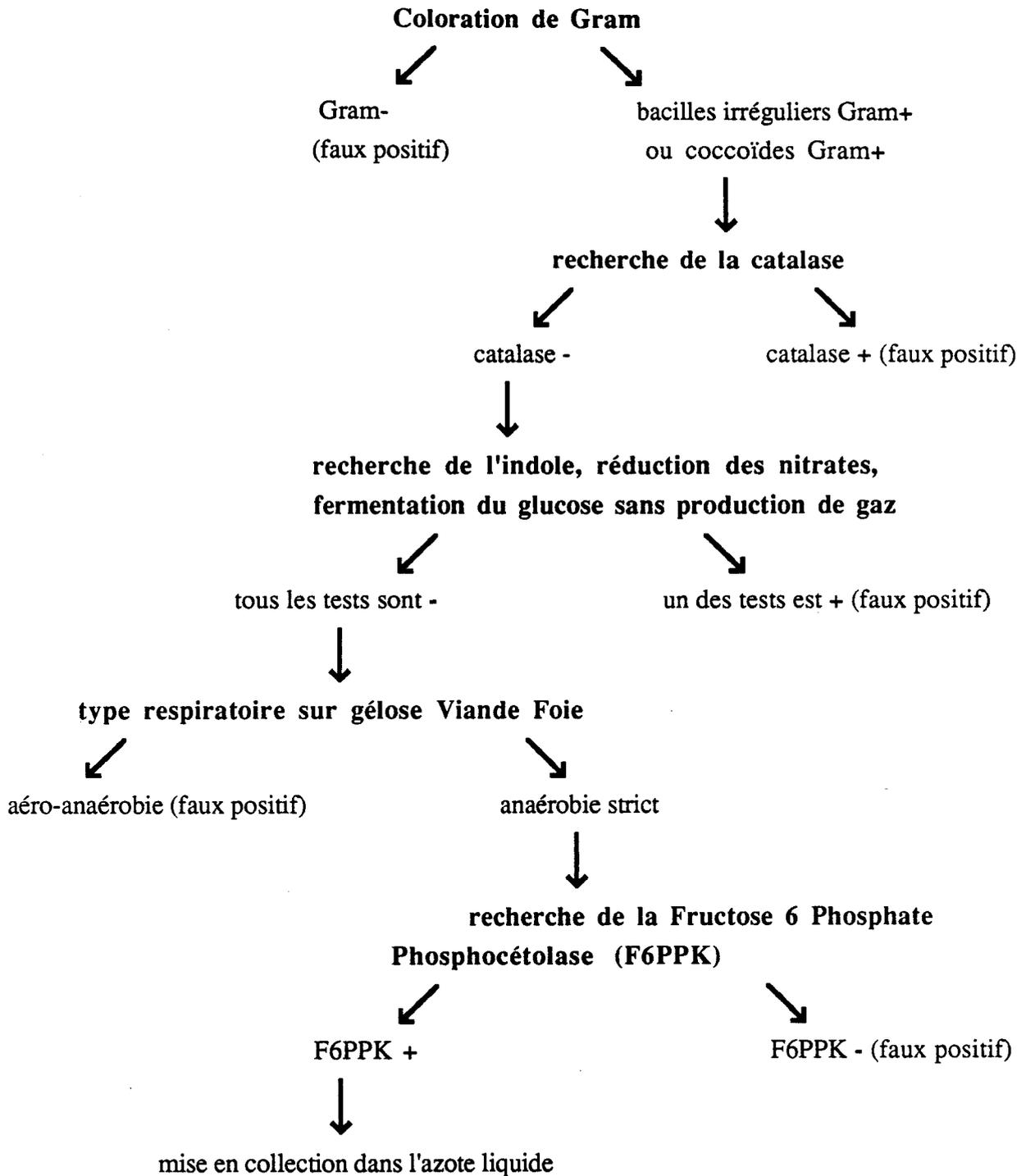
Isolées des eaux de surface, les bifidobactéries dont l'habitat est principalement fécal (à l'exception de *B. dentium*) ont fait l'objet de nombreuses études écologiques, concernant notamment la mise au point de milieux sélectifs (Resnick, 1978; Resnick et Levin, 1981; Mara et Oragui, 1984; Muñoa et Pares, 1985; Carillo *et al.*, 1985; Muñoa et Pares, 1988).

Jusqu'en 1988, les milieux n'étaient pas satisfaisants en raison de leur manque de sélectivité. Les milieux décrits par Muñoa et Pares (1988), puis par Beerens (1990) paraissaient donner de meilleurs résultats.

Nous avons donc comparé la sélectivité et le pouvoir inhibiteur des 2 derniers milieux par rapport à un milieu non sélectif (Columbia Cystéiné) permettant la croissance des bifidobactéries (Beerens, 1990) à partir de 32 échantillons provenant de matières fécales d'animaux d'élevage (porcins, bovins, chevaux, moutons, chèvre, poules), d'eaux usées ainsi que de 9 prélèvements d'eaux de surface.

Les dilutions préparées dans du Ringer cystéiné au 1/4 à partir des suspensions mères de matières fécales ou d'eaux ont été ensemencées par étalement (0,1 ml par dilution) sur les 3 milieux. Après 72 heures d'incubation en anaérobiose, pour chaque milieu,  $\sqrt{n}$  colonies, prises au hasard parmi  $n$  colonies ( $n < 100$ ) présentes dans les boîtes de Petri des dernières dilutions ont été repiquées sur gélose Columbia Cystéiné pour isolement.

Tous milieux confondus 1074 colonies ont été isolées et analysées selon un schéma comprenant sept tests discriminants, permettant d'identifier le genre *Bifidobacterium* (Scardovi, 1986)



L'analyse de la flore bactérienne se développant sur les 3 milieux se limite à la distinction bifidobactéries/ germes dits "faux positifs", ces derniers se répartissant en 4 groupes:

- 1) Bacilles Gram+, F6PPK-, anaérobies strictes, indole-, nitrate-;
- 2) Bacilles Gram+, F6PPK-, anaérobies facultatives;
- 3) Cocci Gram+;
- 4) Bacilles Gram-.

La distribution des bifidobactéries ainsi que des faux positifs (détaillée en annexe 7) est résumée dans les tableaux 21 et 22 selon l'origine des prélèvements. Par ailleurs, leurs proportions obtenues sur  $\sqrt{n}$  colonies, rapportées au nombre total de colonies dénombrées pour chaque milieu, ont permis d'évaluer les densités de bifidobactéries dans chaque prélèvement (tableau 24).

Tableau 21: Répartition des groupes bactériens isolés de matières fécales et d'eaux usées urbaines se développant sur chaque milieu, exprimée en proportion de bifidobactéries et de faux positifs/ nombre total de colonies isolées pour 32 prélèvements (en %).

origine: <b>porc</b> nombre de prélèvements: 5	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies isolées	64	52	51
<b>% de bifidobactéries</b>	<b>22</b>	<b>38</b>	<b>49</b>
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	0	2	4
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	54	56	32
% de cocci Gram +	16	4	15
% de bacilles Gram-	8	0	0

origine: <b>cheval</b> nombre de prélèvements: 4	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies isolées	36	31	36
<b>% de bifidobactéries</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	0	0	0
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	45	71	36
% de cocci Gram +	55	29	64
% de bacilles Gram-	0	0	0

origine: poule nombre de prélèvements: 7	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies isolées	69	57	73
% de bifidobactéries	6	9	9,5
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	5,5	0	13,5
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	65,5	91	58
% de cocci Gram +	17	0	19
% de bacilles Gram-	6	0	0

origine:mouton et chèvre nombre de prélèvements: 3	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies isolées	27	27	26
% de bifidobactéries	59,5	96	96
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	0	0	0
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	7,5	4	4
% de cocci Gram +	0	0	0
% de bacilles Gram-	33	0	0

origine: lapin nombre de prélèvements: 2	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies isolées	17	11	5
% de bifidobactéries	0	0	80
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	0	0	0
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	29,5	36	20
% de cocci Gram +	41	64	0
% de bacilles Gram-	29,5	0	0

origine: veau nombre de prélèvements: 3	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies isolées	34	29	32
% de bifidobactéries	35	83	66
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	12	17	2
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	9	0	4
% de cocci Gram +	35	0	28
% de bacilles Gram-	9	0	0

origine: vache nombre de prélèvements: 3	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies	28	8	21
% de bifidobactéries	0	25	0
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	14	0	5
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	7	75	14
% de cocci Gram +	79	0	81
% de bacilles Gram -	0	0	0

origine: station d'épuration nombre de prélèvements: 5	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies isolées	39	36	38
% de bifidobactéries	38	72	76
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	3	0	11
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	15	28	3
% de cocci Gram +	13	0	8
% de bacilles Gram-	31	0	0

Tableau 22: Répartition des groupes bactériens isolés d'eaux de surface se développant sur chaque milieu exprimée en proportion de bifidobactéries et de faux positifs / nombre de colonies isolées (en %)

origine: eau de surface nombre de prélèvements: 9	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS
nombre de colonies isolées	71	74	82
% de bifidobactéries	14	59,5	78
% de bacilles Gram+ anaérobies, F6PPK-	7	3	2,5
%de bacilles Gram+ aéro anaérobies, F6PPK-	38	9	6
% de cocci Gram +	12	28,5	13,5
% de bacilles Gram-	29	0	0

Ces données mettent en évidence que le pourcentage de bifidobactéries isolées dépend d'une part du milieu de culture, d'autre part de la nature du prélèvement.

L'exploitation statistique a été réalisée à l'aide du logiciel STATITCF. On a procédé à une analyse de variance à deux facteurs contrôlés: le facteur origine du prélèvement (comprenant les matières fécales de diverses espèces animales et les eaux usées urbaines) et le facteur milieu de culture. La comparaison des proportions moyennes de bifidobactéries isolées de chaque milieu (Test de comparaison de moyennes de NEWMAN KEULS,  $\alpha = 5\%$ ) met en évidence 2 groupes homogènes:

facteur milieu de culture

libellé	pourcentage moyen de bifidobactéries	groupes homogènes
milieu de Beerens	36,30	A
milieu BIM 25	31,68	A
milieu Columbia Cystéiné	17,91	B

Indépendamment de l'origine du prélèvement, la proportion moyenne de bifidobactéries isolées sur les milieux de Beerens et BIM 25 est donc 2 fois plus importante que celle obtenue sur le milieu de référence. Ces 2 milieux présentent pour l'ensemble des échantillons de fèces et d'eaux usées une même sélectivité (différence non significative au seuil de 5%) qui est toutefois assez faible pour la



La flore dominante qui constitue les faux positifs est représentée par les bacilles Gram+ F6PPK- aéro-anaérobies pour le milieu BIM 25. Elle est plus diversifiée sur le milieu de Beerens car elle comprend aussi des bacilles Gram+ F6PPK- anaérobies stricts et des cocci. En revanche, il n'a été isolé de bacilles Gram - que sur le milieu de référence.

Outre l'influence du milieu, Il existe un facteur origine puisque selon la nature du prélèvement, la composition de la flore dominante se caractérise par des groupes différents de germes indépendamment du milieu.

Ainsi, les bifidobactéries se retrouvent-elles en abondance dans les fèces de porcs, ovins, veaux ainsi que dans les eaux mais n'ont pas été identifiées (ou rarement) dans les fèces de poules, vaches, chevaux et lapins, la flore dominante étant alors constituée de bacilles Gram+ ou de cocci. Nous avons reporté dans le tableau 24 les densités de bifidobactéries (exprimées par gramme de fèces ou par 100 ml d'eau) se développant sur les 3 milieux pour chaque prélèvement.

La densité de bifidobactéries fluctue d'un prélèvement à l'autre indépendamment des milieux. Elle varie de  $10^5$  à  $10^{10}$ /g dans les fèces de porcins, de  $10^7$  à  $10^8$ /g dans les fèces d'ovins et de chèvre et de  $10^4$  à  $10^8$ /g dans les fèces de veaux. Dans les matières fécales de vaches et de chevaux, les densités de bifidobactéries sont inférieures à  $10^7$ /g. Les matières fécales de lapins se caractérisent par un nombre faible (inférieur à  $1,6 \cdot 10^3$ /g) de germes totaux et de bifidobactéries. Ces résultats sont dans l'ensemble en accord avec les données de Mitsuoka (1984) qui a rarement isolé des bifidobactéries dans les matières fécales de lapins et de chevaux (seulement dans un prélèvement sur 5), alors que dans les fèces de porcs, les bifidobactéries, isolées des 5 échantillons étudiés présentaient une densité moyenne de  $10^7$ /g. Il existe cependant une divergence pour les matières fécales de poules qui présentent une densité moyenne de  $10^9$ /g dans l'étude de Mitsuoka alors que dans notre analyse, à l'exception d'un échantillon de fèces de poule, les densités de bifidobactéries sont inférieures à  $3 \cdot 10^7$ /g. Ces différences pourraient être liées aux conditions de cultures ou à l'alimentation des animaux (nous avons retrouvé des bifidobactéries en forte densité uniquement dans les fèces d'une poule nourrie à l'herbe et au grain).

Tableau 24: Comparaison du pouvoir inhibiteur des 3 milieux vis à vis des bifidobactéries.

origine	Densités de bifidobactéries / g de fèces exprimées en log		
	COLUMBIA	BIM 25	MILIEU DE BEERENS
porc	8,0	7,4	7,1
"	<6,1	<5,1	<5,1
"	9,9	9,9	10,0
"	<5,3	<4,3	5,1
"	10,3	8,7	9,2
mouton	9,3	9,1	8,5
"	<5,7	6,3	7,2
chèvre	6,6	7,0	7,4
veau	6,0	6,0	6,5
"	<5,0	4,5	4,5
"	8,8	8,6	8,8
cheval	<7,2	<5,2	<5,2
"	<4,8	<3,8	<3,8
"	<6,6	<5,6	<6,6
"	<5,9	<3,9	<4,9
vache	<8,3	7,5	<7,3
"	<4,5	<4,5	<5,4
"	<3,9	<3,9	<3,9
lapin	<3,2	<3,2	<3,2
"	<4,5	<3,5	3,1
poule	<5,9	<4,9	<4,9
"	<4,9	<3,9	4,9
"	<6,8	<5,8	5,8
"	8,3	7,5	8,6
"	<7,5	<7,5	<7,5
"	<8,3	<7,3	<7,3
"	<7,7	<5,7	<6,7
station d'épuration			
effluent brut	<3,0	5,2	5,9
"	6,4	5,6	6,4
"	8,4	6,3	7,2
effluent traité	6,8	4,2	6,2
"	5,1	2,9	4,9
eau de surface	6,0	6,0	6,4
"	<4,0	<2,0	3,1
"	<5,0	3,3	3,7
"	6,3	5,5	6,4
"	<3,0	2,0	2,5
"	5,2	5,3	5,7
"	<3,0	4,2	4,3
"	<3,0	2,3	3,9
"	4,4	3,4	4,3

Les bifidobactéries n'ont pas été isolées dans 13 prélèvements de fèces quel que soit le milieu. Pour 89% des 28 échantillons positifs le milieu de Beerens présente des densités de bifidobactéries supérieures au milieu BIM 25. Ce pourcentage atteint 100% si l'on ne considère que les eaux usées urbaines et les eaux de surface. La densité moyenne de bifidobactéries sur le milieu BIM 25 est alors en moyenne 8 fois plus faible que celle obtenue sur le milieu de Beerens.

En conclusion, la sélectivité des 2 derniers milieux décrits n'est pas significativement différente (au seuil de 5 %) pour les prélèvements d'origine fécale. Cependant, le milieu de Beerens, moins inhibiteur vis à vis des bifidobactéries présente une sélectivité supérieure à celle du milieu BIM 25 pour les échantillons d'eaux de surface.

Cette étude avait pour but non seulement de comparer la sélectivité des milieux mais aussi de réaliser une collection de souches d'origine animale pour l'analyse taxonomique du genre *Bifidobacterium*. Nous avons complété la collection de bifidobactéries en analysant 40 échantillons supplémentaires de matières fécales animales en utilisant le milieu de Beerens. Les colonies ont été repiquées à partir des boîtes de Petri correspondant à toutes les dilutions, ce qui nous a permis d'isoler des bifidobactéries de fèces de chevaux et de vaches (tableau 25). En revanche, ces germes n'ont plus été rencontrés dans les matières fécales de moutons ou de chèvre.

Tableau 25: Occurrence des bifidobactéries dans les matières fécales animales.

origine	nombre total de prélèvements	nombre de prélèvements pour lesquels des bifidobactéries ont été isolées
porc	16	13
veau	3	2
lapin	4	2
poule	6	2
mouton	6	0
chèvre	1	0
vache	2	2
cheval	2	2

Abondantes dans les matières fécales des humains, de l'ordre de  $10^9/g$  de fèces (Leclerc et Moriametz; 1980; Mitsuoka, 1984), ces bactéries présentent d'après nos résultats des densités plus faibles dans les fèces animales. Cependant, elles ont été retrouvées dans au moins un prélèvement fécal de chaque espèce animale étudiée. En raison de la présence de bifidobactéries dans les eaux analysées, et étant donné la forte sélectivité du milieu de Beerens pour ces échantillons (tableau 22), la recherche de l'origine humaine ou animale des bifidobactéries dans le milieu aquatique apparaissait comme une voie à développer.

### **3.2.2. Dénombrement des bifidobactéries et de *E.coli* dans les eaux de surface**

Nous avons comparé les densités de bifidobactéries et de *E.coli* dans 27 eaux de surface (dont 2 eaux de mer faiblement contaminées).

Nous avons dénombré pour chaque échantillon d'eau les germes se développant sur le milieu de Beerens ensemencé par la technique de filtration (1, 10, 100 ml) et par la technique des dilutions (par étalement de 0,1 ml de chaque dilution).  $\sqrt{n}$  colonies présentes sur les boîtes de Petri comprenant entre  $n=1$  et 100 colonies ont été repiquées et identifiées (selon le schéma utilisé pour la comparaison des milieux de culture).

En parallèle, les eaux ont été ensemencées sur le milieu MUG en microplaques. Les densités d'*E.coli* ont été déterminées par la technique du NPP 96 à tubes.

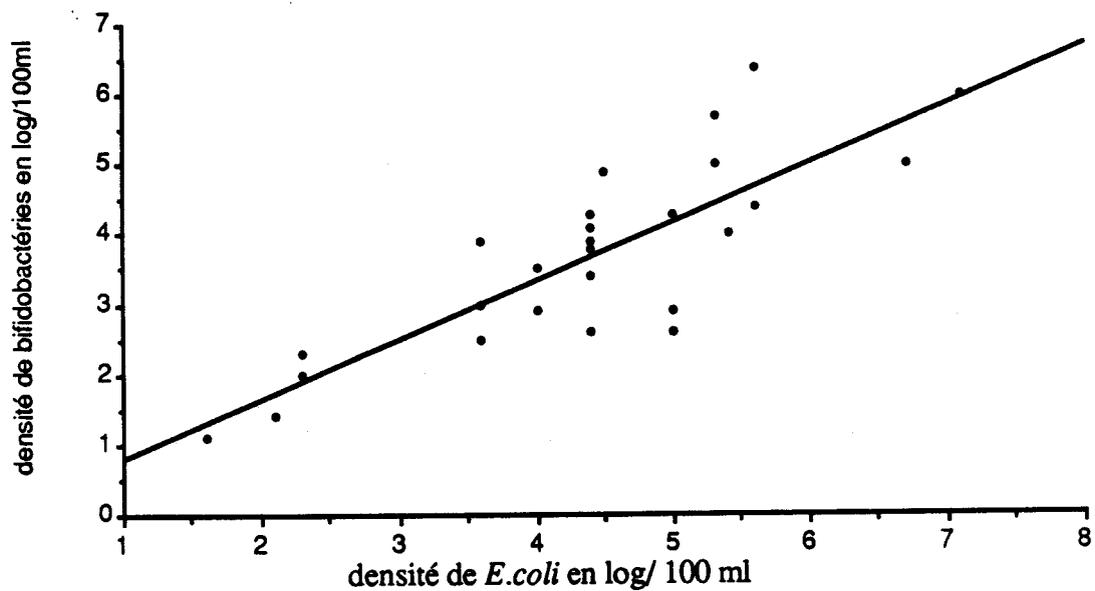
Les résultats sont reportés dans le tableau 26.

Les densités de bifidobactéries sont inférieures aux *E.coli* dans 69 % des échantillons. Il existe une bonne corrélation ( $r=0,83$ ) entre le nombre de bifidobactéries et de *E.coli* aussi bien dans les eaux de mer peu polluées que dans les eaux douces très contaminées (fig 2).

Malgré leur caractère anaérobie strict, ces germes, aérotolestants, peuvent être isolés des eaux de surface en présentant des densités proportionnelles à *E.coli* et par conséquent corrélées à l'intensité de la contamination fécale.

Tableau 26: Comparaison des densités de *E.coli* et bifidobactéries obtenus sur des eaux de surface.

densités de bifidobactéries exprimées en log/100 ml	densités de <i>E.coli</i> exprimées en log/100 ml
1,1	1,6
2,0	2,3
1,4	2,1
2,3	2,3
2,5	3,6
3,0	3,6
3,9	3,6
2,9	4,0
3,5	4,0
3,9	4,4
2,6	4,4
3,8	4,4
3,4	4,4
4,1	4,4
4,3	4,4
4,9	4,5
2,6	5,0
2,9	5,0
4,3	5,0
4,0	5,4
4,4	5,6
5,0	5,3
5,7	5,3
6,4	5,6
5,0	6,7
6,0	7,1

fig 2: Densité de bifidobactéries (exprimée en log/ 100 ml) en fonction de la densité de *E.coli*  
Données observées et droite de corrélation (d'équation  $y = 0,85x - 0,049$ )

L'intérêt de la recherche des bifidobactéries dans les eaux en utilisant le milieu de Beerens (dont la sélectivité est comprise selon les eaux entre 80 et 100%) est confortée par ces résultats.

