

# Étude expérimentale de l'adhésion des œufs d'helminthes (*Ascaris suum*) : conséquences pour l'environnement

Experimental study of the helminth eggs adhesion (*Ascaris suum*): analysis of the environmental implications

P.G. GASPARD<sup>1</sup>, J. WIART<sup>2</sup>, J. SCHWARTZBROD<sup>1</sup>

Reçu le 10 février 1994, accepté le 19 septembre 1994\*.

## SUMMARY

The intestinal nematodes use the environmental medium to realize their infestation cycle with eggs. In this study, the ability of helminth eggs to create binding in laboratory conditions is evaluated. This information will allow a better knowledge of the characteristics and the behaviour of the eggs in the environment and will give beginning of answer to the main question: are the nematodes eggs bound to surfaces and particularly to suspended matter in the environment or free particles?

For this study, the model used is the *Ascaris* eggs collected in the end of the womb in order to work with fertile coated eggs. They seem to be the most common form found when the eggs are quantified in the water or wastewater medium. However, the aggregate in the suspension create difficulties for the counting and give a protect effect of the outer layer for the eggs into the aggregate. Physically, the aggregate properties are also different from the properties of one isolated egg. To spread out the eggs without bringing modifications of the egg coating, one filtration is performed on 100 µm filter to eliminate the aggregate higher or equal to 4 eggs. Before the study, a possible adhesion on the laboratory materials is performed.

On glass materials, a strong adhesion is observed with 32.5% of eggs on the surfaces; on the other hand, on polypropylen and on polystyren, the adhesion is less important, respectively 9.1 and 15.7% are adsorbed with a significant difference between these two results. Then for this work, polypropylen and polystyren materials are used. In deionised water (pH 6) with one 15 min stirring at 15 rpm, the behavior of the *Ascaris* eggs is studied on two surfaces glass powder which is hydrophil particles with electronegative charges and talc which is hydrophob flakes with electronegative charges too. The results show a small adhesion on the hydrophob surfaces (1.3%) for a percentage of 75% on the hydrophil particles

1. Faculté de Pharmacie, 5 rue A. Lebrun, BP 403, 54001 Nancy Cedex (France).  
2. ADEME, 2 Square Lafayette, BP 406, 49004 Angers (France).

\* Les commentaires seront reçus jusqu'au 31 juillet 1995.

with the glass powder. In the same experimental conditions, the adhesion on hydrophil surfaces is confirmed with two other adhesion media: the muscovite and the glass wool which show a significant adsorption (96 and 98.5 %). On glass powder, the adhesion characteristics are developed with the study of 5 parameters: the contact time, the adhesion medium concentration, the pH, the temperature and the ionic concentration. For a low glass powder concentration (1g/l), a good adhesion is obtained with 65% of eggs bound. The adsorption is obtained rapidly, 55% are already bound after 30 sec. The pH increases significantly the adhesion at the value 9 and an important decrease is observed at the low and high temperatures (2 and 60°C). To complete this study, reagents used as desorption solution in the analytical techniques for the research of the helminth eggs in wastewater are tested. The eluting solutions as formalin and detergents increase in a considerable proportion the percentage of eggs non adsorbed, the outer layer properties could be modified by these reagents. For the sodium hypochlorite solution, the activity is stronger. This reagent eliminates the egg adhesion with only 0.1 percent of eggs bound. The action on the outer layer could be a destruction and then the loss of the adhesion properties. The practical implications of these adhesion properties are considerable: the wastewater depuration by physico-chemical treatments with the possibility of adhesion on floc particles for the eggs; the adhesion to the soil particles avoiding percolation and then the eggs accumulation in depth; on vegetables irrigated with wastewater the adsorption can improve the contamination and for the analytical techniques used to quantify parasite eggs in aqueous medium, we have to overcome the problem of the adhesion to the supports, with the use of eluting solution like sodium hypochlorite.