Cette première partie de l'étude des bifidobactéries nous a permis non seulement de mettre en évidence l'abondance des bifidobactéries dans les eaux de surface mais aussi leur corrélation avec les *E.coli*, indicateur type de contamination fécale. Nous avons donc consacré la seconde partie de l'étude à analyser sur le plan phénotypique les souches humaines et animales dans l'espoir de pouvoir les différencier.

### 3.2.3. Analyse taxonomique du genre *Bifidobacterium*.

Nous avons réalisé une analyse numérique qui consiste en une classification hiérarchique ascendante ayant comme critère d'agrégation la distance moyenne sur 156 souches de bifidobactéries, à l'aide de 140 caractères biochimiques. Les souches utilisées comprennent 41 souches types (<sup>T</sup>) ou de référence et 115 souches sauvages d'origine humaine, animale ou provenant de l'environnement. Les tests sont répartis en fermentations de carbohydrates, activités enzymatiques auxquelles ont été ajoutées la croissance en présence de différentes concentrations de NaCl et à la température de 46°C. Ce dernier test a été retenu car d'après Mitsuoka (1984), les souches de *B.thermophilum* (d'origine animale) sont capables de se multiplier à cette température contrairement aux souches d'origine humaine.

Les 156 souches, ainsi que leur origine et leur situation sur le dendrogramme sont présentées dans le tableau 27

L'analyse montre 7 groupes qui peuvent être subdivisés en 20 sous-groupes (figure 3). Dix-huit souches n'ont pu être classées.

Tableau 27: Origine des souches utilisées pour l'analyse numérique.

groupe	sous groupe	n° de collection <sup>a</sup>	nom de la souche	origine
I (24 souches)	Ia (2 souches)	CUETM 89-158	?	Intestin d'adulte
		ATCC 27539 <sup>T</sup>	<i>B. catenulatum</i>	"
	Ib (4 souches)	ATCC 15705	<i>B. adolescentis</i>	"
		CUETM 89-168	?	Fèces d'adulte
		DSM 20438 <sup>T</sup>	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Fèces d'enfant
		CUETM 89-196	?	"
	Ic (12 souches)	CUETM 89-270	?	Fèces d'adulte
		ATCC 27534 <sup>T</sup>	<i>B. dentium</i>	Caries dentaires
		CUETM 89-147	?	Bronches
		CUETM 89-143	?	"
		CUETM 89-275	?	Bouche
		CUETM 89-219	?	Bronches
		CUETM 89-144	?	"
		CUETM 89-162	?	Fèces d'adulte
		ATCC 27678	<i>B. dentium</i>	Fèces d'humain
		CUETM 89-141	?	Bouche
		ATCC27679	<i>B. dentium</i>	Vagin humain
		CUETM 89-111	?	Fèces d'adulte
	Id (2 souches)	ATCC 15703 <sup>T</sup>	<i>B. adolescentis</i>	Intestin d'adulte
		CUETM 89-277	?	Fèces d'enfant
	non classées	CUETM 90-65	?	Eaux usées
		CUETM 90-129	?	Fèces de chien
		ATCC 27670	<i>B. angulatum</i>	Eaux usées
		ATCC 27535 <sup>T</sup>	<i>B. angulatum</i>	Fèces d'humain
II (48 souches)	IIa (3 souches)	CUETM 90-145	?	Fèces de porc
		CUETM 90-78	?	"
		CUETM 90-80	?	"
	IIb (4 souches)	DSM 20211 <sup>T</sup>	<i>B. suis</i>	"
		CUETM 90-152	?	"
		CUETM 90-155	?	Eaux usées
	IIc (25 souches)	CUETM 90-141	?	Fèces de porc
		CUETM 90-153	?	Eau de surface
		CUETM 90-44	?	Fèces de porc
		CUETM 90-158	?	Eau de surface
		CUETM 90-138	?	Fèces de porc
		CUETM 90-85	?	"
		CUETM 90-40	?	"
		CUETM 90-105	?	"
		CUETM 90-52	?	"
		CUETM 90-140	?	"
		CUETM 90-77	?	"
		CUETM 90-86	?	"
		CUETM 90-82	?	"
		CUETM 90-41	?	"
	CUETM 90-146	?	Fèces de vache	
	CUETM 90-90	?	Fèces de porc	
	CUETM 90-139	?	"	
	CUETM 90-45	?	"	
	CUETM 90-150	?	"	
	CUETM 90-111	?	"	
	CUETM 90-110	?	"	
	CUETM 90-79	?	"	
	CUETM 90-119	?	"	
	CUETM 90-51	?	"	

groupe	sous groupe	n° de collection	nom de la souche	origine
		CUETM 90-49	?	Fèces de porc
		CUETM 90-50	?	"
	II d (3 souches)	ATCC 15706	<i>B. adolescentis</i>	Intestin d'adulte
		CUETM 90-84	?	Fèces de porc
		CUETM 89-283	?	"
	II e (2 souches)	CUETM 90-81	?	"
		CUETM 90-46	?	"
	II f (7 souches)	CUETM 90-83	?	Fèces de cheval
		CUETM 90-76	?	"
		CUETM 90-113	?	"
		CUETM 90-43	?	Fèces de porc
		CUETM 90-124	?	Fèces de poule
		DSM 20210 <sup>T</sup>	<i>B. thermophilum</i>	Fèces de porc
		ATCC 25866	<i>B. thermophilum</i>	Rumen de bovin
	non classées	ATCC 27686 <sup>T</sup>	<i>B. choerinum</i>	Fèces de porc
		CUETM 90-48	?	Fèces de porc
		CUETM 90-154	?	"
		ATCC 27917 <sup>T</sup>	<i>B. boum</i>	Rumen de bovin
<hr/>				
III (29 souches)	III a1 (6 souches)	CUETM 89-184	?	Intestin d'enfant
		CUETM 89-175	?	Vagin humain
		NCFB 2257 <sup>T</sup>	<i>B. breve</i>	intestin d'enfant
		CUETM 89-248	?	Fèces d'enfant
		CUETM 89-181	?	"
		CUETM 89-160	?	Intestin d'adulte
	III a2 (4 souches)	CUETM 89-148	?	Fèces d'enfant
		CUETM 90-159	?	Eau de surface
		CUETM 89-293	?	Fèces d'enfant
		CUETM 90-118	?	Eau de surface
	III a3 (8 souches)	CUETM 90-114	?	"
		CUETM 89-173	?	Fèces d'enfant
		CUETM 89-241	?	"
		ATCC 27675	<i>B. catenulatum</i>	Fèces d'humain
		CUETM 89-237	?	Fèces d'enfant
		CUETM 89-178	?	Vagin humain
		DSM 20439	<i>B. pseudocatenulatum</i>	Eaux usées
		ATCC 27676	<i>B. catenulatum</i>	"
	III b1 (10 souches)	CUETM 90-71	?	"
		CUETM 89-157	?	Fèces d'adulte
		CUETM 90-116	?	Eau de surface
		CUETM 90-69	?	"
		ATCC 15697 <sup>T</sup>	<i>B. infantis</i>	Intestin d'enfant
		CUETM 89-276	?	Fèces d'enfant
		CUETM 90-70	?	Eau de surface
		CUETM 89-216	?	Intestin d'adulte
		ATCC 15707 <sup>T</sup>	<i>B. longum</i>	"
		CUETM 89-177	?	Intestin d'enfant
	non classées	CUETM 90-66	?	Eaux usées
<hr/>				
IV (4 souches)		CUETM 90-67	?	Eau de surface
		ATCC 25912 <sup>T</sup>	<i>B. indicum</i>	Tube digestif d'abeille
		DSM 20089 <sup>T</sup>	<i>B. asteroides</i>	"
		CUETM 90-47	?	Fèces de poulet

groupe	sous groupe	n°de collection	nom de la souche	origine	
V (22 souches)	Va (6 souches)	ATCC 27536	<i>B. animalis</i>	"	
		DSM 20213 <sup>T</sup>	<i>B. breve</i>	Intestin d'enfant	
		CUETM 90-68	?	Eau de surface	
		ATCC 25527 <sup>T</sup>	<i>B. animalis</i>	Fèces de rat	
		CUETM 90-89	?	Eaux usées	
		CUETM 90-109	?	"	
	Vb (2 souches)	DSM 20222 <sup>T</sup>	<i>B. magnum</i>	Fèces de lapin	
		ATCC 27682	<i>B. magnum</i>	Fèces de lapin	
	Vc (9 souches)	ATCC 25864	<i>B. globosum</i>	Rumen de bovin	
		CUETM 90-104	?	Fèces de lapin	
		ATCC 25526 <sup>T</sup>	<i>B. pseudolongum</i>	Fèces de porc	
		CUETM 90-147	?	Fèces de veau	
		CUETM 90-54	?	Fèces de vache	
		CUETM 90-91	?	Fèces de mouton	
		ATCC 25865 <sup>T</sup>	<i>B. globosum</i>	Rumen de bovin	
		DSM 20095	<i>B. pseudolongum</i>	Fèces de poule	
		DSM 20094	<i>B. pseudolongum</i>	"	
		Vd (3 souches)	CUETM 90-55	?	Fèces de vache
	CUETM 90-148		?	Fèces de chèvre	
	CUETM 90-149		?	"	
	non classées	CUETM 90-156	?	Fèces de veau	
		CUETM 90-64	?	"	
<hr/>					
VI (2 souches)		ATCC 27683	<i>B. subtile</i>	Eaux usées	
		ATCC 27537 <sup>T</sup>	<i>B. subtile</i>	"	
<hr/>					
VII (10 souches)	VIIa (4 souches)	CUETM 89-244	?	Fèces d'enfant	
		CUETM 89-218	?	"	
		CUETM 89-129	?	Fèces d'enfant	
		CUETM 89-271	?	"	
	VIIb (4 souches)	CUETM 89-250	?	"	
		CUETM 89-280	?	"	
		CUETM 89-262	?	"	
		CUETM 89-269	?	"	
		CUETM 89-128	?	"	
	non classées	CUETM 89-166	?	"	
non classées		ATCC 27538 <sup>T</sup>	<i>B. minimum</i>	Eaux usées	
		CUETM 90-115	?	"	
		CUETM 90-157	?	"	
		CUETM 89-282	?	Fèces d'enfant	
		DSM 20093 <sup>T</sup>	<i>B. gallicum</i>	Intestin d'adulte	
		CUETM 90-151	?	Fèces de lapin	
		DSM 20082	<i>B. bifidum</i>	Intestin d'adulte	
		CUETM 90-112	?	Fèces de veau	
		CUETM 90-144	?	Fèces de mouton	
		CUETM 90-42	?	Fèces de porc	
		CUETM 90-92	?	"	
		ATCC 25911 <sup>T</sup>	<i>B. coryneforme</i>	Tube digestif d'abeille	
		ATCC 27916 <sup>T</sup>	<i>B. cuniculi</i>	Fèces de lapin	
		DSM 20433 <sup>T</sup>	<i>B. pullorum</i>	Fèces de poule	
		ATCC 33777 <sup>T</sup>	<i>B. gallinarum</i>	Caecum de poule	
	CUETM 89-261	?	Fèces d'enfant		
	CUETM 89-209	?	Bronches		
	CUETM 90-53	?	Fèces de veau		

<sup>a</sup> ATCC, American Type Culture Collection, Rockville ,Md, U.S.A;

CUETM, Collection Unité Ecotoxicologie Microbienne, Villeneuve d'Ascq, France;

DSM, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Gottingen, Germany;

NCFB, National Collection of Food Bacteria, Shinfield, Reading, Berks, RG2 9AT, England.

Le résultat le plus important pour notre étude écologique est la séparation très nette des souches d'origine humaine et animale.

### 3.2.3.1. Groupes d'origine humaine:

Ils sont représentés par les groupes I, III et VII.

#### Groupe I

Il comprend des souches de collection appartenant au complexe "*B. adolescentis*" difficilement différenciables actuellement sur le plan phénotypique (Biavati *et al.*, 1982, Mitsuoka, 1984).

Il se compose de 24 souches réparties en 4 sous-groupes. Les sous-groupes Ia et Id comprennent chacun 2 souches dont *B. catenulatum*<sup>T</sup> et *B. adolescentis*<sup>T</sup>. Le sous-groupe Ib (4 souches) contient *B. pseudocatenulatum*<sup>T</sup> et *B. adolescentis* ATCC 15705. La plupart des souches sauvages des sous-groupes Ia, Ib et Id ont été isolées d'intestin ou de fèces d'adultes. Le sous-groupe Ic (12 souches), est caractérisé par des souches sauvages provenant d'un habitat autre que fécal (bouche, carie dentaire, vagin) qui agrègent avec des souches de collection de *B. dentium* (ATCC 27534<sup>T</sup>, ATCC 27678 et ATCC 27679). Quatre souches (dont *B. angulatum* ATCC 27535<sup>T</sup> et ATCC 27670) ne sont pas groupées.

#### Groupe III

Dans le groupe III, parmi les souches sauvages et de collection, 41,5 % proviennent de fèces d'enfants, les autres d'adultes (fèces ou vagin); 24% et de rivières; 34,5%.

Il regroupe 29 souches réparties en 4 sous-groupes: IIIa1 (*B. breve* NCFB 2257<sup>T</sup> et 5 souches sauvages), IIIa2 (4 souches sauvages), IIIa3 (*B. catenulatum* ATCC 27675, ATCC 27676, *B. pseudocatenulatum* DSM 20439, et 5 souches sauvages) ainsi que IIIb1 (10 souches, dont *B. infantis* ATCC 15697<sup>T</sup> et *B. longum* ATCC 15707<sup>T</sup>). Il est curieux de retrouver dans ce groupe les souches de collection de *B. catenulatum* et *B. pseudocatenulatum* alors que les souches type des 2 espèces se retrouvent dans le groupe I, d'autant plus que Biavati *et al.* (1982) ont noté que

*B. catenulatum* et *B. pseudocatenulatum* sont très proches d'un point de vue phénotypique. D'après Lauer and Kandler (1983) ces 2 espèces présentent 75% d'homologie ADN-ADN. De plus, selon ces auteurs ainsi que selon Scardovi et Crociani (1974), les 3 souches de collection du sous-groupe IIIa3 présentent avec les souches types *B. catenulatum*<sup>T</sup> and *B. pseudocatenulatum*<sup>T</sup> plus de 80% d'homologie ADN-ADN. Ces souches de collection incluses dans notre étude en sont pourtant séparées dans le dendrogramme. Comme l'indique le tableau 29 le sous-groupe IIIa3 se différencie du groupe I par la production de certaines enzymes (L-méthionine arylamidase, L-aspartate arylamidase, L-alanine arylamidase). Quant à l'agrégation des souches type de *B. longum* et *B. infantis*, elle n'est pas surprenante puisque d'après les données de Lauer et Kandler (1983) il existe 62% à 68% d'homologie ADN entre *B. longum* et *B. infantis*.

Certaines souches isolées de matières fécales de veaux allaités ont été décrites comme intermédiaires entre les espèces *B. longum* et *B. infantis* et présentaient plus de 80% d'homologie ADN avec les souches de collection de ces 2 espèces humaines (Scardovi *et. al.*, 1979). Mais dans notre étude, les souches isolées de fèces de veaux même allaités ne se sont pas retrouvées dans le groupe III.

#### Group VII

il comprend 11 souches sauvages. Les sous-groupes VIIa et VIIb ne contiennent que des souches isolées de matières fécales d'enfants et ne peuvent être rapprochées sur le plan phénotypique d'aucune espèce de bifidobactéries bien qu'elles possèdent les caractéristiques biochimiques du genre *Bifidobacterium* (bacilles Gram+, anaérobie stricte, catalase-, nitrate-, fermentant le glucose sans formation de gaz). Or, les espèces qui dominent dans les fèces d'enfants sont d'après Biavati *et al.* (1984), *B. infantis*, *B. longum* et *B. breve*. Les souches du groupe VII, malgré leur profil d'acidification très proche de *B. infantis* et *B. longum* se différencient de ces 2 espèces par leur absence d'activité enzymatique sur les divers substrats étudiés (tableau 29).

Les caractéristiques phénotypiques des 3 groupes "humains" sont présentés dans les tableaux 28 et 29. Les tests tels l'acide L-aspartique arylamidase, la L-alanine arylamidase, la L-méthionine arylamidase et l'acidification du L-arabinose, du mannose, du mannitol et de l'amygdaline paraissent intéressants pour différencier les souches d'origine humaine.

Mara et Oragui (1983) ont mis au point un milieu sélectif permettant de distinguer les souches de bifidobactéries humaines (qu'ils considéraient comme fermentant le sorbitol) des souches animales (ne fermentant pas le sorbitol). Mais dans notre analyse, les souches humaines, notamment celles qui se retrouvent dans les sous-groupes Ic (*B.dentium*) et IIIb1 (*B.infantis*, *B.longum*) ne fermentent pas ce carbohydrate.

Tableau 28: Caractérisation des 7 principaux groupes.

tests	Groupes	% de souches positives						
		I n=24* (a)**	II n=48 (b)	III n=29 (c)	IV n=4 (d)	V n=22 (e)	VI n=2 (f)	VII n=9
Tests enzymatiques								
L-aspartate arylamidase		13	90	100	50	100	100	100
S-benzoyl-cystéine arylamidase		4	85	72	100	100	100	11
L-méthionine arylamidase		0	58	69	100	100	100	0
L-séryl-tyrosine arylamidase		0	27	10	75	91	0	0
L-thréonine arylamidase		4	65	59	75	82	100	11
$\beta$ -alanine arylamidase		0	0	0	0	0	100	0
$\alpha$ -L-aspartyl-L-arginine arylamidase		0	2	0	0	64	0	0
L-histidyl-L-leucyl-L-histidine arylamidase		21	88	86	100	100	0	67
L-leucyl-L-alanine arylamidase		0	38	38	100	100	0	11
L-phénylalaninyl-L-arginine arylamidase		4	52	31	25	95	0	0
L-séryl-L-méthionine arylamidase		0	31	10	50	100	50	0
Estérase C5		71	98	97	75	95	100	0
$\alpha$ -galactosidase		88	100	97	100	100	100	11
$\alpha$ -glucosidase		88	98	86	100	100	100	0
$\beta$ -glucosidase		92	100	66	100	86	0	0
Acidification des carbohydrates								
L-Arabinose		75	2	59	25	41	0	100
Ribose		83	2	72	50	32	100	44
D-Xylose		67	4	59	0	23	0	100
Mannose		46	0	17	25	0	0	22
Sorbitol		46	0	62	0	5	100	0
Amygdaline		83	85	62	100	5	0	0
Salicine		75	8	31	75	0	0	0
Cellobiose		46	0	14	50	0	0	0
Mélézitose		29	13	14	0	0	0	89
Croissance à 46°C en 48 h		0	81	0	25	9	50	0

\* n, Nombre de souches

\*\* liste des souches types appartenant à chaque groupe: (a), *B.catenulatum*, *B.pseudocatenulatum*, *B.dentium*, *B.adolescentis*, *B.angulatum*. (b), *B.suis*, *B.thermophilum*, *B.choerinum*, *B.boum*. (c), *B.breve* NCFB 2257, *B.infantis*, *B.longum*. (d), *B.indicum*, *B.asteroïdes*. (e), *B.animalis*, *B.breve* DSM 20213, *B.magnum*, *B.globosum*, *B.pseudolongum*. (f), *B.subtile*.

Tableau 29.: Caractérisation des souches appartenant aux groupes "humains".

tests	Sous-groupes	% de souches positives									
		Ia n=2* (a)**	Ib n=4 (b)	Ic n=12 (c)	Id n=2 (d)	IIIa1 n=6 (e)	IIIa2 n=4	IIIa3 n=8	IIIb1 n=10 (f)	VIIa n=4	VIIb n=4
<b>Tests enzymatiques</b>											
L-aspartate arylamidase		0	25	0	0	100	100	100	100	100	100
L-alanine arylamidase		0	0	0	0	83	100	88	100	0	75
L-méthionine arylamidase		0	0	0	0	83	0	88	70	0	0
$\alpha$ -L-glutamyl-L-histidine arylamidase		0	0	0	0	0	0	0	60	0	50
L-histidine-L-leucyl-L-histidine arylamidase		0	75	0	0	83	75	100	90	25	100
L-lysyl-L-alanine arylamidase		0	0	25	100	33	100	75	50	0	0
L-prolyl-L-arginine arylamidase		0	50	0	0	0	25	88	80	0	25
Estérase C4		100	100	67	0	83	100	100	100	0	0
Estérase C6		100	100	67	0	100	100	100	100	0	25
Estérase C10		0	0	17	0	50	25	0	30	0	0
$\alpha$ -galactosidase		100	50	100	100	100	100	100	90	0	25
$\beta$ -galactosidase		100	75	100	100	83	100	100	100	0	50
$\alpha$ -arabinosidase		50	75	100	50	17	100	100	100	0	0
$\beta$ -glucosidase		100	100	92	100	83	100	100	10	0	0
$\beta$ -lactosidase		100	25	83	100	50	100	88	10	0	0
<b>Acidification des carbohydrates</b>											
L-Arabinose		0	100	100	0	0	25	75	90	100	100
D-Xylose		0	75	100	0	0	25	88	80	0	50
Mannose		50	0	83	0	67	0	0	10	0	50
Mannitol		50	0	83	0	83	25	0	0	0	0
Sorbitol		100	100	17	100	83	100	100	0	0	0
$\alpha$ -Méthyl-glucoside		0	0	75	0	0	0	0	0	0	0
Amygdaline		50	100	100	100	100	100	100	0	0	0
Arbutine		0	100	100	100	17	75	100	0	0	0
hydrolyse de l'Esculine		100	100	100	50	100	50	88	0	25	50
Salicine		0	100	100	50	0	50	88	0	0	0
Tréhalose		0	0	75	0	0	0	38	0	0	0
Mélézitose		0	0	58	0	0	0	0	40	100	100
Amidon		0	100	100	50	67	50	75	0	0	0
Glycogène		0	100	100	50	100	50	88	0	0	0

\* n, Nombre de souches.