**Key-words :** adhesion, helminth eggs, *Ascaris*, environment, wastewater.

## RÉSUMÉ

Les œufs de nématodes sont présents dans les eaux usées et dans les boues résiduelles. Suite à ce constat, l'objectif de ce travail est la mise en évidence d'une éventuelle capacité d'adhésion par contact et fixation des œufs sur différentes surfaces. L'œuf d'*Ascaris* a été utilisé comme modèle et divers paramètres susceptibles d'intervenir ou de modifier les interactions ont été testés. Sur les matériaux de laboratoire, 32,5 % des œufs se fixent sur les tubes de verre contre respectivement 15,7 % et 9,1 % sur des tubes en polystyrène et en polypropylène. En eau désionisée, les œufs montrent une forte capacité d'adhésion sur le support hydrophile avec 75 % d'œufs fixés sur les particules de poudre de verre contre uniquement 1,3 % sur les feuillets hydrophobes de talc. L'adhésion sur la poudre de verre est très rapide avec 55 % des œufs fixés après 30 secondes. En présence d'une charge en adsorbant de 10 g/l, pour une valeur de pH égale à 9 et pour les concentrations ioniques ( $\text{CaCl}_2$  et  $\text{NaCl}$  0,9M), l'adhésion des œufs sur la poudre de verre atteint 99 %. Cependant, des températures égales à 2 °C et  $\geq 60$  °C ou l'utilisation de solutions éluantes, (hypochlorite de sodium, formaldéhyde, détergents anionique et cationique) diminuent les phénomènes d'adhésion avec en particulier l'hypochlorite de sodium à 2° chl qui les supprime totalement. Toutes ces informations indiquent que l'adhésion intervient de manière importante. En effet, lors du traitement des effluents, ce phénomène favorise l'épuration par adhésion des œufs au floc de matière organique avec cependant transfert de contaminants dans les boues.

Dans les sols et sur les végétaux, l'adhésion favorise la contamination parasitaire des surfaces. L'utilisation d'effluents ou de boues contaminées devra impérativement respecter les normes ou les recommandations destinées à protéger des risques de transmission à l'homme et aux animaux.

**Les techniques destinées à évaluer la contamination parasitaire d'échantillons de l'environnement sont dépendantes de ces phénomènes d'adhésion, l'utilisation de solutions éluantes et notamment d'hypochlorite de sodium est indispensable.**

**Mots clés :** adhésion, œufs d'helminthes, *Ascaris*, environnement, eau usée.

## 1 – INTRODUCTION

Des œufs de nématodes sont présents dans les eaux usées, dans l'environnement et dans les boues. Pour mieux connaître leur comportement dans ces milieux, il est important de déterminer la capacité d'adhésion de ces œufs. Ce terme d'adhésion englobe un ensemble de phénomènes physico-chimiques couramment présentés lors de l'association de micro-organismes à des surfaces (MARSHALL et BITTON, 1980). Cette propriété de se fixer est un facteur favorable dans le traitement des eaux usées avec élimination des œufs de nématodes par adhésion au floc et donc production d'une eau utilisable pour l'irrigation (CSHPF, 1991 – HESPANHOL et PROST, 1994). Cependant, l'adhésion devient un facteur défavorable avec la dissémination et la transmission des nématodes par fixation sur les particules de terre et sur les végétaux, l'adhésion limite également les phénomènes de percolation et de lessivage. Il convient donc d'être parfaitement vigilant lors de l'utilisation en valorisation agricole des boues et des eaux épurées. Pour évaluer le risque sanitaire, la mise en évidence des œufs et leur dénombrement sont importants, mais les difficultés relatives à la grande diversité des milieux étudiés sont connues et doivent être résolues. Pour y parvenir, l'activité et la composition des solutions éluantes devraient être prises en compte et parfaitement étudiées.