\*\* liste de souches type appartenant à chaque groupe: (a), *B. catenulatum*; (b), *B. pseudocatenulatum*;

(c), *B. dentium*, (d), *B. adolescentis*; (e), *B. breve* NCFB 2257; (f), *B. infantis*, *B. longum*;

Tableau 30: Caractérisation des souches appartenant aux groupes "animaux" et aux eaux usées.

Tests	Sous-groupes	% de souches positives											
		IIa n=3*	IIb n=4 (a)**	IIc n=25	IId n=3	IIe n=2	IIf n=7 (b)	IV n=4 (c)	Va n=6 (d)	Vb n=2 (e)	Vc n=9 (f)	Vd n=3	VI n=2 (g)
Tests enzymatiques													
L-tyrosine arylamidase		100	100	36	0	0	0	75	100	100	100	100	100
L-alanine arylamidase		100	100	100	100	100	14	100	100	100	100	100	0
Glycyl-phénylalanine arylamidase		100	25	28	0	0	0	50	83	100	78	33	0
Leucyl-glycine arylamidase		100	100	100	100	100	14	100	100	0	89	0	0
L-séryl-tyrosine arylamidase		100	100	16	0	0	0	75	100	50	100	67	0
L-serine arylamidase		100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100
L-tryptophane arylamidase		67	100	52	67	0	0	75	100	50	89	33	0
N-CBZ-glycyl-glycyl arginine arylamidase		0	100	4	0	0	0	0	17	0	22	0	0
β-alanine arylamidase		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100
L-alanyl-L-phénylanyl-L-proline arylamidase		100	100	92	100	50	100	100	100	0	78	100	50
L-histidyl-L-leucyl-L-histidine arylamidase		100	100	100	100	0	43	100	100	100	100	100	0
L-histidyl-L-sérine arylamidase		0	50	8	33	0	0	0	100	0	67	100	0
L-leucyl-L-alanine arylamidase		100	100	36	33	0	0	100	100	100	100	100	0
L-phénylanyl-L-arginine arylamidase		100	100	52	100	50	0	25	100	100	100	100	0
L-valyl-L-tyrosyl-L-sérine arylamidase		0	0	29	0	58	0	0	33	100	89	0	0
N-CBZ-arginyl-4-méthoxy arylamidase		0	100	4	0	0	0	0	0	0	11	0	0
L-lysyl-L-sérine-4-méthoxy arylamidase		67	50	0	0	0	0	0	100	0	11	0	0
β-glucosidase		100	100	100	100	100	100	100	100	50	89	100	0
Acidification des carbohydrates													
L-Arabinose		0	25	0	0	0	0	25	17	100	67	0	0
Ribose		0	25	0	0	0	0	50	67	0	11	33	100
D-Xylose		33	25	0	0	0	0	0	0	100	33	0	0
Galactose		67	100	80	100	0	86	75	83	100	67	0	100
Sorbitol		0	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	100
Amygdaline		0	0	100	100	100	100	100	17	0	0	0	0
Arbutine		0	0	12	0	100	0	75	0	0	0	0	0
Lactose		76	100	0	71	100	100	100	67	100	78	0	50
Mélibiose		100	100	100	100	100	100	50	83	0	100	100	100
Amidon		100	100	100	0	50	100	25	0	0	89	0	100
Glycogène		100	100	96	0	100	100	25	33	0	78	0	100
Croissance à 46°C en 48 h		100	75	88	0	0	100	25	17	0	11	0	50

\* n, Nombre de souches

\*\* liste des souches type appartenant à chaque groupe: (a), *B. suis*; (b), *B. thermophilum*;

(c), *B. indicum*, *B. asteroides*; (d), *B. breve* DSM 20213, *B. animalis*; (e), *B. magnum*;

(f), *B. pseudolongum*, *B. globosum*; (g), *B. subtile*;

### 3.2.3.2. Groupes contenant des souches d'origine animale ou d'eaux usées

#### Groupe II

Il comprend 48 souches principalement isolées de fèces de porcs dont seulement 24% se retrouvent dans des sous-groupes contenant des souches de collection. Il se subdivise en 6 sous-groupes dont 3 ne comprennent aucune souche de collection (IIa, IIc, IIe). Les sous-groupes IIa, IIb, IIc, et IIe dont l'effectif est de 3, 4, 25 et 3 souches respectivement sont caractérisées par des germes isolés de fèces de porcs et d'eaux. Seules 3 souches s'agrègent avec *B.suis* DSM 20211<sup>T</sup> (sous-groupe IIb), 5 avec *B.thermophilum* DSM 20210<sup>T</sup> et ATCC 25866 (sous-groupe IIc) nommée lors de sa description "*B.ruminale*" par Scardovi *et al.*(1969). Ce dernier sous-groupe (IIc) comprend des souches sauvages isolées de matières fécales de divers animaux de fermes (chevaux, porcs et poule). Une souche de collection d'origine humaine *B.adolescentis* ATCC 15706 est incluse dans le sous-groupe IIe avec des souches sauvages provenant de fèces de porc alors que les 2 autres souches de collection de cette espèce incluse dans l'analyse se retrouvent dans le groupe I. Etant donné la nette la séparation des souches humaines et animales, la situation de cette souche sur le dendrogramme est discutable. Vingt-deux souches d'origine porcine s'agrègent dans le sous-groupe IIc et 2 dans le sous-groupe IIe. Zani *et al* (1974) ont isolé l'espèce *B.suis* (identifiée par les techniques d'hybridation ADN-ADN) dans 77% des échantillons de matières fécales de porcs. Dans notre analyse, le sous-groupe IIb comprend seulement 2 souches d'origine porcine agrégées avec *B.suis*<sup>T</sup>. Les 25 souches du sous-groupe IIc forment un groupe homogène pour l'acidification des carbohydrates et sur le plan phénotypique se distinguent par leur incapacité à fermenter le lactose, caractère que l'on ne retrouve pas parmi les souches du groupe comprenant *B.suis*<sup>T</sup>.

L'étude de leur relation génomique avec *B.suis* par hybridation ADN-ADN pourra apporter plus d'information concernant ces souches. Les 3 sous-groupes (IIa, IIe et IIc) qui ne contiennent aucune souche de collection se distingue des autres sous-groupes par leurs profils d'acidification et enzymatiques (tableau 30). Les souches des sous-groupes IIe et IIc se différencient par leur incapacité à se développer à 46°C. *B.boum* ATCC 27917<sup>T</sup> et *B.choerinum* ATCC 27686<sup>T</sup> qui appartiennent au group II sont non classées. Aucune souche sauvage appartenant à ces espèces n'a été isolée des matières fécales animales.

Groupe V

il comprend 10 souches de collection et 12 souches sauvages provenant de fèces de poule, rat, lapin, porc, veau, mouton, vache, chèvre, eau usée urbaine et rivières qui sont réparties en 4 sous-groupes (Va à Vd). Le sous-groupe Va (5 souches) contient 3 souches sauvages d'eaux de surface ou d'eau usées, *B.animalis* (ATCC 25627<sup>T</sup> et ATCC 27536) qui présentent 99% d'homologie ADN-ADN (Scardovi et al, 1974) ainsi que la souche type *B.breve* DSM 20213. De nouveau, nous nous trouvons confronté à un problème de validité des souches puisque les 2 souches types de *B.breve* qui proviennent de collection différentes non seulement ne s'agrègent pas mais en plus se retrouvent dans des groupes dissemblables sur le plan phénotypique.

Le sous-groupe Vb, qui comprend des souches isolées de veau et de mouton, se rapproche phénotypiquement du sous-groupe Vc. Celui contient *B.magnum* DSM 20222<sup>T</sup> et ATCC 27682 isolés de fèces de lapins qui présentent un taux d'homologie ADN-ADN de 75% (Scardovi et Zani, 1974). Le sous-groupe Vc contient 9 souches provenant de rumen de bovin, de matières fécales de lapin, de porc, de veau, de mouton ou de poule. Les souches de *B.globosum* ATCC 25865<sup>T</sup>, ATCC 25864 et *B.pseudolongum* ATCC 25526<sup>T</sup>, DSM 20095 et DSM 20094 s'agrègent dans ce sous-groupe avec des souches sauvages isolées de fèces de veaux et de moutons. Contrairement à Zani et al (1974) qui a identifié *B.globosum* et *B.pseudolongum* dans 41% d'échantillons de fèces de porcs, nous ne retrouvons pas de souches d'origine porcine s'agréant avec ces 2 espèces dans notre analyse.

Groupe IV

il se résume à 4 souches dont 2 de collection isolées d'abeilles (*B.indicum* ATCC 25912<sup>T</sup>, *B.asteroides* DSM 20089<sup>T</sup>) et 2 souches sauvages provenant d'eau de surface et de poule.

Groupe VI

constitué par les souches de collection *B.subtile* ATCC 27537<sup>T</sup> et ATCC 27683, il se sépare malgré son faible effectif des groupes "humains et "animaux". Ce résultat confirmerait la validité de cette espèce qui pourtant se limite à la description de 5 souches isolées d'eaux usées urbaines (Scardovi et Trovatielli, 1974). D'après notre analyse, il n'est toujours pas possible de déterminer l'origine humaine ou animale de ces germes.



Quelques souches de collection ne se sont classées dans aucun groupe: *B.minimum* ATCC 27538<sup>T</sup> (isolée d'eau usée urbaine), 2 souches d'origine humaine (*B.gallicum* DSM 20093<sup>T</sup> et *B.bifidum* DSM 20082) ainsi que 4 souches d'origine animale (*B.pullorum* DSM 20433<sup>T</sup>, *B.gallinarum* ATCC 33777<sup>T</sup>, *B.cuniculi* ATCC 27916<sup>T</sup>, *B.coryneforme* ATCC 25911<sup>T</sup>).

En conclusion, les souches d'origine humaine (groupes I, III, VII) se différencient nettement sur la base des 114 caractères biochimiques codés dans l'analyse numérique, des souches d'origine animale (groupes II, IV, V) à l'exception de 2 souches de collection (*B.adolescentis* ATCC 15706 et *B.breve*<sup>T</sup> DSM 20213) dont la validité pourrait être remise en cause.

Quant aux germes isolés du milieu aquatique, ils se retrouvent indifféremment répartis dans les groupes humains et animaux.

#### 3.2.4. Approche génomique concernant le groupe IIc

L'espèce la plus abondante dans les fèces de porcins est *B.suis* (Zani et al., 1974). Pourtant, seulement 3 souches parmi les 36 isolées de matières fécales de porcs se sont agrégées avec la souche type de *B.suis* alors que la majorité des bifidobactéries ayant la même origine a formé un groupe homogène sur le plan phénotypique.

Nous avons effectué une première approche génomique afin d'évaluer les relations existant entre ce groupe de germes et *B.suis*. Nous avons hybridé par la technique de renaturation optique *B. suis*<sup>T</sup> (DSM 20211) avec 4 souches du groupe IIc (la centrotypé CUETM 90/86, une souche proche sur le plan phénotypique de ce germe CUETM 90/82, et deux souches éloignées de la centrotypé, 90/49 et 90119).

Les taux de Guanine+ Cytosine (GC%) obtenu pour les souches du groupe II étudiées (CUETM 90/86: 57,6%; CUETM 90/82: 57,4%; CUETM 90/49: 57,2%; CUETM 90/119: 57,7%) correspondent bien aux valeurs de GC% des différentes espèces du genre *Bifidobacterium* qui

varient de 55 à 67 (Scardovi, 1986; Lauer, 1989), la valeur de GC% de la souche type de *B. suis* étant de 62% selon Matteuzzi *et al.* (1971).

Les hybridations, réalisées une fois par couple d'ADN apportent les indications suivantes.

couples d'ADN hybridés	pourcentage d'hybridation
<i>B. suis</i> <sup>T</sup> et CUETM 90/86	78
<i>B. suis</i> <sup>T</sup> et CUETM 90/82	76
<i>B. suis</i> <sup>T</sup> et CUETM 90/49	61
<i>B. suis</i> <sup>T</sup> et CUETM 90/119	64
CUETM 90/86 et CUETM 90/82	84
CUETM 90/86 et CUETM 90/49	69

Bien que ces résultats ne soient qu'indicatifs, il en ressort que les souches 90/86 (centrotype du groupe IIc) et CUETM 90/82 sont proches sur le plan génomique de *B. suis*<sup>T</sup>. Les pourcentages d'hybridation étant supérieurs à 75%, l'appartenance de ces germes à cette espèce sera sans doute confirmée par la suite. En revanche les souches CUETM 90/49 et CUETM 90/119 présentent avec *B. suis*<sup>T</sup> des pourcentages d'hybridation compris entre 60 et 65%, valeurs critiques puisqu'actuellement, seules les souches présentant des valeurs d'hybridation supérieures à 70% sont considérées comme appartenant à la même espèce. Nos résultats indiquent que le groupe IIc n'est pas homogène sur la plan génomique ce que pourra confirmer une étude plus approfondie des souches (hybridations supplémentaires).

### 3.2.5. tests d'identification de l'origine (humaine et animale) des bifidobactéries.

A partir des résultats obtenus avec l'analyse numérique nous avons recherché les tests biochimiques les plus discriminants permettant de différencier l'origine des souches issues du milieu aquatique.

### 3.2.5.1. Tests de température

La croissance à 46°C a été retenue dans un premier temps parce qu'aucune souche d'origine humaine ne s'est développée dans ces conditions de culture. Cependant parmi les germes animaux, certains notamment dans le groupe V ne se sont pas multipliés non plus à cette température. Il convenait de choisir une température de croissance capable de retenir le maximum de souches appartenant à l'une ou l'autre des 2 origines avec un minimum de temps de culture. Aussi avons nous étudié le développement des souches incluses dans l'analyse sur une période de 48 heures pour des températures allant de 42°C à 47°C.

La croissance de chaque souche à ces différentes températures est présentée dans l'annexe 9. Les résultats globaux sont reportés dans le tableau 31.

Tableau 31: Différenciation des souches d'origine humaine ou animale selon leur croissance à différentes températures.

	souches sauvages		souches de collection	
	origine humaine	origine animale*	origine humaine	origine animale*
nombre de souches étudiées	41	56	14	17
pourcentage de souches se développant en 48 heures à				
43°C	41%	100%	66%	100%
44°C	5%	96,5%	22%	94%
45°C	0%	96,5%	22%	76%
46°C	0%	61%	0%	50%

\* animaux homéothermes

La température de 46°C se révèle trop inhibitrice vis à vis des bifidobactéries d'origine animale puisqu'elle élimine 39% des souches sauvages et la moitié des souches de collection. En revanche, la plupart des souches humaines se sont développées à 43°C. Les températures les plus discriminantes sont 44 et 45°C. Nous avons finalement opté pour une température de 45° C pour laquelle aucune souche sauvage d'origine humaine n' a présenté de croissance. Seules, les souches

de collection *B.catenulatum* ATCC 27539<sup>T</sup> et *B.pseudocatenulatum* DSM 20438<sup>T</sup> *B.catenulatum* ATCC 27675, ATCC 27676, *B.pseudocatenulatum* DSM 20439 se sont multipliées à cette température. Deux souches sauvages (isolées de fèces de porc et de chien) et 3 souches de référence (*B.magnum* DSM 20222<sup>T</sup> et ATCC 27682) et *B.globosum* (ATCC 25864 et ATCC 25865<sup>T</sup>) ne se sont pas développées à cette température.

La croissance à 45°C n'étant pas suffisante pour distinguer l'origine des souches, nous avons sélectionné des tests biochimiques discriminants (tableau 32).

#### 3.2.5.2. Tests biochimiques

Parmi les tests les plus discriminants, 3 ont été retenus.

Le sorbitol dont la fermentation permettait selon Mara et Oragui (1986) de différencier l'origine des bifidobactéries a été retenu parce qu'aucun germe d'origine animale ne fermente ce carbohydrate dans notre analyse contrairement à la plupart des bifidobactéries humaines (notamment les bactéries agrégées aux souches de collection de *B.breve* et du complexe *B.adolescentis*). Ajouté au test de culture à 45°C, le test "sorbitol" permet de différencier les souches de *B.catenulatum* et *B.pseudocatenulatum* des souches animales. Néanmoins, comme certaines espèces d'origine humaine (*B.infantis*, *B.longum*) ne fermentaient pas ce carbohydrate, 2 tests de fermentation ont été ajoutés. Les 4 tests sélectionnés sont donc:

- croissance à 45°C en 48 heures;
- fermentation du sorbitol;
- fermentation du D xylose;
- fermentation du mélézitose

Les proportions de réponses positives obtenues pour chaque groupe défini par l'analyse numérique sont reportées dans le tableau 32.

Tableau 32: Tests de différenciation des souches d'origine humaine et animale: pourcentage de réponses positives

	IIa	IIb	IIc	IId	IIe	IIf	IV	Va	Vb	Vc	Vd	VI	Ia	Ib	Ic	Id	IIIa1	IIIa2	IIIa3	IIIb1	VIIa	VIIb
effectif du groupe	3	4 (a)	25	3	2	7 (b)	4 (c)	6 (d)	2 (e)	9 (f)	3	2 (g)	4 (h)	12 (i)	2 (j)	2 (k)	6 (l)	4	8	10 (m)	4	4
origine	ANIMALE											?	HUMAINE									
Sorbitol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	17	100	100	83	100	100	0	0	0
Mélézitose	0	0	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	58	0	0	0	0	0	40	100	100
D-xylose	33	25	0	0	0	0	0	0	100	33	0	0	75	100	0	0	0	25	88	80	0	50
Croissance à 45°C en 48h	100	100	100	33	100	100	25	33	0	78	100	100	25	0	0	50	0	0	25	0	0	0

(a) *B. suis*<sup>T</sup> - (b) *B. thermophilum*<sup>T</sup> - (c) *B. asteroïdes*<sup>T</sup> et *B. indicum*<sup>T</sup> - (d) *B. breve*<sup>T</sup> DSM 20213 et *B. animalis*<sup>T</sup> - (e) *B. magnum*<sup>T</sup> - (f) *B. globosum*<sup>T</sup> - (g) *B. subtile*<sup>T</sup> - (h) *B. pseudocatenulatum*<sup>T</sup> - (i) *B. dentium*<sup>T</sup> - (j) *B. adolescentis*<sup>T</sup> - (k) *B. catenulatum*<sup>T</sup> - (l) *B. breve*<sup>T</sup> NCFB 2257 - (m) *B. infantis*<sup>T</sup> et *B. longum*<sup>T</sup> (group IIIb1)

Nous proposons le schéma d'identification présenté dans le tableau 33:

Tableau 33: Tests discriminants permettant de différencier l'origine des souches de bifidobactéries.

croissance à 45°C	sorbitol	mélézitose	D xylose	ORIGINE
+	-			<b>animale</b>
+	+			<b>humaine</b>
-	+			<b>humaine</b>
-	-	+	+	<b>humaine</b>
-	-	-	+	<b>humaine</b>
-	-	-	-	<b>animale</b>

Nous avons développé cet ensemble de 4 tests afin de l'appliquer à des environnements typiquement humains ou animaux.

### **3.3. APPLICATION DES TESTS MIS AU POINT A DES ENVIRONNEMENTS HUMAINS OU ANIMAUX.**

Nous avons effectué une campagne de prélèvements afin d'appliquer les différentes méthodes (techniques miniaturisées de dénombrement des streptocoques fécaux et de *E.coli*, et recherche des bifidobactéries) sur des échantillons d'origine humaine (eaux usées brutes urbaines) et d'origine animale (eaux de rejet d'abattoirs).

#### **Echantillonnage**

La nature des 25 échantillons est décrite en annexe 10.

#### **9 prélèvements d'origine humaine:**

7 échantillons provenaient d'eaux usées brutes de stations d'épuration reliées à des lotissements telles les station d'Attiches, Gondécourt, Phalempin, Pont à Marcq, Morbecque ou à un réseau urbain plus important telles la station de Bailleul et la station de relèvement de Lille. Deux prélèvements ont été effectués à Bailleul dans des fossés à ciel ouvert reliés à des lotissements.

#### **16 prélèvements d'origine animale:**

14 prélèvements ont été réalisés dans des abattoirs de porcins, bovins, volailles, soit au niveau des stations de relèvement (juste avant que le rejet ne rejoigne le réseau), soit à l'intérieur des abattoirs au niveau des chaînes de lavage. Deux prélèvements ont été effectués dans un écoulement de porcherie (à la sortie du bâtiment et 300 m en aval).

#### **Techniques de dénombrement et d'identification.**

##### ***E.coli*:**

- dénombrement sur microplaques 96 puits sur milieu MUG

##### **streptocoques fécaux:**

- dénombrement en microplaque de 96 puits sur le milieu MUD;

- dénombrement des puits TTC-, MUD+ pour la recherche de *S.bovis*;

- repiquage de n puits MUD+ (n compris entre 1 et 10 selon le nombre de puits fluorescents) dans les dernières dilutions;
- identification sur minigalerie

bifidobactéries:

- dénombrement sur le milieu de Beerens par étalement de 0,1 ml de chaque dilution pour les échantillons;
- repiquage de n colonies, (n compris entre 1 et 10 selon le nombre de colonies présentes);
- identification du genre *Bifidobacterium* par la recherche de la F6PPK;
- identification de l'origine des souches à l'aide des 4 tests sélectionnés (croissance à 45°C en bouillon TPY et fermentation du sorbitol, xylose, mélézitose sur des cupules fabriquées par API à notre demande).

Les principaux résultats sont présentés dans le tableau 35.

**3.3.1. Streptocoques fécaux :**

Les résultats des études antérieures ont montré qu'il était possible de détecter la présence de *S.bovis* sur le milieu au MUD, celui-ci se caractérisant par son incapacité à réduire le TTC.

Les puits TTC-, MUD+ ont donc été dénombrés et les souches issues de ces puits ont été identifiées.

Le tableau 34 présente le nombre de puits TTC-, MUD+ ainsi que le nombre total de puits MUD+ obtenus dans les dernières dilutions pour les échantillons humains et animaux.