## 2 – MATÉRIEL

### 2.1 Œufs d'*Ascaris* de porc

Ils sont obtenus par dissection de vers femelles (*Ascaris suum*) récupérés au moment de l'abattage des porcs. À l'issue de la dissection, l'appareil génital est dilacéré dans de l'eau désionisée. Cette suspension est ensuite filtrée sur un tamis métallique (ouverture de maille : 2 mm) afin d'éliminer les débris grossiers.

Pour travailler avec une suspension standardisée d'œufs d'*Ascaris*, seuls les œufs récupérés au niveau de la partie terminale l'utérus sont utilisés. Néanmoins la présence importante d'agrégats dans toutes ces suspensions engendre des difficultés de comptage et induit une modification des propriétés de surface de ces œufs par des phénomènes de protection intra-amas. Il est donc nécessaire dans l'optique de la standardisation de la suspension d'œufs d'*Ascaris* de procéder à l'élimination des agrégats. Cette dernière peut être

réalisée selon 2 protocoles soit par ajout d'agents dispersants, soit par filtration. Afin d'éviter toute modification des propriétés de surface avec l'utilisation de réactifs dispersants, une filtration sur membrane présentant des ouvertures de mailles de 100  $\mu\text{m}$  a été réalisée. La suspension ainsi obtenue renferme dans une grande majorité des œufs isolés ou en agrégats de 2. Par conséquent, les suspensions d'œufs standardisées sont préparées par dilacération de l'utérus d'*Ascaris* de porc dans de l'eau désionisée, filtration sur mailles de 100  $\mu\text{m}$ , lavage en eau désionisée (3 x) et stockage à + 4 °C. Pour les expérimentations une suspension à 150 œufs/ml est utilisée.

## 2.2 Membrane de filtration

(Réf. : Scrynel NYHC Nylon, Polylabo 87410) ouverture de maille 100  $\mu\text{m}$ .

## 2.3 Matériaux pour l'étude de l'adhésion

- Tubes :
  - Polystyrène (16 x 125, réf. : Polylabo 19035).
  - Verre (16 x 125, réf. : Polylabo 07427).
  - Polypropylène (17 x 120, réf. : Polylabo 19293).

## 2.4 Supports étudiés

- Talc 1 : origine : Luzenac, Ariège, France. Monocristaux des dolomies du toit, silicate hydraté de magnésium. Matériau à charges de surface négatives, propriétés hydrophobes et structure lamellaire.

- Muscovite 1 : origine : Pegmatite, Bihar, Inde. Silicate d'aluminium et de potassium. Matériau à charges de surface négatives, propriétés hydrophiles et structure lamellaire.

- Poudre de verre (réf. : Sovirel 4585.10). Verre boro-silicaté. Matériau à charges de surface négatives, propriétés hydrophiles et structure particulaire.

- Laine de verre (réf : Rantigny 725, Saint Gobain). Verre sodo-calcique. Matériau à charges de surface positives, propriétés hydrophiles, diamètre des fibres : 5 à 6  $\mu\text{m}$ .

# 3 – MÉTHODES

## 3.1 Protocole d'étude de l'adhésion sur les divers supports

- *Étude de l'adhésion sur les divers supports :*
  - Mise en suspension du support dans 9 ml de solution de composition parfaitement définie (eau désionisée, eau désionisée dont le pH est ajusté

1. L'analyse des propriétés de surface a été réalisée par le Laboratoire « Environnement et Minéralurgie, Nancy » Pr. CASES.

extemporanément à des valeurs de 2, 6, 9 avec HCl et NaOH 0,5 N, solutions ioniques : NaCl 0,09 et 0,9M, CaCl<sub>2</sub> 0,09 et 0,9M, solutions éluantes : tabl. 2).

– Contamination du support avec 1 ml d'une suspension d'œufs d'*Ascaris* réalisée avec la même solution chimique et d'un titre de 150 œufs/ml.

– Agitation de 30 sec. à 30 min. à 15 rpm (rotation de 360° sur appareil Rotamix).