Tableau 34: Proportion de puits TTC-, MUD+ dans les échantillons d'origine humaine ou animale.

nature des prélèvements	nombre de puits MUD+	nombre de puits TTC-, MUD+	pourcentage de puits TTC-, MUD+
"humaine"	78	9	11%
"animale"	187	41	22%

Bien que la proportion de puits TTC-, MUD+ apparaisse plus élevée pour les échantillons d'origine animale, cette proportion n'est pas significativement différente (au seuil de 5%) de celle observée pour les échantillons d'origine humaine. De plus aucune souche de *S.bovis* n'a été isolée à partir des 50 puits TTC-, MUD+ quelle que soit la nature de l'échantillon.

La composition de la flore dominante issue des puits MUD+ (TTC- et TTC+ confondus) est présentée dans le tableau 35.

*E.faecium* et *E.durans* ont été isolés respectivement dans 96% et 80% des échantillons alors que *E.faecalis* de même que *S.bovis* n'ont été identifiés que dans 2 prélèvements.

Les résultats d'une classification automatique réalisée à partir de la composition des souches isolées dans les puits fluorescents des dernières dilutions montrent qu'il est impossible de séparer les échantillons "animaux" des échantillons "humains"(qui se retrouvent dans les mêmes groupes). Le dénombrement des puits TTC- et l'identification des souches présentes dans les dernières dilutions des microplaques, n'ont donc pas permis de caractériser l'origine des prélèvements.

Contrairement aux données observées pour les matières fécales de bovins et de porcins, *S.bovis* n'a pas été isolé (en particulier à partir des puits TTC-, MUD+) dans les eaux de rejet ou de lavage des abattoirs. Il ne semble pas que l'absence de *S.bovis* soit due à une inhibition du milieu vis à vis de ce germe puisqu'il a été identifié dans 2 échantillons. Il est possible que la brève survie de *S.bovis* explique en partie ses résultats, notamment lorsque les prélèvements ont été effectués en sortie d'abattoirs au niveau des bassins tampon, avant le rejet dans le réseau. Les résultats obtenus soulèvent le problème de l'application des données observées sur les matières fécales à l'environnement. La survie de *S.bovis* serait -elle très faible ? *S.bovis* serait -il plus sensible que les entérocoques au chlore ou d'agents détergents présents dans l'eau de lavage des chaînes d'abattages?

### 3.3.2. Bifidobactéries:

Une classification automatique ayant comme variables les densités de *E.coli*, de streptocoques fécaux et de bifidobactéries a été réalisée sur les 25 prélèvements. Les classes obtenues contiennent à la fois des échantillons "humains" et "animaux".

Tableau 35: densités et distribution des différents indicateurs pour les prélèvements d'origine humaine et animale.

NATURE DU PRELEVEMENT	sigle	densité de <i>E.coli</i> /100ml	densité de streptocoques fécaux /100ml	densité de bifidobactéries /100ml	identification de streptocoques isolés (en %)	pourcentage de souches de bifidobactéries par rapport au nombre total de bifidobactéries repiquées				% de faux positifs repiqués	pourcentage de bifidobactéries au profil	
						45°C+	sorbitol+	xylose+	mélézitose+		"animal"	"humain"
Station d'épuration d' Attiches (EUB)	At	2. 10 <sup>7</sup>	6.5 10 <sup>5</sup>	3. 10 <sup>6</sup>	80 <i>E.faecium</i> 20 <i>E.durans</i>	0	50	83	17	0	17	83
Station d'épuration de Gondécourt (EUB)	G	4,9 10 <sup>6</sup>	2. 10 <sup>5</sup>	8. 10 <sup>5</sup>	60 <i>E.faecium</i> 40 <i>E.durans</i>	0	33	50	17	40	17	83
Station d'épuration de EUB Phalempin (EUB)	Ph	2,8 10 <sup>6</sup>	3. 10 <sup>5</sup>	3. 10 <sup>6</sup>	100 <i>E.faecium</i>	0	71	71	27	12,5	15	85
Station d'épuration de Pont à Marcq (EUB)	Pm	6,7 10 <sup>6</sup>	1,8 10 <sup>6</sup>	3. 10 <sup>6</sup>	75 <i>E.faecium</i> 25 <i>E.sp</i>	0	30	90	20	0	0	100
Station relèvement réseau urbain Lille	H7	1. 10 <sup>7</sup>	8. 10 <sup>5</sup>	1,1 10 <sup>7</sup>	50 <i>E.faecium</i> 50 <i>E.durans</i>	0	37,5	75	12,5	0	12,5	87,5
Station d'épuration de Bailleul (EUB)	H9	4,9 10 <sup>6</sup>	2,1 10 <sup>5</sup>	2,4 10 <sup>6</sup>	67 <i>E.durans</i> 33 <i>E.faecium</i>	25	50	12,5	0	12,5	29	71
Bailleul rejet lotissement fossé à ciel ouvert	H10	1. 10 <sup>7</sup>	5,9 10 <sup>5</sup>	2. 10 <sup>5</sup>	80 <i>E.faecium</i> 20 <i>E.durans</i>	0	17	33	0	17	0	100
Rejet urbain et industriel fossé à ciel ouvert	H11	1. 10 <sup>7</sup>	2,3 10 <sup>5</sup>	4. 10 <sup>5</sup>	80 <i>E.durans</i> 20 <i>E.faecium</i>	0	0	43	14	0	30	70
Station d'épuration de Morbecque (EUB)	H16	5.6 10 <sup>6</sup>	3,5 10 <sup>5</sup>	2. 10 <sup>6</sup>	28,6 <i>E.faecalis</i> 42,9 <i>E.faecium</i> 28,6 <i>E.durans</i>	0	40	70	40	20	12,5	87,5
Abattoirs de Lille	A1	4,6 10 <sup>4</sup>	1,3 10 <sup>3</sup>	< 10 <sup>3</sup>	67 <i>E.faecium</i> 33 <i>E.sp</i>	pas de bifidobactéries isolées						

NATURE DU PRELEVEMENT	sigle	densité de <i>E.coli</i> /100ml	densité de streptocoques fécaux /100ml	densité de bifidobactéries /100ml	identification de streptocoques isolés (en %)	pourcentage de souches de bifidobactéries par rapport au nombre total de bifidobactéries repiquées				% de faux positifs repiqués	pourcentage de bifidobactéries au profil	
						45°C+	sorbitol+	xylose+	mélézitose+		"animal"	"humain"
Abattoirs de Lille tripes de bovins	A2	10 <sup>9</sup>	9.6 10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	89 <i>E.faecium</i> 11 <i>E.durans</i>	50	0	0	0	50	100	0
Abattoir Caby: rigole recevant l'eau de lavage des porcs	A3	2,3 10 <sup>5</sup>	5. 10 <sup>3</sup>	2. 10 <sup>4</sup>	75 <i>E.faecium</i> 12,5 <i>E.durans</i> 12,5 <i>E.sp</i>	33	0	0	22	67	100	0
Abattoir Caby: bassin d'épuration	A4	4,9 10 <sup>6</sup>	4,9 10 <sup>6</sup>	2. 10 <sup>6</sup>	20 <i>E.faecium</i> 80 <i>E.durans</i>	33	11	11	11	22	75	25
Abattoir de Lille: Eau de lavage d'intestin de porcs	A5	2,9 10 <sup>7</sup>	2,2 10 <sup>5</sup>	9. 10 <sup>6</sup>	62,5 <i>E.faecium</i> 25 <i>E.durans</i> 12,5 <i>E.sp</i>	62,5	0	12,5	12,5	12,5	100	0
Station de relèvement de Lille: réseau Abattoir	A6	2. 10 <sup>7</sup>	8,9 10 <sup>5</sup>	1. 10 <sup>7</sup>	100 <i>E.faecium</i>	11	0	33	22	11	50	50
Abattoir de Douai: bassin d'épuration des porcs et bovins	A8	7,9 10 <sup>6</sup>	1,9 10 <sup>6</sup>	5. 10 <sup>6</sup>	67 <i>E.faecium</i>	30	0	40	0	20	43	57
Egout Abattoir de Bailleul (ovins, porcins, bovins)	A15	1,6 10 <sup>7</sup>	2,8 10 <sup>5</sup>	5. 10 <sup>6</sup>	25 <i>bovis</i> 25 <i>E.durans</i> 25 <i>E.sp</i> 25 <i>E.faecium</i>	0	0	0	0	62,5	100	0
Abattoir de Morbecque (volailles)	A17	1,7 10 <sup>7</sup>	3,1 10 <sup>6</sup>	4. 10 <sup>5</sup>	70 <i>E.faecium</i> 20 <i>E.durans</i> 10 <i>E.sp</i>	20	0	0	0	80	100	0

NATURE DU PRELEVEMENT	sigle	densité de <i>E.coli</i> /100ml	densité de streptococoques fécaux /100ml	densité de bifidobactéries /100ml	identification de streptococoques isolés (en %)	pourcentage de souches de bifidobactéries par rapport au nombre total de bifidobactéries repiquées				% de faux positifs repiqués	pourcentage de bifidobactéries au profil	
						45°C+	sorbitol+	xylose+	mélézitose+		"animal"	"humain"
Abattoir d'Hazebrouck: eau de lavage des porcs tripes (+sang)	A18	8,7 10 <sup>7</sup>	3,6 10 <sup>5</sup>	4. 10 <sup>5</sup>	62,5 <i>E.faecium</i> 37,5 <i>E.durans</i>	66	0	0	22	33	100	0
Abattoir d'Hazebrouck: effluent clair	A19	6,2 10 <sup>6</sup>	2,3 10 <sup>4</sup>	2. 10 <sup>5</sup>	57 <i>E.durans</i> 43 <i>E.sp</i>	71	0	0	14	28	100	0
Steenbecque: effluent de porcherie (fossé ciel ouvert)	A20	1. 10 <sup>7</sup>	1,8 10 <sup>6</sup>	1. 10 <sup>6</sup>	50 <i>E.durans</i> 50 <i>E.faecium</i>	22	0	11	0	56	75	25
Steenbecque: effluent de porcherie (fossé ciel ouvert) 300m en aval de la ferme	A21	2,3 10 <sup>6</sup>	7,9 10 <sup>5</sup>	1. 10 <sup>6</sup>	17 <i>E.durans</i> 83 <i>E.faecium</i>	0	0	0	0	43	75	25
Abattoir de St Omer: eau de lavage des porcs	A22	8. 10 <sup>5</sup>	2,3 10 <sup>5</sup>	1. 10 <sup>5</sup>	33 <i>E.durans</i> 37 <i>E.faecium</i>	0	0	22	11	45	100	0
Abattoir de St Omer: eau de lavage des bovins	A23	3. 10 <sup>7</sup>	1,3 10 <sup>5</sup>	2. 10 <sup>6</sup>	33 <i>E.faecium</i> 50 <i>E.durans</i> 16,7 <i>E.sp</i>	0	0	11	0	11	75	25
Abattoir de Steenvoorde bassin tampon (effluent de lavage des porcs)	A24	2,1 10 <sup>7</sup>	3,3 10 <sup>6</sup>	1. 10 <sup>6</sup>	37,5 <i>E.durans</i> 50 <i>E.faecium</i> 12,5 <i>E.faecalis</i>	44	11	11	0	33	83	17

Toutes origines confondues, le rapport *E.coli*/bifidobactéries est supérieur à 1 pour 92% des prélèvements alors que le rapport streptocoques fécaux/bifidobactéries est inférieur à 1 pour 78% des prélèvements.

L'identification de l'origine de la pollution, basée sur un profil restreint de 4 tests a nécessité le repiquage de colonies de bifidobactéries. Le tableau 36 présente les principaux résultats obtenus sur l'ensemble des souches F6PPK+.

Tableau 36: Répartition des souches selon les réponses obtenues avec les tests sélectionnés.

	échantillons "humains"		échantillons "animaux"	
	nombre	%	nombre	%
nombre d'échantillons	9		15	
nombre de souches F6PPK+	63		73	
souches 45°C+	2	3%	34	47%
souches sorbitol +	20	32%	2	3%
souches xylose+	41	65%	15	20%
souches mélézitose+	13	21%	10	13%
souches au profil "humain"*	50	79%	13	18%
souches au profil "animal"*	13	21%	60	82%

\* selon nos critères d'identification (tableau 33).

Parmi les souches provenant de prélèvements animaux, les bifidobactéries qui se sont développées à 45°C représentent près de la moitié des souches F6PPK+ isolées (47%) alors qu'elles sont nettement plus rares (3% des souches F6PPK+ ) dans les prélèvements "humains". La présence de ces souches (45°C+) a été observée dans la plupart des prélèvements d'origine

animale (dans 11 points sur 15). En revanche, aucune souche se développant à 45°C n'a été isolée dans 8 des 9 prélèvements d'origine humaine.

La proportion de souches fermentant le sorbitol parmi les souches "humaines" est assez faible (32% des souches F6PPK+ isolées) mais ne représente que 3% des bifidobactéries "animales" isolées. La présence de souches sorbitol+ a été observée dans 8 des 9 échantillons "humains" et uniquement dans 2 des 15 prélèvements "animaux".

Les souches xylose+ sont plus fréquemment isolées dans les échantillons "humains" mais leur présence a été observée dans plus de la moitié des échantillons "animaux".

Les souches mélézitose + sont plus rares indépendamment de l'origine du prélèvement.

Ces résultats confirment nos précédentes observations: les prélèvements "humains" sont caractérisés par des souches ne se développant pas à 45°C et des souches capables de fermenter le sorbitol alors que les prélèvements "animaux" sont caractérisés pour la plupart par des souches ne fermentant pas le sorbitol et capables de se développer à 45°C.

Lorsque l'on considère la combinaison des 4 tests, l'origine des souches (déduite du tableau 36) semble bien corrélée à la nature du prélèvement puisque 80% des souches F6PPK+ isolées présentent un profil correspondant à la nature de l'échantillon.

Toutefois, la caractérisation des souches d'origine humaine a pu être améliorée par un test de fermentation supplémentaire. En effet, quelques souches provenant d'échantillons "humains" ne se sont pas développées à 45°C et n'ont fermenté aucun carbohydrate. Elles ont donc donné, d'après nos critères, un profil "animal". Or, *B.bifidum*, espèce humaine, (représenté uniquement par une souche de collection dans l'analyse numérique) ne fermente aucun des 3 carbohydrates sélectionnés (Biavati *et al.*, 1982; Mitsuoka, 1984; Scardovi, 1986). Les souches de *B.bifidum* peuvent néanmoins être facilement différenciées des 27 autres espèces de bifidobactéries par leur incapacité à fermenter certains carbohydrates tel le raffinose.

La fermentation du raffinose a été étudiée sur les souches qui ont répondu négativement aux 4 tests. Le pourcentage de souches au profil "humain" est ainsi passé de 79% à 97% pour les échantillons d'origine humaine tout en restant inchangé (18%) pour les échantillons d'origine animale.

Une analyse factorielle discriminante a été réalisée sur 23 lieux de prélèvements et 5 variables. Le point A1 pour lequel aucune bifidobactérie n'a été isolée et le point A21 dont la nature peut être remise en cause (fossé en aval d'une ferme et non rejet d'abattoir) n'ont pas été pris en compte.

Les variables retenues étaient le pourcentage des souches repiquées F6PPK- (considérées comme faux positifs) et le pourcentage de souches F6PPK+ (45°C+, sorbitol+, xylose+ ou mélézitose+)

Trois groupes ont pu être différenciés (fig 4) :

**groupe 1:** constitué par tous les échantillons d'origine humaine. Il est caractérisé par:

un taux faible de faux positifs

un taux relativement élevé de souches sorbitol+

“ “ xylose+

un taux très faible de souches se développant à 45°C

un taux très faible de souches mélézitose+

**groupes 2 et 3:** constitués par les échantillons d'origine animale (rejet de chaînes d'abattage de porcs pour le groupe 2 et rejets de chaînes d'abattage de porcs, bovins, volailles pour le groupe 1).

Ils sont caractérisés par :

un taux élevé de faux positifs

un taux relativement élevé de souches se développant à 45°C

un taux faible de souches sorbitol+

“ “ xylose+

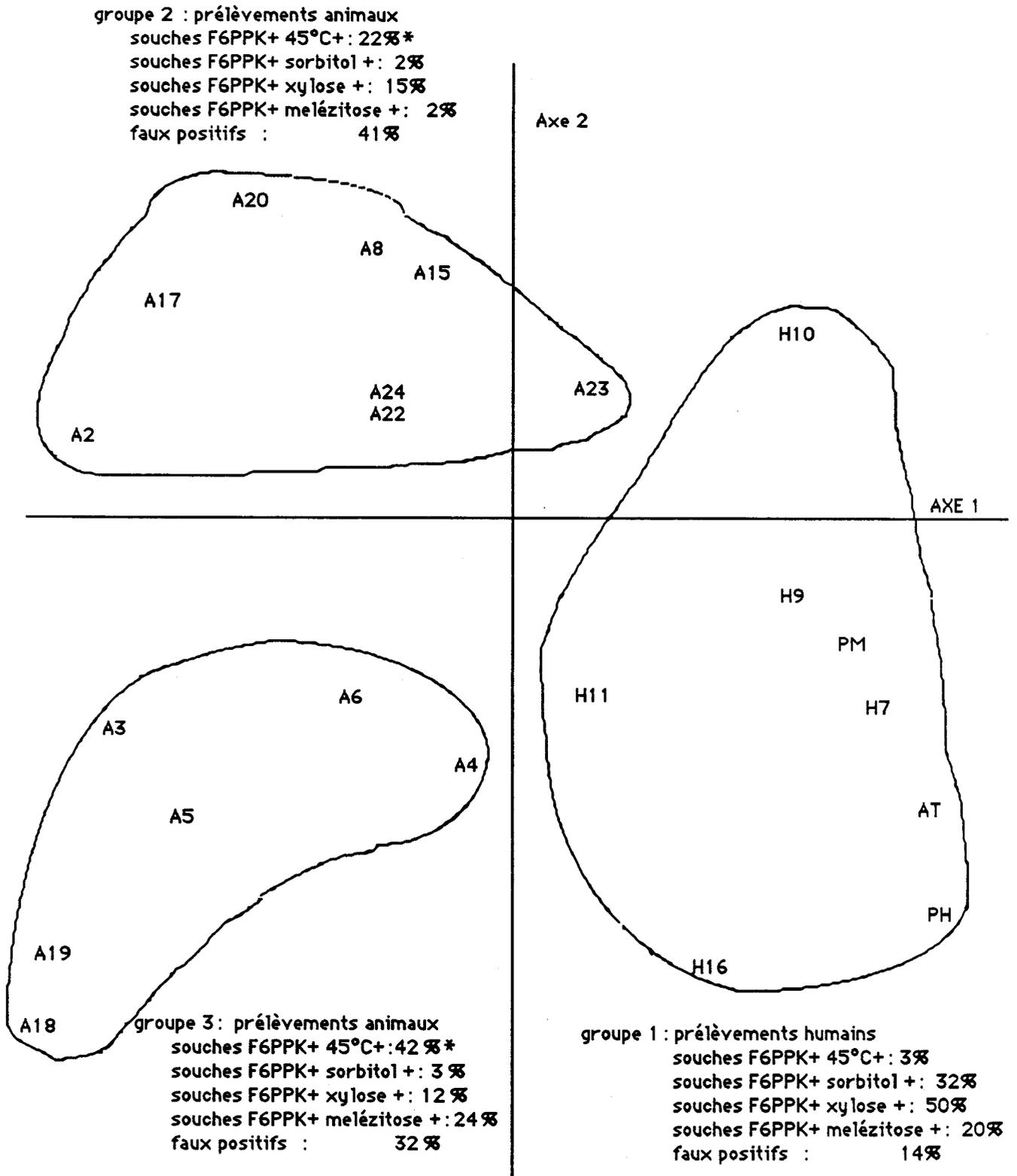
un taux très faible de souches mélézitose+

ces deux groupes se différencient essentiellement par une proportion de souches 45°C+ (plus élevée dans le groupe 2).

Le pourcentage élevé de faux positifs pour les échantillons d'origine animale confirme nos précédents résultats obtenus sur les matières fécales animales et apparaît même comme un facteur discriminant.

En revanche, la fermentation du mélézitose ne semble pas caractéristique des souches humaines ou animales et la fermentation du xylose paraît corrélée à celle du sorbitol.

fig 4: analyse discriminante: caractérisation des prélèvements.



Une partie des souches (72) isolées de ces différents environnements a été incluse dans une analyse numérique réalisée sur les 49 tests de fermentation API, avec les souches types de bifidobactéries. Nous avons comparé l'origine que nous avons déduite de chaque souche à partir de notre système d'identification (en tenant compte des résultats obtenus pour le raffinose) et l'emplacement de ces germes dans le nouveau dendrogramme. Les résultats obtenus montrent que les souches supposées d'origine humaine se séparent dans l'ensemble des souches supposées d'origine animale.

### **En résumé**

Les méthodes uniquement quantitatives, basées sur le dénombrement des germes indicateurs (*E.coli*, streptocoques fécaux et bifidobactéries) ou sur le dénombrement des puits TTC-, MUD+ n'ont pas permis de caractériser l'origine des prélèvements.

L'identification des streptocoques fécaux n'a apporté ici aucune information sur la nature des échantillons (à l'exception de 2 échantillons animaux pour lesquels *S.bovis* a été isolé).

Les résultats obtenus sur les bifidobactéries ont été satisfaisants puisque les prélèvements effectués sur des réseaux d'égouts d'abattoirs sont caractérisés par une majorité de souches correspondant à une origine animale, alors que les échantillons réalisés dans des eaux usées urbaines sont constitués principalement de bifidobactéries présentant d'après nos critères un profil humain.

#### 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 Tétrazodium 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
+	-				<b>animale</b>
+	+				<b>humaine</b>
-	+				<b>humaine</b>
-	-	+	+		<b>humaine</b>
-	-	-	+		<b>humaine</b>
-	-	-	-	+	<b>animale</b>
-	-	-	-	-	<b>humaine</b>

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.

**5. BIBLIOGRAPHIE**

- 1 ABSHIRE, R. & GUTHRIE, R.K. 1971. The use of fluorescent antibody techniques for detection of *Streptococcus faecalis* as an indicator of fecal pollution of water. Water Research. Pergamon Press. 5: 1089-1097.
- 2 BAGLEY, S.T., SEIDLER, R.J. & BRENNER, D.J. 1981. *Klebsiella planticola* sp. nov., a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. Current Microbiology. 6: 105-109.
- 3 BARBE, G. 1973. Les streptocoques fécaux des eaux de rivières (étude de leur présence, de leur dénombrement, et des espèces présentes dans ces eaux). Thèse.
- 4 BARCINA, I., GONZALES, J.M., IRIBERRI, J. & EGEA, L. 1990. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. Journal of Applied Bacteriology . 68: 189-198.
- 5 BARROW, G.I. 1977. Bacterial indicators and standards of water quality in Britain. p. 289-336. In W.W Hoadley and B.J Dutka (ed.), Bacterial indicators/health hazards associated with water. American Society for Testing and Materials, Philadelphia .
- 6 BAUDOIN, E.C. & LITSKY, W. 1981. Fecal streptococci. p. 77-99. In Pollution and Technology/Membrane filtration, Applications, Techniques and problems. ed. Dutka B.J .
- 7 BEERENS, H. 1990. An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. Letters in Applied Microbiology. 11 : 155-157.
- 8 BENNO, Y., ENDO, K., MIZUTANI, T., NAMBA, Y., KOMORI, T. & MITSUOKA, T. 1989. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. Applied and Environmental Microbiology. 55: 1100-1105.
- 9 BESNIER, J.M., LEPORT, C., BURE, A . & VILDE, J.L. 1990. Vancomycin-Aminoglycoside combinations in therapy of endocarditis caused by *Enterococcus* species and *Streptococcus bovis*. European Journal of Clinical Microbiology. Infections Diseases . 9: 130-132.
- 10 BETTELHEIM, K. A. 1978. The sources of 'OH' serotypes of *Escherichia coli*. Journal of Hygiene Cambridge. 80: 83-113.
- 11 BIAVATI, B. . & MATTARELLI, P. 1991. *Bifidobacterium ruminantium* sp. nov. and *Bifidobacterium merycicum* sp. nov. from the rumens of cattle. International Journal of Systematic Bacteriology. 41: 163-168.
- 12 BIAVATI, B., SCARDOVI, V . & MOORE, W. E. C. 1982. Electrophoretic patterns of proteins in the genus *Bifidobacterium* and proposal of four new species. International Journal of Systematic Bacteriology. 32: 368-373.

- 13 BIAVATI, B., CASTAGNOLI, P., CROCIANI, F. & TROVATELLI, L. D. 1984. Species of the *Bifidobacterium* in the feces of infants. *Microbiologica*. 7: 341-345.
- 14 BOUVET, O.M.M., GRIMONT, P.A.D., RICHARD, C., ALDOVA, E., HAUSNER, O. & GABRHELOVA, M. 1985. *Budvicia aquatica* gen. nov., sp. nov. : a hydrogen sulfide-producing member of the *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 35: 60-64.
- 15 BREED, R.S. & NORTON, J.F. 1937. Nomenclature for the colon group. *American Journal of Public Health*. 27: 560-563.
- 16 BRENNER, DON J., McWHORTER, A.C., KAI, A., STEIGERWALT, A.G. & FARMER III, J.J. 1986. *Enterobacter asburiae* sp. nov., a new species found in clinical specimens, and reassignment of *Erwinia dissolvens* and *Erwinia nimipressuralis* to the genus *Enterobacter* as *Enterobacter dissolvens* comb. nov. and *Enterobacter nimipressuralis* com. nov. *Journal of Clinical Microbiology*. 23: 1114-1120.
- 17 BRENNER, D.J., DAVIS, B.R., STEIGERWALT, A.G., RIDDLE, C.F., McWHORTER, A.C., ALLEN, S.A., FARMER III, J.J., SAITOH, Y. & FANNING, G.R. 1982. Atypical biogroups of *Escherichia coli* found in clinical specimens and description of *Escherichia hermanii* sp.nov. *Journal of Clinical Microbiology*. 15: 703-713.
- 18 BRENNER, D.J., RICHARD, C., STEIGERWALT, A.G., ASBURY, M.A. & MANDEL, M. 1980. *Enterobacter gergoviae* sp.nov. : a new species of *Enterobacteriaceae* found in clinical specimens and the environment. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30: 1-6.
- 19 BRENNER, D.J., McWHORTER, A.C., LEETE KNUTSON, J.K. & STEIGERWALT, A.G. 1982. *Escherichia vulneris*; a new species of *Enterobacteriaceae* associated with human wounds. *Journal of Clinical Microbiology*. 15: 1133-1140.
- 20 BUESCHKENS, D.H. & STILES, M.E. 1984. *Escherichia coli* Variants for gas and indole production at elevated incubation temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 48: 601-605.
- 21 CABELLI, V.J. 1978. Obligate anaerobic bacterial indicators. p.171-200. In *Indicators of viruses in water and food*. ed. Berg.G.
- 22 CARRILLO, M., ESTRADA, E. & HAZEN, T.C. 1985. Survival and enumeration of the fecal indicators *Bifidobacterium adolescentis* and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Applied and Environmental Microbiology*. 50: 468-476.
- 23 COLLINS, M.D., FARROW, J.A.E. & JONES, D. 1986. *Enterococcus mundtii* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 36: 8-12.

- 24 COLLINS, M.D., JONES, D., FARROW, J.A.E., KILPPER-BÄLZ, R. & SCHLEIFER, K.H. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E.casseliflavus* nom. rev., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E.galinarum* comb. nov.; and *E.malodoratus* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 34: 220-223.
- 25 COLLINS, M.D, FACKLAM, R.R, FARROW, J.A.E & WILLIAMSON, R. 1989. *Enterococcus raffinosus* sp. nov., *Enterococcus solitarius* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. FEMS Microbiology Letters. 57: 283-288
- 26 CROCIANI, F., BIAVATI, B., CASTAGNOLI, P. & MATTEUZI, D. 1984. Anaerobic ureolytic bacteria from caecal contents and soft faeces of rabbit. Journal of Applied Bacteriology. 57: 83-88.
- 27 CROUCHER, S. C., HOUSTON, A.P., BAYLISS, C.E. & TURNER, R.J. 1983. Bacterial populations associated with different regions of the human colon wall. Applied and Environmental Microbiology. 45: 1025-1033.
- 28 DE LEY, J. 1970. Reexamination of the association between melting point, buoyant density and chemical base composition of deoxyribonucleic acid. Journal of Bacteriology. 101: 738-754.
- 29 DE LEY, J., CATTOIR, H. & REYNAERT, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. European Journal of Biochemistry. 12: 133-142.
- 30 DE MAN, J.C. 1975. The probability of most probable numbers. European Journal of Applied Microbiology . 1: 67-78.
- 31 DEIBEL, R.H. 1964. The group D streptococci. American Society for Microbiology. Bacteriological reviews. 28: 330-366.
- 32 DELABRE, M., BIANCHI, A. & VERON, M. 1973. Etude critique des méthodes de taxonomie numérique. Application à une classification des bactéries aquicoles. Annales de Microbiologie. (Institut Pasteur). 124A: 489-506.
- 33 DEVRIESE, L.A., SCHLEIFER, K.H & ADEGOKE, G.O. 1985. Identification of coagulase- negative staphylococci from farm animals. Journal of Applied Bacteriology . 58: 45-55.
- 34 DEVRIESE, L.A., KILPPER-BÄLZ, R. & SCHLEIFER, K.H. 1988. *Streptococcus hyointestinalis* sp.nov. from the gut of swine. International Journal of Systematic Bacteriology. 38: 440-441.
- 35 DEVRIESE, L.A., CEYSSENS, K., RODRIGUES, U.M. & COLLINS, M.D. 1990. *Enterococcus columbae*, a species from pigeon intestines. FEMS Microbiology Letters. 71: 247-252.

- 36 DEVRIESE, L.A., VAN DE KERCKHOVE, A., KILPPER-BÄLZ, R. & SCHLEIFER, K.H. 1987. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 37: 257-259.
- 37 DEVRIESE, L.A., DUTTA, G.N., FARROW, J.A.E., VAN DE KERCKHOVE, A. & PHILLIPS, B.A. 1983. *Streptococcus cecorum* a new species isolated from chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33: 772-776.
- 38 DICKEY, R.S. & ZUMOFF, C.H. 1988. Emended description of *Enterobacter cancerogenus* comb. nov. (formerly *Erwinia cancerogena*). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38: 371-374.
- 39 DONNELLY, L.S. & HARTMAN, P.A. 1978. Gentamicin based medium for the isolation of group D streptococci and application of the medium to water analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 35: 576-581.
- 40 DRASAR, B.S., MONTGOMERY, F. & TOMKINS, A.M. 1986. Diet and faecal flora in three dietary groups in rural northern Nigeria. *Journal of Hygiene Cambridge*. 96: 59-65.
- 41 DUCLUZEAU, R. 1969. Influence de l'espèce zoologique sur la microflore du tractus gastro-intestinal. *Revue d'Immunologie*. 33: 345-384.
- 42 DUFOUR, A.P. 1977. *Escherichia coli*: the fecal coliform. p. 48-58. In W.W Hoadley and B.J Dutka (ed.), *Bacterial indicators/health hazards associated with water*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- 43 DUNCAN, D.W. & RAZZELL, W.E. 1972. *Klebsiella* biotypes among coliforms isolated from forest environments and farm produces. *Journal of Applied Microbiologie*. 24: 933-.
- 44 DUTKA, B.J. & KWAN, K.K. 1978. Comparison of eight media-procedures for recovering faecal streptococci from water under winter conditions. *Journal of Applied Bacteriology*. 45: 333-340.
- 45 EKATAKSIN, C., INAGAKI, Y., HIGAKI, M. & NAKAYA, R. 1987. Fecal flora of Thai residents in Japan; comparison between vegetarians and an omnivore. *Bifidobacteria Microflora*. 6: 55-57.
- 46 EVANS, J.B. 1977. Coagulase positive staphylococci as indicators of potential health hazards from water. p. 126-130. In W.W Hoadley and B.J Dutka (ed.), *Bacterial indicators/health hazards associated with water*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- 47 EVISON, L.M. & MORGAN, S. 1978. Further studies on Bifidobacteria as indicators of faecal pollution in water. *Progress in Water Technology*. 10: 341-350.

- 48 EVISON, L.M. & JAMES, A. 1973. A comparison of the distribution of intestinal bacteria in British and East African water sources. *Journal of Applied Bacteriology*. 36: 109-118.
- 49 EVISON, L. M. & JAMES, A. 1974. *Bifidobacterium* as an indicator of faecal pollution in water. *Progress in Water Technology*. 7: 57-66.
- 50 FALKMAN, R.R. 1972. Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Applied Microbiology*. 23: 1131-1139.
- 51 FARMER, J.J., ASBURY, M.A., HICKMAN, F.W., BRENNER, D.J. & the *Enterobacteriaceae* Study group. 1980. *Enterobacter sakazakii*: a new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 30: 569-584.
- 52 FARMER, J.J., SHETH, N.K., HUDZINSKI, J.A., ROSE, H.D. & ASBURY, M.A. 1982. Bacteremia due to *Cedecea neteri* sp.nov.. *Journal of Clinical Microbiology*. 16: 775-778.
- 53 FARMER III, J.J., FANNING, G.R., HUNTLEY-CARTER, G.P., HOLMES, B., HICKMAN, F.W., RICHARD, C. & BRENNER, D.J. 1981. *Kluyvera*, a new (redefined) genus in the family *Enterobacteriaceae*. Identification of *Kluyvera ascorbata* sp.nov and *Kluyvera cryocrescens* sp.nov in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 13: 919-933.
- 54 FARMER III, J.J., FANNING, G.R., DAVIS, B., O'HARA, C.M., RIDDLE, C., HICKMAN-BRENNER, F.W., ASBURY, M.A., LOWERY III, V.A. & BRENNER, DON J. 1985. *Escherichia fergusonii* and *Enterobacter taylorae*, two new species of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 21: 77-81.
- 55 FARROW, J.A.E., JONES, D., PHILLIPS, B.A. & COLLINS, M.D. 1983. Taxonomic studies on some group D Streptococci. *Journal of General Microbiology*. 129: 1423-1432.
- 56 FARROW, J.A.E. & COLLINS, M.D. 1985. *Enterococcus hirae*, a new species that includes amino acid assay strain NCDO 1258 and strains causing growth depression in young chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 35: 73-75.
- 57 FARROW, J.A.E., KRURE, J., PHILLIPS, B.A., BRAMLEY, A.J. & COLLINS, M.D. 1984. Taxonomic studies on *Streptococcus bovis* and *Streptococcus equinus*. Description of *Streptococcus alactolyticus* sp. nov. and *Streptococcus saccharolyticus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 5: 467-482.
- 58 FEACHEM, R. 1975. An improved role for faecal coliform to faecal streptococci ratios in the differentiation between human and non-human pollution sources. *Water Research*. 9 : 689-690.
- 59 FENG, P.C.S. & HARTMAN, P.A. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 43: 1320-1329.

- 60 FERRAGUT, C., IZARD, D., GAVINI, F., KERSTERS, K., DE LEY, J. & LECLERC, H. 1983. *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 4: 155-294.
- 61 FERRAGUT, C., IZARD, D., GAVINI, F., LEFEBVRE, B. & LECLERC, H. 1981. *Buttiauxella*, a new genus of the family *Enterobacteriaceae*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I Abt. Orig C*. 2: 33-44.
- 62 FURUSE, K., SAKURAI, T., HIRASHIMA, A., KATSUKI, M., ANDO, A. & WATANABE, I. 1978. Distribution of ribonucleic acid coliphages in South and East Asia. *Applied and Environmental Microbiology*. 35: 995-1002.
- 63 GAVINI, F., LEFEBVRE, B. & LECLERC, H. 1976. Positions taxonomiques d'entérobactéries H<sub>2</sub>S- par rapport au genre *Citrobacter*. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)*. 127A: 275-295.
- 64 GAVINI, F., FERRAGUT, C., IZARD, D., TRINEL, P.A., LECLERC, H., LEFEBVRE, B. & MOSSEL, D.A.A. 1979. *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 29: 92-101.
- 65 GAVINI, F., MERGAERT J., BEJI, A., MIELCAREK, C., IZARD, D., KERSTERS, K. & DE LEY, J. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantotea* gen. nov. as *Pantotea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantotea dispersa* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 39: 337-345.
- 66 GELDREICH, E.E. & KENNER, B.A. 1969. Concepts of fecal streptococci in stream pollution. *Journal of Water Pollution Control Federation*. 41: R335-R352.
- 67 GELDREICH, E.E. 1978. Bacterial population and indicator concepts in feces, sewage, stormwater and solid wastes. p. 51-97. In *Indicators of viruses in water and food*. ed. Berg. G. .
- 68 GEORG, L.K., ROBERSTAD, G.W., BRINKMAN, S.A. & HICKLIN, M.D. 1965. A new pathogenic anaerobic Actinomyces species. *Journal of Infectious Diseases*. 115: 88-99.
- 69 GODSEY, J.H., MATTEO, M.R., SHEN, D., TOLMAN, G. & GOLKE, J.R. 1981. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* with microbial enzyme activity profiles. *Journal of Clinical Microbiology*. 13: 483-490.
- 70 GORSE, P. & JANET, C. 1983. Les anti infectieux dans l'élevage. *Recueil de Médecine vétérinaire. Numéro spécial. Conférences de la réunion de Fougères*. p 533-541.
- 71 GRIMONT, P.A.D. 1983. Apport des hybridations ADN/ADN dans la taxonomie des *Enterobacteriaceae*. *Colloque International de Bactériologie, 25-26-27 Mai 1983, Lille*.

- 72 GRIMONT, P.A.D., FARMER III, J.J., GRIMONT, F., ASBURY, M.A., BRENNER, D.J. & DEVAL, C. 1983. *Ewingella americana* gen.nov., a new *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)*. 134 A: 39-52.
- 73 GRIMONT, P.A.D., GRIMONT, F., FARMER III, J.J. & ASBURY, M.A. 1981. *Cedecea davisae* gen. nov. and *Cedecea lapagei* sp.nov., new *Enterobacteriaceae* from clinical specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31: 317-326.
- 74 GRIMONT, P.A.D., GRIMONT, F., RICHARD, C., DAVIS, B.R., STEIGERWALT, A.G. & BRENNER, D.J. 1978. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. nov. (type strain : ICPB 3995) . *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28: 453-463.
- 75 GRIMONT, P.A.D., GRIMONT, F. & STARR, M.P. 1979. *Serratia ficaria* sp. nov., a bacterial species associated with Smyrna figs and the fig wasp *Blastophaga psenes*. *Current Microbiology*. 2: 277-282.
- 76 GRIMONT, P.A.D., IRINO, K. & GRIMONT, F. 1982. The *Serratia liquefaciens* - *S. proteamaculans* - *S. grimesii* complex : DNA relatedness. *Current Microbiology*. 7: 63-68.
- 77 GROSS, K.C., HOUGHTON, M.P. & SENTERFIT, L.B. 1975. Presumptive speciation of *Streptococcus bovis* and other group D streptococci from human sources by using arginine and pyruvate tests. *Journal of Clinical Microbiology* . 1: 54-60.
- 78 GYLLENBERG, H., NIEMELÄ, S. & SORMUNEN, T. 1960. Survival of bifid bacteria in water as compared with that of coliform bacteria and Enterococci. *Applied and Environmental Microbiology*. 8: 20-22.
- 79 HAVELAAR, A.H., FURUSE, K. & HOGEBOM, W.M. 1986. Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *Journal of Applied Bacteriology*. 60: 255-262.
- 80 HAVELAAR, A.H., POT-HOGEBOOM, W.M., FURUSE, K., POT, R. & HORMANN, M.P. 1990. F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *Journal of Applied Bacteriology*. 69: 30-37.
- 81 HERNANDEZ, J.F., GUIBERT, J.M., DELATTRE, J.M., OGER, C., CHARRIERE, C., HUGHES, B., SERCEAU, R. & SINEGRE, F. 1991. Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *Escherichia coli* and enterococci in marine water. *Water Science and Technology* . 24: 137-141 Pergamon Press: .
- 82 HINTON, M., ALLEN, V. & LINTON, A.H. 1982. The biotyping of *Escherichia coli* isolated from healthy farm animals. *Journal of Hygiene Cambridge*. 88: 543-555.
- 83 HO, A.K.C., WOO, K.S. & FRENCH, G.L. 1990. Infective endocarditis caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *Journal of Infection*. 21: 209-211.

- 84 HOLLIS, D.G., HICKMAN, F.W., FANNING, G.R., FARMER III, J.J., WEAVER, R.E. & BRENNER, D.J. 1981. *Tatumella pyseos*, gen. nov., sp. nov., a member of the family *Enterobacteriaceae* found in clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 14: 79-88.
- 85 HOMMEZ, J., DEVRIESE, L.A. , HENRICHSEN. J. & CASTRYCK, F. 1986. Identification and characterization of *Streptococcus suis*. *Veterinary Microbiology*. 11: 349-355.
- 86 IVERSON, W.G . & MILLIS, N.F. 1976. Lysogeny in *Streptococcus bovis*. *Canadian Journal of Microbiology*. 22: 853-857.
- 87 IZARD, D., FERRAGUT, C., GAVINI, F., KERSTERS, K., DE LEY, J. & LECLERC, H. 1981. *Klebsiella terrigena*, a new species of *Enterobacteriaceae* from the environment. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31: 116-127.
- 88 IZARD, D., GAVINI, F. & LECLERC, H. 1980. Polynucleotide sequence relatedness and genome size among *Enterobacter intermedium* sp.nov. and the species *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I Abt. Orig. C1*: 51-60.
- 89 IZARD, D., GAVINI, F., TRINEL, P.A. & LECLERC, H. 1979. *Rahnella aquatilis*, un nouveau membre dans la famille des *Enterobacteriaceae*. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)*. 130 A: 163-177.
- 90 IZARD, D., GAVINI, F., TRINEL, P.A. & LECLERC, H. 1981. Deoxyribonucleic acid relatedness between *Enterobacter cloacae amnigenus* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 31: 35-42.
- 91 IZARD, D., GAVINI, F., TRINEL, P.A., KRUBWA, F. & LECLERC, H. 1980. contribution of DNA-DNA hybridization to the transfer of *Enterobacter aerogenes* to the genus *Klebsiella* as *K.mobilis*. *Zentralblat für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene.I Abt. Orig. C1*: 257-263.
- 92 JAY, J.M. 1986. Streptococci as indicators of food sanitary quality. In *Modern Food Microbiology, Third Edition*. ed. Van Nostrand, Reinhold. pp 414.
- 93 KENNER, A.B., CLARK, H.F . & KABLER, P.W. 1961. Fecal Streptococci. I.- Cultivation and enumeration of Streptococci in surface waters. *Applied Microbiology*. 9: 15-20.
- 94 KENNER, B.A. 1978. Fecal streptococcal indicators. p.147-169. In *Indicators of viruses in water and food*. ed. Berg. G.
- 95 KHALAF, S.H. & MUHAMMAD, A.M. 1989. Studies on faecal Streptococci in wells water near Mosul city. *Journal of Environmental Science and Health* . 24: 467-475.