– Détermination du pourcentage d'œufs fixés :

– sur poudre de verre : cette valeur est directement obtenue par dénombrement des œufs présents sur les particules après sédimentation de la poudre de verre et élimination du surnageant,

– sur le talc, la muscovite, la laine de verre : 5 ml de solution sont prélevés, centrifugés à 600 g pendant 5 min,

– les culots précédents sont remis en suspension dans de l'eau désionisée et ajustés à un volume de 1 ml pour la poudre de verre et à un volume de 0,5 ml pour les 3 autres supports,

– le dénombrement est effectué entre lame et lamelle, 3 fois 150 µl sont analysés par échantillon.

## 4 – RÉSULTATS

### 4.1 Comportement vis-à-vis des matériaux de laboratoire

L'affinité des œufs d'*Ascaris* en suspension dans de l'eau désionisée à pH 6 a été testée vis à vis de tubes en verre, en polypropylène et en polystyrène. Les résultats du tableau 1 montrent que 32,5 % des œufs d'*Ascaris* se fixent sur le verre. En revanche le polystyrène et le polypropylène limitent ces phénomènes avec respectivement 15,7 et 9,1 % d'œufs présents sur les parois.

Tableau 1 Adhésion sur matériaux de laboratoire.

Table 1 Adhesion on laboratory materials.

Matériaux	% d'œufs fixés
Verre	32,5* ± 4,3
Polypropylène	9,1 ± 4,2
Polystyrène	15,7 ± 2,5

\* : valeur moyenne sur 12 analyses, agitation 15 min. à 15 rpm.

L'ensemble des expérimentations a donc été réalisé avec du matériel en polypropylène pour les tubes et en polystyrène pour les pipettes.

### 4.2 Étude de la capacité d'adhésion des œufs d'*Ascaris*

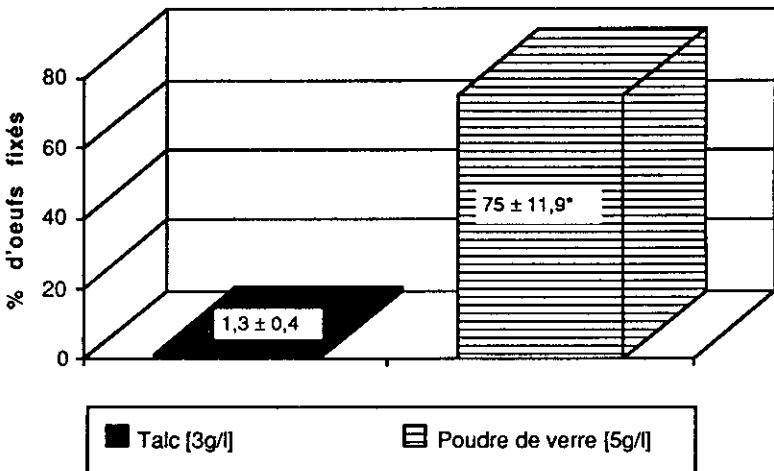
Elle a été étudiée à partir de 2 matériaux : le talc dont les particules sont hydrophobes et la poudre de verre présentant une surface hydrophile. L'expé-

rience est réalisée à pH 6 en eau désionisée avec une agitation de 15 min. à 15 rpm. À ce pH, les charges de surface sont négatives pour les deux supports. Les résultats (fig. 1) montrent une très faible adhésion sur support hydrophobe avec seulement 1,3 % des œufs fixés sur le talc, en revanche sur la poudre de verre hydrophile, le pourcentage d'œufs retrouvés est de 75 %.

L'adhésion des œufs d'*Ascaris* se réalise donc de préférence sur des supports à caractère hydrophile. Avec une fixation de 96 et 98,5 % des œufs, les résultats précédents ont été confirmés dans les mêmes conditions expérimentales pour deux autres supports hydrophiles, la muscovite à une concentration de 3 g/l et la laine de verre à une concentration de 2g/l.