- 96 KILIAN, M. & BULOW, P. 1976. Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae* I. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavia. Sect. B.* 84: 245-251.
- 97 KILPPER-BÄLZ, R. & SCHLEIFER, K.H. 1987. *Streptococcus suis* sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 37: 160-162.
- 98 KJELLANDER, J. 1960. Enteric streptococci as indicators of fecal contamination of water. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia. Supplementum* 136. 48: .
- 99 KLOOS, W.E., ZIMMERMAN, R.J. & SMITH, R.F. 1976. Preliminary studies on the characterization and distribution of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species on animal skin. *Applied and Environmental Microbiology.* 31: 53-59.
- 100 KRUMPERMAN, P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high risk sources of fecal contamination of food. *Applied and Environmental Microbiology.* 46: 165-170.
- 101 KUHNEN, E., RICHTER, F., RICHTER, K. & ANDRIES, L. 1988. Establishment of a typing system for group D streptococci. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene . A* 267: 322-330.
- 102 LANGLOIS, B. E., DAWSON, K.A., LEAK, I. & AARON, D.K. 1988. Effect of age and housing location on antibiotic resistance of fecal coliforms from pigs in a non-antibiotic-exposed herd. *Applied and Environmental Microbiology.* 54: 1341-1344.
- 103 LANGLOIS, B. E., CROMWELL, G. L., STAHLY, T. S., DAWSON, K. A. & HAYS, V.W. 1983. Antibiotic resistance of fecal coliforms after long-term withdrawal of therapeutic and subtherapeutic antibiotic use in a swine herd. *Applied and Environmental Microbiology.* 46: 1433-1434.
- 104 LAUER, E. & KANDLER, O. 1983. DNA-DNA homology, murein types and enzyme patterns in the type strains of the genus *Bifidobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology.* 4: 42-64.
- 105 LAUER, E. 1990. *Bifidobacterium gallicum* sp. nov. isolated from human feces. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 40: 100-102.
- 106 LAVOIE, M.C. 1983. Identification of strains isolates as total and fecal coliforms and comparison of both groups as indicators of fecal pollution in tropical climates. *Canadian Journal of microbiology.* 29: 689-693.
- 107 LE MINOR, L. & VERON, M. 1989. *Bacteriologie médicale.* ed. Médecine-Sciences. Flammarion.

- 108 LECLERC, H. & MORIAMEZ, J.C. 1980. Etude quantitative de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson alimenté artificiellement. *Pathologie Biologie*. 28: 217-226.
- 109 LECLERC, H., GAVINI, F., IZARD, D. & TRINEL, P.A. 1983. Les coliformes: mythe et réalité. ed. INSERM. 114: 597-617.
- 110 LECLERC, H., MOSSEL, D.A., TRINEL, P.A. & GAVINI, F. 1977. Microbiological monitoring. A new test for fecal contamination. p. 21-31. In W.W Hoadley and B.J Dutka (ed.), *Bacterial indicators/health hazards associated with water*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- 111 LEVIN, M.A. 1977. Bifidobacteria as water quality indicators. p. 131-138 In W.W Hoadley and B.J Dutka (ed.), *Bacterial indicators/health hazards associated with water*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia .
- 112 LITSKY, W., MALLMANN, W.L . & FIFIELD, C.W. 1953. A new medium for the detection of Enterococci in water. *American Journal of Public Health* . 43: 873-879.
- 113 LITTEL, K.J . & HARTMAN, P.A. 1983. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of fecal streptococci . *Applied Environmental Microbiology* . 45 : 622-627.
- 114 MARA, D. D . & ORAGUI, J. D. 1985. Bacteriological methods for distinguishing between human and animal faecal pollution of water: results of fieldwork in Nigeria and in Zimbabwe. *Bulletin of the World Health Organisation*. 63: 773-783.
- 115 MARA, D. D . & ORAGUI, J. D. 1983. Sorbitol-fermenting bifidobacteria as specific indicators of human faecal pollution. *Journal of Applied Bacteriology*. 55: 349-357.
- 116 MARA, D.D. & ORAGUI, J.I. 1981. Occurrence of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in faeces, sewage and fresh water. *Applied and Environmental Microbiology*. 42: 1037-1042.
- 117 MARMUR, J. & DOTY, P. 1962. Determination of base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*. 5: 109-118.
- 118 MARMUR, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *Journal of Molecular Biology*. 3: 208-218.
- 119 MARTINS, M.T., ALVES, M.N., SANCHEZ, P.S . & ZANOLI SATO, M.I. 1984. Evaluation of the fecal coliforms /fecal streptococci ratio in the characterization of fecal pollution in a subtropical River . *Revista de Microbiologia* . 15: 94-102.
- 120 MATTEUZZI, D., CROCIANI, F., ZANI, G . & TROVATELLI, L. D. 1971. *Bifidobacterium suis* n. sp.: a new species of the genus *Bifidobacterium* isolated from pig feces. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie* . 11: 387-395.

- 121 McCAMBRIDGE, J. & McMEEKIN, T.A. 1981. Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of fecal and other bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 41: 1083-1087.
- 122 McFETERS, G.A., BISSONNETTE, G.K., JEZESKI, J.J., THOMSON, C.A . & STUART, D.G. 1974. Comparative survival of indicators bacteria and pathogen survival in well water. *Applied Microbiology*. 27: 823-829.
- 123 MEAD, G.C. 1964. Isolation and significance of *Streptococcus faecalis* sensu strictu. *Nature*. 204: 1224-1225.
- 124 MEDREK, T.F . & BARNES, E.M. 1962. The distribution of group D Streptococci in cattle and sheep. *Journal of Applied Bacteriology*. 25: 159-168.
- 125 MERCER, H.D., POCURULL, D., GAINES S., WILSON, S.& BENNETT, J.V. 1971. Characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from animals: relationship to veterinary and management uses of antimicrobial agents. *Applied Microbiology*. 22: 700-705.
- 126 MITSUOKA, T. 1984. Taxonomy and ecology of bifidobacteria. *Bifidobacteria Microflora*. 3: 11-28.
- 127 MITSUOKA, T., MORISHITA, Y., TERADA, A . & WATANABE, K . 1974. *Actinomyces eriksonii* Georg, Roberstad, Brinkman und Hicklin 1965 identisch mit *Bifidobacterium adolescentis* Reuter 1963. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. I Abt. Orig A*. 226: 257-263
- 128 MITSUOKA, T. 1969. Vergleichende Untersuchungen über die Bifidobakterien aus dem Verdauungstrakt von Menschen und Tieren . *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Abt. I Orig*. 210 : 52-64.
- 129 MITSUOKA, T. & KANEUCHI, C. 1977. Ecology of the bifidobacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 30: 1799-1810.
- 130 MOORE, W.E.C., MOORE, L.V.H., CATO, E.P., WILKINS, T.D. & KORNEGAY, E.T. 1987. Effect of high-fiber and high-oil diets on the fecal flora of swine . *Applied and Environmental Microbiology* . 53: 1638-1644.
- 131 MORIAMEZ, J.C. 1977. Aspects bactériologiques quantitatifs de la flore fécale de l'adulte et du nourrisson. Influence des bactéries contenues dans l'eau minérale sur la flore du nourrisson. Thèse.
- 132 MUNDT, J.O. 1963. Occurrence of Enterococci in animals in a wild environment. *Applied Microbiology*. 11: 136-140.

- 133 MUNDT, J.O. 1963. Occurrence of Enterococci on plants in a wild environment. *Applied Microbiology*. 11: 141-144.
- 134 MUNOA, F.J. & PARES, R. 1988. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 54: 1715-1718.
- 135 MUNOA, F.J., VIVES-REGO, J. & PARES, R. 1985. Deteccion, aislamiento y caracterizacion de *Bifidobacterium* en aguas libres superficiales. *Microbiologia España*. 38: 1-9.
- 136 MUTAI, M. & TANAKA, R. 1987. Ecology of *Bifidobacterium* in the human intestinal flora. *Bifidobacteria Microflora*. 6: 33-41.
- 137 OCHMAN, H. & SELANDER, R.K. 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of Bacteriology*. 157: 690-693.
- 138 OGER, C. & LECLERC, H. 1977. Essai de nouveaux tests "haute température" pour la mise en évidence des coliformes fécaux ou des *E.coli* dans les eaux. *Microbia*. 3: 47-55.
- 139 OGER, C., GAVINI, F., DELATTRE, J.M. & LECLERC, H. 1981. A propos des coliformes et de la colimétrie des eaux d'alimentation. *Annales de Microbiologie (Institut Pasteur)*. 132 A: 183-189.
- 140 OPARA, A.A. 1978. The role of anaerobic faecal bacteria as indicators of water pollution in hot climates. Thèse.
- 141 ORAGUI, J.I. & MARA, D.D. 1984. A note on a modified membrane-Bovis agar for the enumeration of *Streptococcus bovis* by membrane filtration. *Journal of Applied Bacteriology*. 56: 179-181.
- 142 ORAGUI, J.I. & MARA, D.D. 1981. A selective medium for the enumeration of *Streptococcus bovis* by membrane filtration. *Journal of Applied Bacteriology*. 51: 85-93.
- 143 ORAGUI, J.I. & MARA, D.D. 1983. Investigation of the survival characteristics of *Rhodococcus coprophilus* and certain faecal indicator bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 46: 356-360.
- 144 ORAGUI, J.I. 1978. On bacterial indicators of water and sewage pollution. Thèse.
- 145 ORSKOV, I., ORSKOV, F., JANN, B. & JANN, K. 1977. Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriological Reviews*. 41: 667-710.
- 146 PETTIBONE, G.W., SULLIVAN, S.A. & SHIARIS, M.P. 1987. Comparative survival of antibiotic-resistant and sensitive fecal indicator bacteria in estuarine water. *Applied Environmental Microbiology*. 53: 1241-1245.

- 147 PURDY, R.A., CASSIDY, B. & MARRIE, T.J. 1990. *Streptococcus bovis* meningitis: report of 2 cases. *Neurology*. 40: 1782-1784.
- 148 RAMADAN, F.M. & SABIR, M.S. 1963. Differentiation studies of fecal streptococci from farm animals. *Canadian Journal of microbiology*. 9: 443-450.
- 149 RESNICK, I.G. & LEVIN, M.A. 1981. Quantitative procedure for enumeration of bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 42: 427-432.
- 150 RESNICK, I.J. & LEVIN, M. A. 1981. Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. *Journal of Applied and Environmental Microbiology*. 42: 433-438.
- 151 REUTER, G. 1963. Vergleichende Untersuchung über die Bifidus -Flora im Säuglings- und Erwachsenenstuhl. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene Abt. I Orig.* 191 : 486-507.
- 152 ROBINSON, I.M., WHIPP, S.C., BUCKLIN, J.A. & ALLISON, M.J. 1984. Characterization of predominant bacteria from colons of normal dysenteric pigs. *Applied and Environmental Microbiology*. 48: 964-969.
- 153 ROBINSON, I.M., STROMLEY, J.M., VAREL, V.H. & CATO, E.P. 1988. *Streptococcus intestinalis*, a new species from the colons and faeces of pigs. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 24: 285-306.
- 154 ROWBOTHAM, T.J. & CROSS, T. 1977. Ecology of *Rhodococcus coprophilus* and associated actinomycetes in fresh water and agricultural habitats. *Journal of General Microbiology*. 100: 231-240.
- 155 RUOFF, K.L. 1990. Recent taxonomic changes in the genus *Enterococcus*. *European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases*. 9: 75-79.
- 156 RUTKOWSKI, A.A. & SJOGREN, R.E. 1987. Streptococcal population profiles as indicators of water quality. *Water Air and Soil Pollution*. 34: 273-284.
- 157 SALANITRO, J.P., BLAKE, I.G. & MUIRHEAD, P.A. 1977. Isolation and identification of fecal bacteria from adult swine. *Applied and Environmental Microbiology*. 33: 79-84.
- 158 SALANITRO, J.P., BLAKE, I.G. & MUIRHEAD, P.A. 1974. Studies on the cecal microflora of commercial broiler chickens. *Applied Microbiology*. 28: 439-447.
- 159 SALEH, F.A. 1977. Recovery and susceptibility patterns of faecal Streptococci bacteriophages. *Water Research*. 11: 403-409.

- 160 SALEH, F.A. 1980. Isolation and enumeration of faecal streptococci from Nile water . Water Research . 14 : 1669-1678.
- 161 SCARDOVI, V., ZANI, G . & TROVATELLI, L. D. 1970. Deoxyribonucleic acid homology among the species of the genus *Bifidobacterium* isolated from animals. Archiv für Mikrobiologie. 72: 318-325.
- 162 SCARDOVI, V . & ZANI, G. 1974. *Bifidobacterium magnum* sp. nov. a large acidophilic *Bifidobacterium* isolated from rabbit feces. International Journal of Systematic Bacteriology. 24: 29-34.
- 163 SCARDOVI, V., TROVATELLI, L. D., ZANI, G., CROCIANI, F . & MATTEUZZI, D. 1971. Deoxyribonucleic acid homology relationships among species of the genus *Bifidobacterium* . International Journal of Systematic Bacteriology. 21: 276-294.
- 164 SCARDOVI, V., TROVATELLI, L. D., CROCIANI, F . & SGORBATI, B. 1969. Bifid Bacteria in bovine rumen. New species of the genus *Bifidobacterium* : *B.globosum* n. sp. and *B. ruminale* n. sp. Archiv für Mikrobiologie. 68: 278-294.
- 165 SCARDOVI, V., TROVATELLI, L. D., BIAVATI, B . & ZANI, G. 1979. *Bifidobacterium cuniculi*, *Bifidobacterium choerinum*, *Bifidobacterium boum* and *Bifidobacterium pseudocatenulatum*: four new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. International Journal of Systematic Bacteriology. 29: 291-311.
- 166 SCARDOVI, V . & TROVATELLI, L. D. 1974. *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka) comb. nov. and the "minimum" and "subtile" groups of new bifidobacteria found in sewage. International Journal of Systematic Bacteriology. 24: 21-28.
- 167 SCARDOVI, V . & TROVATELLI, L. D. 1969. New species of bifid bacteria from *Apis mellifica* L. and *Apis indica* F. A contribution to the taxonomy and biochemistry of the genus *Bifidobacterium*. Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene .I Abt. Orig A. 123 : 64-88.
- 168 SCARDOVI, V. & CROCIANI, F. 1974. *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium dentium*, and *Bifidobacterium angulatum*: three new species and their deoxyribonucleic acid homology relationships. International Journal of Systematic Bacteriology. 24: 6-20.
- 169 SCARDOVI, V., CASALICCHIO, F . & VINCENZI, N. 1979. Multiple electrophoretic forms of transaldolase and 6-phosphogluconic dehydrogenase and their relationships to the taxonomy and the ecology of the bifidobacteria. International Journal of Systematic Bacteriology. 29: 312-327.
- 170 SCARDOVI, V. 1986. Irregular nonsporing gram-positive rods. Genus *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924. Section 15. p. 1418-1434. In P. H. A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and

J.G. Holt (ed), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.2. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

171 SCARDOVI, V., SGORBATI, B. & ZANI, G. 1971. Starch gel Electrophoresis of Fructose-6-Phosphate Phosphoketolase in the Genus *Bifidobacterium*. Journal of Bacteriology. 106: 1036-1039.

172 SCARPINO, P.V. 1971. Bacterial and viral analysis of water and waste water. p. 639-761. In L.L. CIACCIO (ed.). Water and water pollution handbook.

173 SCHERMAN, J.M. 1937. The Streptococci. Bacteriological Reviews . 1: 3-97.

174 SCHLEIFER, K.H. & KILPPER-BÄLZ, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology. 34: 31-34.

175 SCHOEBITZ, R. & MONTES, L. 1985. Bacteriological contamination indicators and presence of *Salmonella* in the Valdivia-river (Chile). Archivos de Medicina Veterinaria. 16: 83-92.

176 SMITH, H.W. & CRABB, W.E. 1961. The faecal bacterial flora of animals and man: its development in the young. Journal of Pathological Bacteriology. 82: 53-66.

177 SMITH, H.W. 1965. Observations on the flora of the alimentary tract of animals and factors affecting its composition. Journal of Pathological Bacteriology. 89: 95-122.

178 SNEATH, P. H. A. & SOKAL, R. R. 1973. Numerical taxonomy. W. H. Freeman, San Francisco.

179 TAMURA, K., SAKAZAKI, R., KOSAKO, Y. & YOSHIZAKI, E. 1986. *Leclercia adecarboxylata* gen. nov., comb. nov., formerly known as *Escherichia adecarboxylata*. Current Microbiology. 13: 179-184.

180 TANAKA, R. & MUTAI, M. 1980. Improved medium for selective isolation and enumeration of *Bifidobacterium*. Applied and Environmental Microbiology. 40: 866-869.

181 THOMAS, G.M. & POINAR jr, G.O. 1979. *Xenorhabdus* gen.nov., a genus of entomopathogenic, nematophilic bacteria of the family *Enterobacteriaceae*. International Journal of Systematic Bacteriology. 29: 352-360.

182 TIEDEMANN, A.R., HIGGINS, D.A., QUIGLEY, T.M., SANDERSON, H.R. & MARX, D.B. 1987. Responses of fecal coliform in streamwater to four grazing strategies. Journal of Range Management. 40: 322-329.

- 183 TILTON, R.C . & LITSKY, W. 1967. The characterization of fecal Streptococci. An attempt to differentiate between human and animal sources of contamination. *Journal of Food Milk*. 30: 1-6.
- 184 TISSIER, H. 1900. Recherche sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). Paris Thèse 1-253.
- 185 TROVATELLI, L. D., CROCIANI, F., PEDINOTTI, M . & SCARDOVI, V. 1974. *Bifidobacterium pullorum* sp. nov.: A new species isolated from chicken feces and a related group of bifidobacteria isolated from rabbit feces. *Archive of Microbiology* 98: 187-198.
- 186 VENKATESWARAN, K . & NATARAJAN, R. 1987. Significance of bacterial indicators of pollution in the isolation of human pathogens in aquatic environment . *Indian Journal of Marine Science* . 16: 51-53.
- 187 VLASSOF, L.T. 1977. *Klebsiella*. p.275-288. In W.W Hoadley and B.J Dutka (ed.), *Bacterial indicators/health hazards associated with water*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- 188 WATABE, J., BENNO, Y . & MITSUOKA, T. 1983. *Bifidobacterium gallinarum* sp. nov.: a new species isolated from the ceca of chickens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 33: 127-132.
- 189 WHEATER, D.W.F., MARA, D.D . & ORAGUI, J.I. 1979. Indicator systems to distinguish sewage from stormwater run-off and human from animal faecal material. In *Biological indicators of water quality*. eds. James, A. & Evison, L. pp 21/1-21/27.
- 190 WILLIAMS, A.M., FARROW, J.A.E . & COLLINS, M.D. 1989. Reverse transcriptase sequencing of 16S ribosomal RNA from *Streptococcus cecorum*. *Letters in Applied Microbiology* . 8 : 185-189.
- 191 WRIGHT, R.C. 1982. A comparison of the levels of faecal indicator bacteria in water and human faeces in a rural area of a tropical developing country (Sierra Leone). *Journal of Hygiene, Cambridge*. 89: 69-78.
- 192 YOUNG, V.M., KENTON, D.M., HOBBS, B.J. & MOODY, M.R. 1971. *Levinea*, a new genus of the family *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 21: 58-63.
- 193 ZANI, G., BIAVATI, B., CROCIANI, F . & MATTEUZZI, D. 1974. Bifidobacteria from faeces of piglets. *Journal of Applied Bacteriology*. 37: 537-547.

6. ANNEXES

## ANNEXE 1

TESTS ENZYMATIQUES (STREPTOCOQUES FECAUX ET *E.COLI*).

Liste des enzymes du système API pour l'étude du profil enzymatique des streptocoques fécaux et de *E.coli*

n° du test	nom de l'enzyme recherchée
2	Phosphatase alcaline
3	Estérase (C4)
4	Estérase lipase (C14)
5	Lipase (C14)
6	Leucine arylamidase
7	valine arylamidase
8	Cystine arylamidase
9	Trypsine
10	$\alpha$ Chymotrypsine
11	Phosphatase acide
12	Naphtol-AS-BI- phosphohydrolase
13	$\alpha$ galactosidase
14	$\beta$ galactosidase
15	$\beta$ glucuronidase
16	$\alpha$ glucosidase
17	$\beta$ glucosidase
18	N-acetyl- $\beta$ glucosaminidase
19	$\alpha$ mannosidase
20	$\alpha$ fucosidase

Liste des substrats enzymatiques utilisés (en microplaques) pour l'étude du profil enzymatique des streptocoques fécaux et de *E.coli*

4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -D glucuronide

4-méthylumbelliferyl arabinoside

4-méthylumbelliferyl glucosaminide

4-méthylumbelliferyl  $\alpha$ -galactoside

4-méthylumbelliferyl mannoside

4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -D glucoside

4-méthylumbelliferyl cellobioside

4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -galactoside

4-méthylumbelliferyl  $\beta$ -D fucoside

4-méthylumbelliferyl sulfate

## ANNEXE 2

## FICHER DES PROFILS D'IDENTIFICATION (STREPTOCOQUES FECAUX)

obtenus sur notre galerie

code	identification
0100	<i>Micrococcus</i> sp.
0300	<i>Bacillus</i> sp.
1023	<i>Aerococcus viridans</i>
1067	<i>Vibrio</i> sp.
1101	<i>Micrococcus</i> sp.
1123	<i>Aerococcus viridans</i>
1167	<i>Micrococcus</i> sp.
1204	<i>Aerococcus viridans</i>
1305	<i>Aerococcus viridans</i>
1307	<i>Aerococcus viridans</i>
1310	<i>Streptococcus suis</i>
1337	<i>Enterococcus malodoratus</i>
1527	<i>Aerococcus viridans</i>
1610	<i>Streptococcus suis</i>
1614	<i>Streptococcus suis</i>
1667	<i>Streptococcus suis</i>
2130	<i>Proteus</i> sp.
2373	<i>Proteus</i> sp.
2521	<i>Staphylococcus</i> sp.
3020	<i>Proteus</i> sp.
3120	<i>Proteus</i> sp.
3131	<i>Proteus</i> sp.
3177	<i>Proteus</i> sp.

code	identification
5000	<i>Streptococcus bovis</i>
5004	<i>Streptococcus salivarius</i>
5004	<i>Streptococcus salivarius</i>
5005	<i>Streptococcus bovis</i>
5121	<i>Vibrio</i> sp.
5130	<i>Enterococcus durans</i> ou <i>hirae</i>
5131	<i>Enterococcus durans</i>
5133	<i>Enterococcus faecalis</i>
5171	<i>Enterococcus faecium</i>
5173	<i>Enterococcus faecium</i>
5177	<i>Vibrio</i> sp.
5200	<i>Streptococcus bovis</i>
5204	<i>Streptococcus bovis</i>
5205	<i>Streptococcus bovis</i>
5207	<i>Enterococcus malodoratus</i>
5311	<i>Enterococcus mundtii</i>
5330	<i>Enterococcus durans</i> ou <i>hirae</i>
5331	<i>Enterococcus faecium</i>
5334	<i>Enterococcus durans</i>
5371	<i>Enterococcus faecium</i>
5373	<i>Enterococcus faecium</i>
5375	<i>Enterococcus faecium</i>
5433	<i>Streptococcus uberis</i>
5500	<i>Staphylococcus</i>
5521	<i>Staphylococcus</i>
5600	<i>Streptococcus bovis</i>
5604	<i>Streptococcus bovis</i>
5675	<i>Enterococcus casseliflavus</i>

code	identification
5730	<i>Streptococcus hyointestinalis</i>
5734	<i>Enterococcus hirae</i>
5735	<i>Streptococcus uberis</i>
5760	<i>Micrococcus</i> sp.
5775	<i>Enterococcus gallinarum</i>
7131	<i>Staphylococcus</i> sp.
7160	<i>Proteus</i> sp.
7163	<i>Bacillus</i> sp.
7167	<i>Micrococcus</i> sp.
7170	<i>Micrococcus</i> sp.
7173	<i>Bacillus</i> sp.
7573	<i>Micrococcus</i> sp.

## ANNEXE 3

## CONSOMMATION DES ADDITIFS ANTI INFECTIEUX EN FRANCE

(année 1980, en tonnes de matières actives)

d'après Gorse et Janet (1983).

élément anti-infectieux	total	porcs	volailles	lapins	veaux	autres espèces
Triméthoprine*	3,6	1,3	0,09	-	1,41	0,8
Oxytétracycline*	81,4	52,5	3,0	1,7	14,9	9,3
Chlortétracycline*	23,4	17,6	1,7	0,5	0,2	3,4
Bacitracine	67,5	12,5	11,5	0,9	42	0,6
Spiramycine	22,5	5,1	0,2	-	16,9	0,3
Virginiamycine	16,2	7,0	4,9	-	4,6	-
Flavomycine	4,0	-	2,3	-	1,7	-
Tylosine	25	25	-	-	-	-
Lincomycine	0,1	-	0,1	-	-	-
Avoparcine	4,6	1,0	3,6	-	-	-
Diméridazole	155,0	78,0	77,0	-	-	-
Ronidazole	3,8	3,7	0,1	-	-	-
Monensin sodium	13	-	-	-	-	13

\* molécules anti-infectieuses consommées dans les aliments médicamenteux.

## ANNEXE 4

LISTE DES TESTS ENZYMATIQUES ET DES TESTS DE FERMENTATION  
UTILISES POUR L'ANALYSE NUMERIQUE DES BIFIDOBACTERIES.**Peptidases-I**

L-tyrosine arylamidase	glycine arylamidase
L-pyrrolidone arylamidase	L-phénylalanine arylamidase
L-lysine arylamidase	L-hydroxyproline arylamidase
L-histidine arylamidase	L-aspartate arylamidase
L-arginine arylamidase	L-alanine arylamidase

**Peptidases-II**

$\gamma$ -Glutamyltransférase (-)	N-benzoyl-leucine arylamidase
S-benzyl-cysteine arylamidase	L-méthionine arylamidase
glycyl-glycine arylamidase	glycyl-phénylalanine arylamidase
glycyl-proline arylamidase	leucyl-glycine arylamidase
L-séryl-tyrosine arylamidase	

**Peptidases-III**

N-CBZ-arginine-4-methoxy-arylamidase (-)	L-glutamine arylamidase
$\alpha$ -L-glutamate arylamidase	L-isoleucine arylamidase
L-ornithine arylamidase	L-proline arylamidase
L-sérine arylamidase	L-thréonine arylamidase
L-tryptophane arylamidase	NCBZ-glycyl-glycyl-arginine arylamidase

**Peptidases-IV**

$\beta$ -alanine arylamidase	L-alanyl-L-arginine arylamidase
L-alanyl-L-phénylalanyl-L-proline arylamidase	L-arginyl-L-arginine arylamidase
$\alpha$ -L-aspartyl-L-alanine arylamidase	$\alpha$ -L-aspartyl-L-arginine arylamidase
$\alpha$ -L-glutamyl- $\alpha$ -L-glutamic acid arylamidase	$\alpha$ -L-glutamyl-L-histidine arylamidase
glycyl-L-alanine arylamidase	
L-alanyl-L-phénylalanyl-L-proyl-L-alanine arylamidase	

**Peptidases-V**

glycyl-L-arginine arylamidase

L-histidyl-L-leucyl-L-histidine arylamidase

L-leucyl-L-alanine arylamidase

L-lysyl-L-lysine arylamidase

L-phénylalanyl-L-proline arylamidase

L-leucyl-L-leucyl-L-valyl-L-tyrosyl-L-sérine arylamidase

glycyl-L-tryptophane arylamidase

L-histidyl-L-sérine arylamidase

L-lysyl-L-alanine arylamidase

L-phénylalanyl-L-arginine arylamidase

**Peptidases-VI**

L-phenylalanyl-L-prolyl-L-alanine arylamidase

L-seryl-L-méthionine arylamidase

N-benzoyl-L-alanine-4-methoxy arylamidase

N-CBZ-glycyl-glycyl-L-arginine arylamidase

L-histidyl-L-phénylalanine arylamidase

L-prolyl-L-arginine arylamidase

L-valyl-L-tyrosyl-L-sérine arylamidase

N-CBZ-arginyl-4-méthoxy arylamidase

N-acetyl-glycyl-L-lysine arylamidase (-)

L-lysyl-L-sérine-4-methoxy arylamidase

**Esterases**

Estérase - C4

Estérase - C6

Estérase - C9

Estérase - C12

Estérase - C16 (-)

Estérase - C5

Estérase - C8

Estérase - C10

Estérase - C14 (-)

Estérase - C18 (+)

**Osidases** $\alpha$ -galactosidasephospho- $\beta$ -galactosidase (-) $\alpha$ -glucosidase $\beta$ -galacturonohydrolase (-) $\alpha$ -maltosidaseN-acetyl- $\alpha$ -glucosaminidase $\alpha$ -fucosidase $\beta$ -L-fucosidase $\alpha$ -mannosidase $\alpha$ -xylosidase $\beta$ -galactosidase $\alpha$ -arabinosidase $\beta$ -glucosidase $\beta$ -glucuronidase $\beta$ -maltosidaseN-acétyl- $\beta$ -glucosaminidase $\beta$ -D-fucosidase $\beta$ -lactosidase $\beta$ -mannosidase $\beta$ -xylosidase

Glycérol (-)	Erythritol (-)
L-Arabinose	D-Arabinose (-)
D -Xylose	L -Xylose (-)
Ribose	Adonitol (-)
Glucose	$\beta$ -methyl-D-Xyloside
Mannose	Sorbose (-)
Fructose	Rhamnose (-)
Galactose	Dulcitol (-)
Saccharose	$\alpha$ -méthyl-D-Mannoside (-)
Maltose	$\alpha$ -méthyl-D-Glucoside
Cellobiose	N-acétyl-Glucosamine
Lactose	Arbutine
Tréhalose	Xylitol
Mélibiose	Gentiobiose
Raffinose	D-Turanose
Mélézitose	D-Lyxose (-)
Amidon	D-Tagatose
Glycogène	D-Fucose (-)
Inuline	L-Fucose (-)
Mannitol	D-Arabitol (-)
Sorbitol	L-Arabitol (-)
Inositol (-)	Gluconate (-)
Esculine	2-Cétogluconate (-)
Salicine	5-Cétogluconate (-)
Amygdaline	

(-): tests négatifs pour toutes les souches de l'analyse numérique.

(+): tests positifs pour toutes les souches de l'analyse numérique

## ANNEXE 5

DIAMETRES D'INHIBITION OBTENUS POUR LES SOUCHES DE  
*E.FAECIUM*, *E.FAECALIS*, *S.BOVIS* ET *E.COLI*

<i>E.faecium</i> diamètres d'inhibition exprimés en mm					
origine	Oxytétracycline	Chlortétracycline	Spiramycine	Triméthoprime	Virginiamycine
porc	23	27	27	19	0
"	0	0	0	13	15
"	23	27	31	21	9
"	0	0	0	19	0
"	23	9	31	17	9
cheval	23	23	27	15	9
"	23	19	27	17	9
vache	0	13	0	19	15
"	23	29	27	15	11
"	0	11	23	17	0
poule	0	9	27	19	15
"	0	23	0	17	0
"	0	9	0	17	0
"	0	0	27	21	9
"	0	0	31	19	9
humain	23	27	31	17	9
"	23	27	27	17	15
"	23	31	27	21	15
"	21	25	27	13	9
"	23	23	21	17	17
"	23	21	19	17	17
"	23	21	21	19	11
"	23	23	19	17	0
"	23	23	17	15	9
"	23	25	23	17	11

<i>E.faecalis</i> diamètres d'inhibition exprimés en mm					
origine	Oxytétracycline	Chlortétracycline	Spiramycine	Triméthoprime	Virginiamycine
porc	0	9	0	0	0
"	17	27	21	15	9
"	0	9	0	0	0
poule	0	0	0	17	0
"	0	9	0	19	0
"	0	0	21	0	0
"	17	17	21	19	17
oie	0	0	21	17	9
mouette	19	27	25	19	0
"	19	25	25	19	9
lapin	17	21	17	17	9
humain	9	9	21	19	9
"	17	25	21	17	11
"	17	23	23	19	11
"	17	23	23	17	0
"	17	23	19	21	9
"	17	25	19	19	0
"	21	25	21	19	0
"	17	25	27	21	9

<i>S. bovis</i> diamètres d'inhibition exprimés en mm					
origine	Oxytétracycline	Chlortétracycline	Spiramycine	Triméthoprim	Virginiamycine
porc	13	17	0	15	37
"	9	9	17	19	0
"	17	13	0	13	47
"	47	13	47	17	47
"	17	15	0	13	47
"	13	15	0	15	47
"	47	15	47	17	47
vaches	47	27	47	0	47
"	47	35	47	0	27
"	47	31	47	0	27
"	47	33	47	9	27
"	47	33	47	0	47
"	47	33	47	0	47
"	47	31	47	9	47
"	47	35	31	13	27
"	47	35	47	0	37
"	47	35	47	0	27
"	37	35	47	0	27
"	47	25	47	0	27

<i>E. coli</i> diamètres d'inhibition exprimés en mm			
origine	Oxytétracycline	Chlortétracycline	Spiramycine
porc	0	25	11
"	21	25	13
"	0	9	11
"	21	27	11
"	11	11	11
"	23	27	11
"	29	31	13
"	0	0	11
cheval	0	0	13
vache	21	29	11
"	21	27	9
"	21	31	13
"	23	27	13
"	21	27	11
"	23	21	13
"	23	21	11
poule	23	23	11
"	0	9	11
"	0	19	11
"	0	19	11
"	0	0	9
humain	21	25	13
"	21	0	11
"	25	27	0
"	21	25	9
"	0	0	0
"	0	0	11
"	19	27	13
"	25	23	13
"	25	21	11
"	21	21	13
"	0	9	13
"	21	21	9
"	19	25	11

<i>E. faecium</i> diamètres d'inhibition exprimés en mm						
origine	Tylosine (500µg)	Tylosine (100µg)	Tylosine (10µg)	Monensin sodium (500µg)	Monensin sodium (100µg)	Monensin sodium (10µg)
porc	25	15	9	0	0	0
"	0	0	0	9	9	0
"	29	17	11	7	7	0
"	0	0	0	7	7	0
"	29	15	9	7	7	0
cheval	25	15	11	0	0	0
"	25	15	0	0	0	0
vache	0	0	0	0	0	0
"	25	15	0	9	9	0
"	21	15	0	7	7	7
poule	25	21	9	0	0	0
"	0	0	0	7	7	7
"	0	0	0	0	0	0
"	29	21	11	7	7	0
"	25	15	9	7	7	0
humain	29	21	7	0	0	0
"	25	15	9	9	9	7
"	25	15	9	9	9	0
"	25	15	9	0	0	0
"	19	13	9	7	0	0
"	15	13	9	7	0	0
"	21	15	9	7	0	0
"	21	15	0	0	0	0
"	15	13	0	0	0	0
"	23	15	9	0	0	0

<i>E. faecalis</i> diamètres d'inhibition exprimés en mm						
origine	Tylosine (500µg)	Tylosine (100µg)	Tylosine (10µg)	Monensin sodium (500µg)	Monensin sodium (100µg)	Monensin sodium (10µg)
porc	0	0	0	0	0	0
"	21	15	9	13	0	0
"	0	0	0	0	0	0
poule	0	0	0	0	0	0
"	0	0	0	0	0	0
"	25	15	0	0	0	0
"	25	15	9	9	9	7
oie	21	15	11	0	0	0
mouette	25	15	0	0	0	0
"	25	15	9	0	0	0
lapin	21	15	9	0	0	0
humain	25	11	9	0	0	0
"	25	15	11	0	0	0
"	25	15	7	0	0	0
"	21	13	7	0	0	0
"	25	15	11	7	0	0
"	25	15	9	9	7	0
"	25	19	11	9	7	0
"	25	15	9	0	0	0

<i>S. bovis</i>						
diamètres d'inhibition exprimés en mm						
origine	Tylosine (500µg)	Tylosine (100µg)	Tylosine (10µg)	Monensin sodium (500µg)	Monensin sodium (100µg)	Monensin sodium (10µg)
porc	9	0	0	8	8	7
"	24	14	0	0	0	0
"	9	0	0	17	11	11
"	>40	34	0	11	11	9
"	11	0	0	15	13	11
"	11	0	0	13	7	7
"	>40	39	0	13	11	11
vaches	>40	44	16	21	17	15
"	>40	>40	16	25	19	17
"	>40	>40	16	25	19	17
"	>40	>40	16	23	23	19
"	>40	>40	16	25	19	17
"	33	33	14	19	17	15
"	33	33	14	25	19	17
"	29	21	14	23	19	19
"	>40	>40	16	27	19	17
"	29	21	14	23	19	17
"	>40	35	15	25	23	17
"	>40	>40	16	19	19	17

Toutes les souches de *E. coli* incluses dans l'étude sont résistantes à la Tylosine au Monensin Sodium (pas de diamètres d'inhibition observés)



## Profils des souches sauvages isolées de matières fécales obtenus sur la galerie API

code API	nombre de souches correspondant au profil
<i>S.bovis</i>	
5244463	14
5240463	12
5240473	11
5244473	6
5244453	1
5244573	1
7244463	1
5244443	1
5240573	2
5240553	2
5250451	1
5244571	1
5240573	1
5240453	1
5254453	7
5250450	1
5240040	1

code API	nombre de souches correspondant au profil
<i>E.faecium</i>	
6357551	14
6317551	3
5317751	2
5317571	1
6357551	1
6357571	1
5317771	3
7157511	15
5316571	4
5315551	4
5357751	1
5353551	1
5357571	3
7353451	1
5307511	3
5377571	1
5317511	1

code API	nombre de souches correspondant au profil
<i>S.bovis</i>	
5254413	1
5354450	1
5650451	1
5650450	1
1240443	1
5200551	1
5240423	1

code API	nombre de souches correspondant au profil
<i>E.faecium</i>	
7317551	1
5353551	4
5347511	1
7357511	10
5357551	2
5157551	1
5357551	4
7117511	4
5177511	3
5353771	2
7353751	1

code API	nombre de souches correspondant au profil
<i>E. faecalis</i>	
5143611	4
7143711	36
5153711	16
5163711	3
4143711	1
3143711	1
5143311	1
7173711	1
7157711	1
7147731	1
5153611	1

code API	nombre de souches correspondant au profil
<i>E. faecium</i>	
5117711	6
5317711	1
5117751	1
7357711	1
5157511	3
5157571	12
5117511	8
5357511	5
5357731	4
<i>E. durans</i>	
5343511	2
5153411	4
5153401	2
5353411	4
5313410	1
5103410	1
5343401	1
5353451	2
5313411	1
5343451	1
5153451	2
5343411	1
5113411	1

## ANNEXE 7

**PROPORTION ET DENSITE DE BIFIDOBACTERIES OBTENUES SUR LES MILIEUX COLUMBIA CYSTEINE, BIM 25 ET BEERENS SELON L'ORIGINE DU PRELEVEMENT**

Nous avons noté pour chaque prélèvement d'origine animale, la nature de l'alimentation

**origine : chevaux**

	n° du prélèvement	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS	ALIMENTATION
densité de bifidobactéries / de fèces	1	$< 1,8 \cdot 10^7$	$< 1,8 \cdot 10^5$	$< 1,8 \cdot 10^5$	avoine, foin, granulés
	2	$< 6 \cdot 10^4$	$< 6 \cdot 10^3$	$< 6 \cdot 10^3$	avoine, foin, granulés
	3	$< 4,5 \cdot 10^6$	$< 4,5 \cdot 10^5$	$< 4,5 \cdot 10^6$	avoine, orge, granulés
	4	$< 9 \cdot 10^5$	$< 9 \cdot 10^3$	$< 9 \cdot 10^4$	foin, granulés
densité de germes totaux / de fèces	1	$4,6 \cdot 10^8$	$3,9 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$	
	2	$2,4 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^5$	$7,8 \cdot 10^5$	
	3	$1,5 \cdot 10^8$	$1,5 \cdot 10^7$	$7,3 \cdot 10^7$	
	4	$3,9 \cdot 10^7$	$9,4 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^7$	

## origine des prélèvements: bovins

	n° du prélèvement	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS	ALIMENTATION	
pourcentage de bifidobactéries	1	0	100	33	betteraves, granulés	
	veau	2	21	44	61	lait, orge, blé, soja
		3	100	100	100	lait maternel
		1	0	22	0	maïs, orge, foin aliment composé, foin aliment composé, foin
	vache	2		/	0	
		3	0	/	0	
densités de bifidobactéries / de fèces	veau	1	$1,1 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	
		2	$< 1 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$	
		3	$6 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^8$	
	vache	1	$< 2,2 \cdot 10^8$	$3 \cdot 10^7$	$2,2 \cdot 10^7$	
		2	$< 3,6 \cdot 10^4$	$< 3,6 \cdot 10^4$	$< 2,8 \cdot 10^5$	
		3	$< 8,1 \cdot 10^3$	$< 8,1 \cdot 10^3$	$< 8,1 \cdot 10^3$	
densités de germes totaux / de fèces	veau	1	$3,6 \cdot 10^7$	$2,5 \cdot 10^6$	$5,4 \cdot 10^6$	
		2	$8,0 \cdot 10^6$	$3,0 \cdot 10^4$	$1,0 \cdot 10^5$	
		3	$6,0 \cdot 10^8$	$4,5 \cdot 10^8$	$6,0 \cdot 10^8$	
	vache	1	$7,5 \cdot 10^9$	$9,9 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^9$	
		2	$3,6 \cdot 10^7$	$< 3,0 \cdot 10^4$	$2,8 \cdot 10^5$	
		3	$8,1 \cdot 10^4$	$< 8,0 \cdot 10^3$	$3,2 \cdot 10^4$	

## origine du prélèvement: porcs

	n° du prélèvement	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS	ALIMENTATION
% de bifidobactéries	porc	1 66	79	82	orge, blé, soja, poisson
		2 0	0	0	aliment composé
		3 44	88	88	aliment composé
	porcelet	1 0	0	20	lait
		2 0	20	88	lait, aliment composé
densités de bifidobactéries / de fèces	porc	1 $1,0 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^7$	$1,4 \cdot 10^7$	
		2 $<1,2 \cdot 10^6$	$<1,2 \cdot 10^5$	$<1,2 \cdot 10^5$	
		3 $7,9 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^9$	$1 \cdot 10^{10}$	
	porcelet	1 $<2,2 \cdot 10^5$	$<2,2 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^5$	
		2 $2,1 \cdot 10^{10}$	$5,4 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^9$	
densités de germes totaux / de fèces	porc	1 $1,5 \cdot 10^8$	$4 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^7$	
		2 $3,8 \cdot 10^7$	$7,7 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^7$	
		3 $1,8 \cdot 10^{10}$	$8,4 \cdot 10^9$	$1,2 \cdot 10^{10}$	
	porcelet	1 $4,5 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^5$	$6,7 \cdot 10^5$	
		2 $1,5 \cdot 10^{11}$	$2,7 \cdot 10^9$	$2 \cdot 10^9$	

## origine du prélèvement : moutons et chèvre

	n° du prélèvement	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS	ALIMENTATION
% de bifidobactéries	mouton 1	66	89	89	herbe, aliment composé herbe, aliment composé herbe, aliment composé
	2	0	100	100	
	chèvre 1	100	100	100	
densités de bifidobactéries / de fèces	mouton 1	$2,0 \cdot 10^9$	$1,4 \cdot 10^9$	$3,2 \cdot 10^8$	
	2	$<5,2 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$	
	chèvre 1	$4,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^7$	
densités de germes totaux / de fèces	mouton 1	$3,4 \cdot 10^9$	$1,5 \cdot 10^9$	$3,6 \cdot 10^8$	
	2	$3,7 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^6$	$1,5 \cdot 10^7$	
	chèvre 1	$4,0 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^7$	