Les caractéristiques de l'adhésion sur poudre de verre ont été précisées avec l'étude de différents paramètres : concentration en support d'adhésion (fig. 2), temps de contact (fig. 3), pH (fig. 4), température (fig. 5), concentration ionique (fig. 6). Les conditions expérimentales sont celles fixées dans l'étude précédente (i.e. concentration en poudre de verre 5g/l, eau désionisée pH 6, agitation 15 min. à 15 rpm avec un nombre d'échantillon égal à 8).

L'analyse des résultats permet de dégager quelques tendances. L'adhésion en eau désionisée est toujours importante même à faible concentration en poudre de verre ; en effet à une concentration de 1g/l, 65 % des œufs sont déjà fixés. C'est un phénomène très rapide puisque au bout de 30 secondes de contact, 55 % des œufs sont déjà retrouvés sur le support. Pour une gamme de pH s'échelonnant de 2 à 9, le pourcentage d'œufs sur la poudre de verre varie peu (de 75 %  $\pm$  11,9 à 100 %  $\pm$  9), avec cependant une augmentation significative à pH 9. L'affinité des œufs pour le support est fortement dépendante de la température puisque à 2°C seulement 1 % d'œufs sont



\* Valeur moyenne sur 8 expériences

Figure 1 Adhésion des œufs d'*Ascaris* sur différents supports.  
*Ascaris eggs adhesion on different surfaces.*

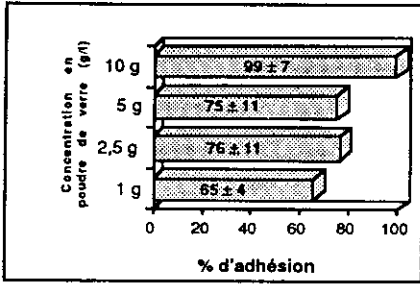


Figure 2 Affinité en fonction de la concentration en support.  
*Affinity in relation with the glass powder concentration.*

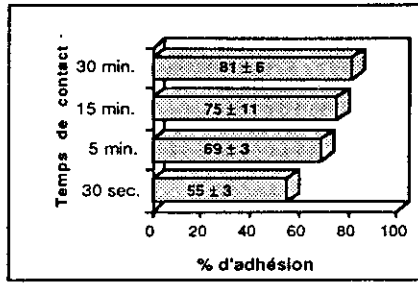


Figure 3 Affinité en fonction du temps de contact.  
*Affinity in relation with the contact time.*

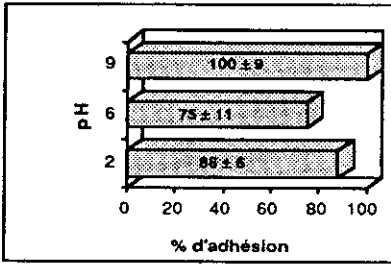


Figure 4 Affinité en fonction du pH.  
*Affinity in relation with pH.*

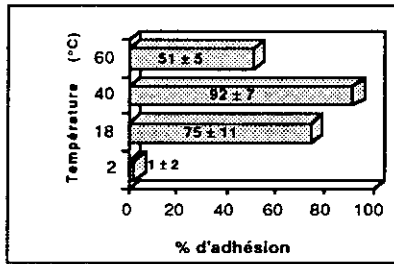


Figure 5 Affinité en fonction de la température.  
*Affinity in relation with the temperature.*

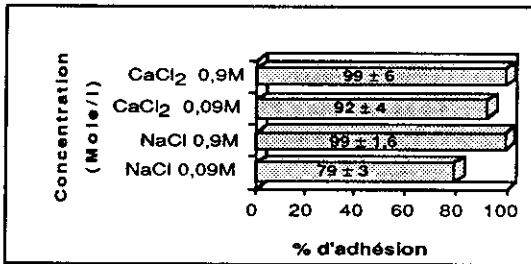


Figure 6 Affinité en fonction de la concentration ionique.  
*Affinity in relation with the ionic concentration.*