## origine des prélèvements: lapins

	n° du prélèvement	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS	ALIMENTATION
% de bifidobactéries	1	0	0	0	aliment composé
	2	0	0	100	herbe
densités de bifidobactéries / de fèces	1	$<1,8 \cdot 10^3$	$<1,8 \cdot 10^3$	$<1,8 \cdot 10^3$	
	2	$<2,9 \cdot 10^4$	$<2,9 \cdot 10^3$	$<2,9 \cdot 10^4$	
densités de germes totaux / de fèces	1	$1,6 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^3$	$1,8 \cdot 10^3$	
	2	$5,8,10^5$	$8,7 \cdot 10^4$	$1,2 \cdot 10^3$	

## origine des prélèvements: poules

	n° du prélèvement	milieu COLUMBIA	milieu BIM 25	milieu de BEERENS	ALIMENTATION
% de bifidobactéries	1	0	0	0	aliment composé
	2	0	/	8	aliment composé
	3	0	0	10	aliment composé
	4	44	71	55	grains, herbe
	5	0	0	0	aliment composé
	6	0	0	0	aliment composé
	7	0	0	0	aliment composé
densités de bifidobactéries / de fèces	1	$<7,5 \cdot 10^5$	$<7,5 \cdot 10^4$	$<7,5 \cdot 10^4$	
	2	$<9 \cdot 10^4$	$<9 \cdot 10^3$	$7,5 \cdot 10^4$	
	3	$<6,4 \cdot 10^6$	$<6,4 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^5$	
	4	$2,2 \cdot 10^8$	$3,6 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^8$	
	5	$<3 \cdot 10^7$	$<3 \cdot 10^7$	$<3 \cdot 10^7$	
	6	$<2,2 \cdot 10^8$	$<2,2 \cdot 10^7$	$<2,2 \cdot 10^7$	
	7	$<4,7 \cdot 10^7$	$<4,7 \cdot 10^5$	$<4,7 \cdot 10^6$	
densités de germes totaux / de fèces	1	$4,5 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^7$	$3,7 \cdot 10^7$	
	2	$9,10^6$	$<9,10^3$	$9 \cdot 10^5$	
	3	$1,2 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^7$	$6,4 \cdot 10^6$	
	4	$5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^8$	
	5	$2 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^8$	$9 \cdot 10^8$	
	6	$6,7 \cdot 10^9$	$1,3 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^9$	
	7	$3,7 \cdot 10^8$	$8,0 \cdot 10^6$	$9,4 \cdot 10^7$	

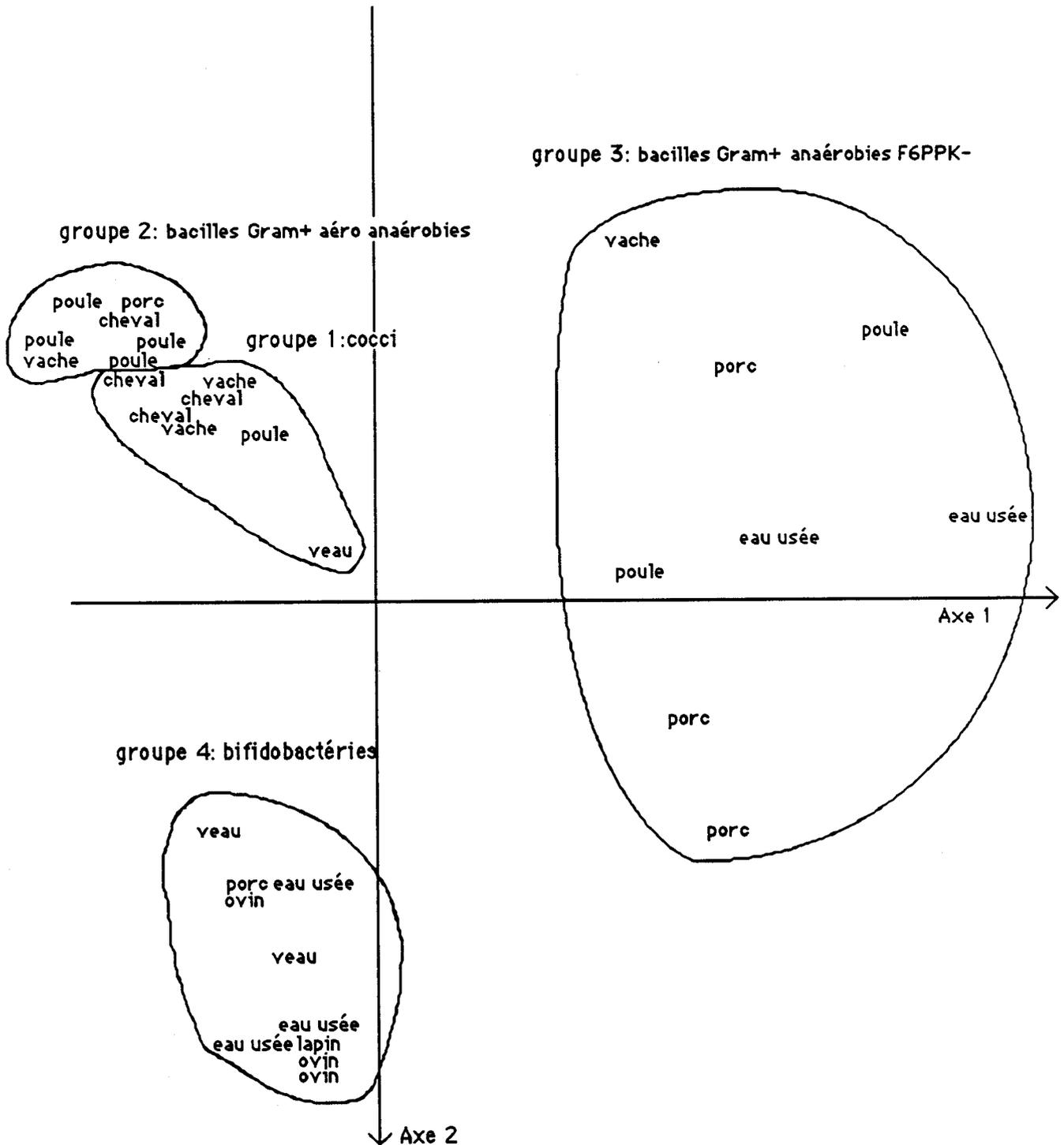
## ANNEXE 8

## ANALYSE FACTORIELLE DISCRIMINANTE

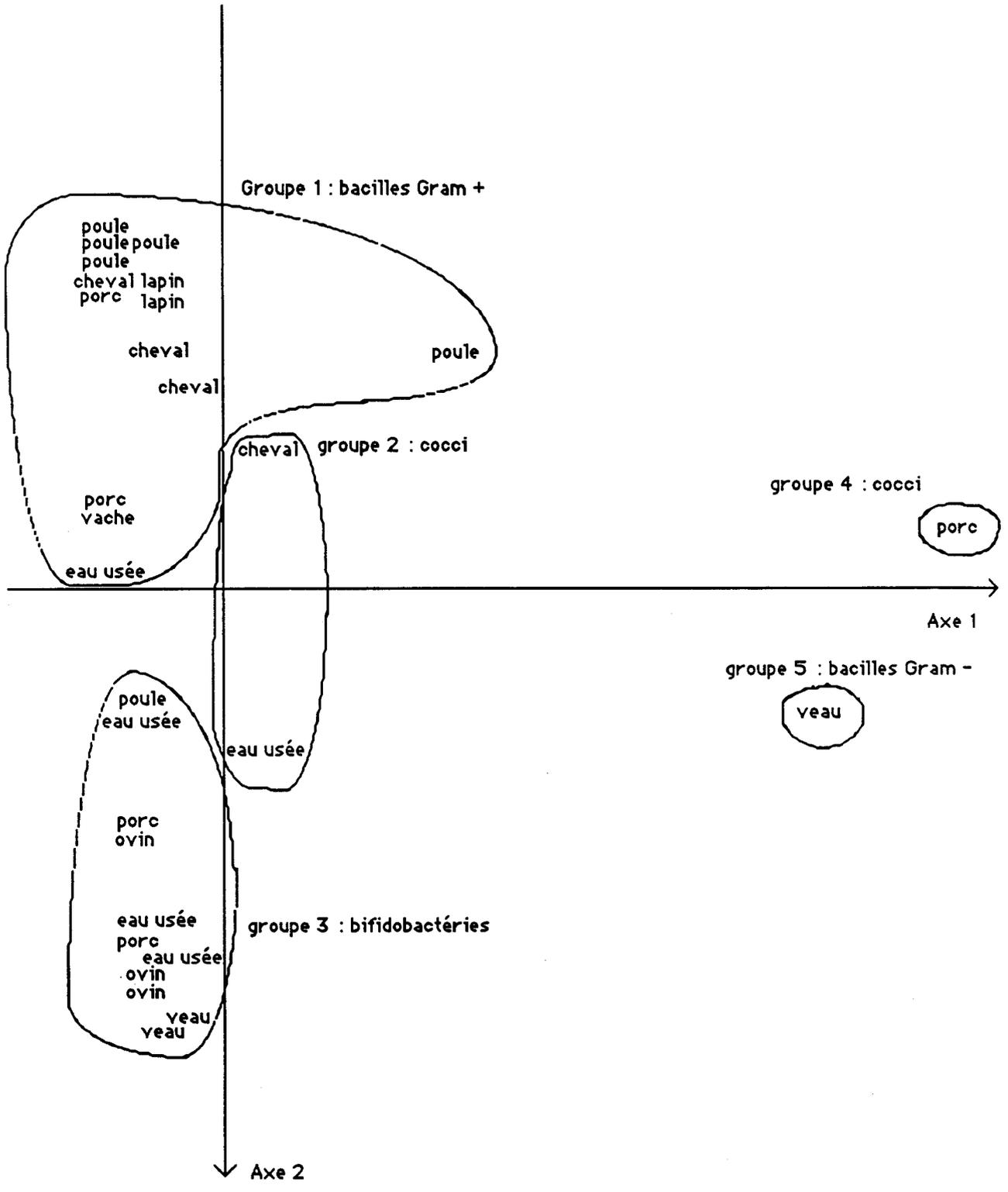
Répartition de la flore se développant sur les milieux de Beerens, BIM 25 et Columbia Cystéiné

Nous avons reporté la flore dominante pour chaque groupe sur les 3 schémas

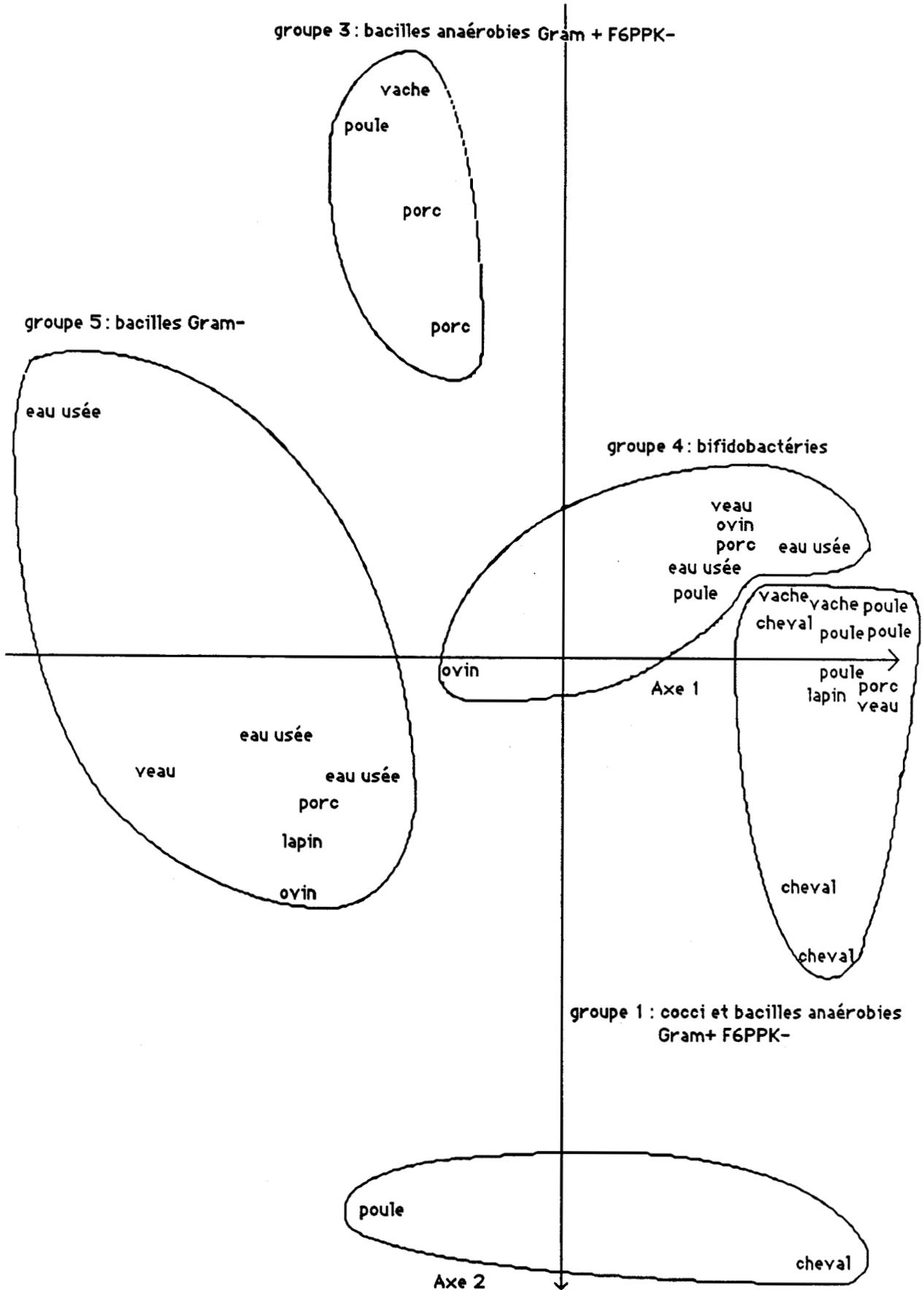
## MILIEU DE BEERENS



MILIEU BIM 25



MILIEU COLUMBIA CYSTEINE







## Croissance des souches de bifidobactéries de collection

souches d'origine animale ou provenant d'eaux usées.

souche	<i>B. animalis</i>	<i>B. animalis</i> <sup>T</sup>	<i>B. pullorum</i> <sup>T</sup>	<i>B. magnum</i> <sup>T</sup>	<i>B. magnum</i>	<i>B. boum</i> <sup>T</sup>	<i>B. suis</i> <sup>T</sup>
température	ATCC 27536	ATCC 25527	DSM 20433	DSM 20 222	ATCC 27682	ATCC 27917	DSM 20211
47°C	-	-	-	-	-	-	-
46°C	+	-	+	-	-	+	-
45°C	+	+	+	-	-	+	+
44°C	+	+	+	+	-	+	+
43°C	+	+	+	+	+	+	+

souche	<i>B. gallinarum</i>	<i>B. thermophilum</i> <sup>T</sup>	<i>B. thermophilum</i>	<i>B. choerinum</i> <sup>T</sup>
température	ATCC 33777	DSM 20210	ATCC 25866	ATCC 27686
47°C	-	-	-	-
46°C	+	+	+	-
45°C	+	+	+	+
44°C	+	+	+	+
43°C	+	+	+	+

souche	<i>B. cuniculi</i> <sup>T</sup>	<i>B. asteroides</i> <sup>T</sup>	<i>B. indicum</i> <sup>T</sup>	<i>B. coryneforme</i> <sup>T</sup>	<i>B. globosum</i> <sup>T</sup>	<i>B. globosum</i>
température	ATCC 27916	DSM 20089	ATCC25912	ATCC 25911	ATCC 25865	ATCC 25864
47°C	-	-	-	-	-	-
46°C	-	-	-	-	-	-
45°C	+	-	-	-	-	-
44°C	+	-	-	+	+	+
43°C	+	+	+	+	+	+

souche	<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. pseudolongum</i> <sup>T</sup>	<i>B. pseudolongum</i>	<i>B. minimum</i> <sup>T</sup>	<i>B. subtile</i>	<i>B. subtile</i> <sup>T</sup>
température	DSM 200095	ATCC 25526	DSM 200096	ATCC 27538	ATCC 27683	ATCC 27537
47°C	-	-	-	-	-	-
46°C	+	-	+	-	-	-
45°C	+	+	+	-	+	+
44°C	+	+	+	-	+	+
43°C	+	+	+	+	+	+

## Croissance des souches de bifidobactéries de collection

## souches d'origine humaine

souche	<i>B. angulatum</i> <sup>T</sup> ATCC 27535	<i>B. angulatum</i> ATCC 27670	<i>B. breve</i> <sup>T</sup> NCFB 2257	<i>B. pseudocatenulatum</i> <sup>T</sup> DSM 20438	<i>B. pseudocatenulatum</i> DSM 20439
température					
46°C	-	-	-	-	-
45°C	-	-	-	+	+
44°C	-	-	-	+	+
43°C	-	+	+	+	+
42°C	+	+	+	+	+

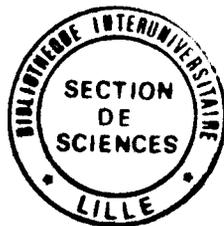
souche	<i>B. infantis</i> <sup>T</sup> ATCC 15697	<i>B. bifidum</i> DSM 20082	<i>B. longum</i> <sup>T</sup> ATCC 15707	<i>B. gallicum</i> <sup>T</sup> DSM 20093	<i>B. dentium</i> <sup>T</sup> ATCC 27534	<i>B. dentium</i> ATCC 27678	<i>B. dentium</i> ATCC 27679
température							
46°C	-	-	-	-	-	-	-
45°C	-	-	-	-	-	-	-
44°C	-	-	-	+	-	-	-
43°C	-	+	-	+	-	+	+
42°C	+	+	+	+	+	+	+

souche	<i>B. catenulatum</i> <sup>T</sup> ATCC 27539	<i>B. catenulatum</i> ATCC 27675	<i>B. catenulatum</i> ATCC 27676	<i>B. adolescentis</i> <sup>T</sup> ATCC 15703	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15706	<i>B. adolescentis</i> ATCC 15705
température						
46°C	-	-	-	-	-	-
45°C	+	-	+	-	-	-
44°C	+	-	+	-	-	-
43°C	+	-	+	+	+	-
42°C	+	+	+	+	+	+

## ANNEXE 10

## DESCRIPTION DES ECHANTILLONS (STATIONS D'EPURATION ET ABATTOIRS)

SIGLE	DESCRIPTION
Pm	Pont à Marq : Effluent dilué d'un lotissement , usine de développement photos reliée à la station => arrivée de chrome
Ph	Phalempin: regroupe plusieurs villages
At	Attiches: effluent concentré (lotissement)
G	Gondecourt: effluent humain mais aussi industriel.
A1	Abattoirs de Lille: eau d'écoulement lavage des panses de bovins
A2	Abattoirs de Lille: eau de lavage des tripes de bovins
A3	Abattoirs Caby: rigole de lavage des porcs
A4	Abattoirs Caby: bassin d'épuration
A5	Abattoirs de Lille : eau de lavage des intestins de porcs
A6	Station de relèvement de Lille: dégrillage (réseau Abattoir)
H7	" " (réseau humain, urbain)
A8	Abattoirs de Douai: eau de lavage (porcs et bovins) après le dégrillage dégraissage
H9	Station d'épuration (dégrillage) de Bailleul
H10	Station de relèvement bouchée : rejet d'un lotissement dans un fossé à ciel ouvert
H11	Fossé à ciel ouvert: rejet urbain et industriel textile
A15	Egout d'abattoir de Bailleul (ovins, porcins, bovins)
H16	Morbecque: eau usée urbaine bouche d'égout derrière l'abattoir
A17	" " : eau usée provenant des abattoirs de volailles (Vandewoorde)
A18	Hazebrouck: Abattoirs de porcs: eau de lavage des tripes (+sang)
A19	" " : Abattoirs de porcs: eau de lavage des tripes (effluent clair)
A20	Steenbecque: Sortie effluent de porcherie dans fossé à ciel ouvert
A21	" " : 300 m du point A20
A22	St Omer : eau de lavage des porcs
A23	" " : eau de lavage des bovins
A24	Steenvoorde: Station 'd'épuration' = bassin tampon: effluent de lavage des porcs



## RESUME

L'origine (humaine ou animale) de la pollution fécale d'une eau de surface peut être déterminée par l'étude (l'examen) des micro-organismes provenant du tractus intestinal des humains et des animaux.

Le rapport des densités de *E. coli* aux densités de streptocoques fécaux, les profils enzymatiques de ces germes et leur résistance aux antibiotiques n'apportent guère de renseignements sur l'origine de la contamination fécale. En revanche, la recherche des *Streptococcus bovis*, espèce caractéristique des fèces de bovins et de porcins, paraissait intéressante à développer. En associant une technique de dénombrement des streptocoques fécaux (sur microplaque à 96 puits) dans un milieu sélectif (milieu MUD) et la mise en évidence d'une activité enzymatique libérant un composé fluorescent, il a été possible en effet de distinguer *S. bovis* des entérocoques dans les matières fécales, par son incapacité à réduire le Chlorure de Triphényl Tétrazolium incorporé dans le milieu. Cependant, la fragilité de ce germe et son temps de survie très court dans l'eau rendent difficile sa recherche dans le milieu naturel.

En revanche, les bifidobactéries dont les densités dans les eaux de surface sont élevées et très bien corrélées à celles des *E. coli*, appartiennent à des espèces d'origine soit exclusivement humaine soit exclusivement animale. Elles sont différenciables par des tests biochimiques, comme l'ont montré les résultats de l'analyse taxonomique de 156 souches. A partir des données de l'analyse numérique, cinq caractères discriminants ont été sélectionnés afin de caractériser l'appartenance des souches à des groupes humains ou animaux.

Ainsi, l'origine des colonies de bifidobactéries se développant sur le milieu sélectif de Beerens ensemencé avec des eaux peut être déterminée par un kit comprenant la fermentation du sorbitol, du D-xylose, du mélézitose, du raffinose et la croissance à 45°C.