fixés et respectivement 75 % ± 11 et 92 % ± 7 à 18°C et 40°C. À 60 °C, l'adhésion des œufs diminue mais à cette température (limite de viabilité pour l'œuf d'*Ascaris*) il pourrait y avoir une modification de la couche externe. Enfin, avec les solutions salines testées, l'adhésion croît avec la concentration

ionique. Globalement l'étude de tous ces paramètres montre que les œufs ont une grande capacité d'adhésion. Par conséquent, la recherche des œufs d'helminthes à partir de prélèvements environnementaux doit intégrer cette propriété. Dans cette optique les différents réactifs préconisés pour éluer les œufs d'helminthes de leur support ont été évalués, en étudiant dans les mêmes conditions que précédemment leur impact sur l'adhésion des œufs sur la poudre de verre.

Le tableau 2 montre que les détergents ou le formaldéhyde diminuent fortement la capacité d'adhésion, cette chute est sans doute liée à une modification des propriétés de surface. L'hypochlorite de sodium supprime pratiquement totalement toutes les propriétés de fixation de l'œuf avec seulement 0,1 % d'œufs retrouvés sur la poudre de verre. Cette observation est sans doute à relier avec une destruction de la couche externe de l'œuf visible à l'examen microscopique.

**Tableau 2** Étude de l'activité de différentes solutions éluantes.

**Table 2** Study of the desorption solutions activity.

Réactif	% d'œufs fixés
Eau désionisée	85 ± 11*
N Dodécyl pyridinium chlorure (0,1 %) (Détergent cationique)	20 ± 4
Sodium dodécyl sulfate (0,1 %) (Détergent anionique)	21 ± 3
Formaldéhyde (10 %)	40 ± 8
Hypochlorite de sodium (2° chloro.)	0,1 ± 0,4

\* : valeur moyenne sur 8 expériences.

## 5 – DISCUSSION – CONCLUSION

Le développement d'un modèle expérimental a nécessité la mise au point d'un protocole de collecte des œufs différent de ceux proposés par différents auteurs, RUDOLF *et al.* (1951), JACKSON *et al.* (1978), STIEN (1989), BOISVENUE (1990). En effet, l'étude du comportement des œufs avec notamment l'évaluation de leur capacité d'adhésion (KAGEI, 1983) ont imposé de travailler avec des œufs possédant une couche externe complète. Cette forme est également la plus rencontrée lors de l'analyse dans les échantillons de l'environnement. Par conséquent, l'utilisation de « mixer » par JACKSON (1978) ou de NaOH 0,5 N et d'acide peracétique 5 % par BOISVENUE (1990) étaient contre-indiquées. De même la simple dilacération préconisée par STIEN (1989) et RUDOLF *et al.* (1951) n'a pas été retenue car la suspension d'œufs obtenue était très riche en agrégats. L'examen systématique de l'appareil génital femelle a montré que dans la partie terminale de l'utérus, les œufs possédaient une couche externe d'origine utérine. Au-delà des 3 à 5 premiers millimètres, la suspension d'œufs obtenue renferme des œufs à structure plus ou



moins complète. L'élimination des agrégats constitués de 4 œufs et plus est obtenue par filtration (porosité 100  $\mu\text{m}$ ). Le comportement de ces œufs testé vis-à-vis de différents matériaux de laboratoire (verre, polystyrène, polypropylène) montre une grande affinité pour le verre (32,5 %) et une très faible adhésion (9,1 %) sur le polypropylène qui a donc été utilisé pour l'expérimentation.

Les œufs d'*Ascaris* ont présenté une grande capacité d'adhésion sur les supports hydrophiles étudiés (poudre de verre, muscovite et laine de verre). Une étude plus focalisée sur poudre de verre a permis de caractériser cette adhésion, avec la limite représentée par la taille des œufs (50-70  $\mu\text{m}$ ). En effet, avec des particules de cette dimension, les mesures classiques de  $\text{pH}_i$  ne sont pas réalisables.

Dans notre modèle, les œufs se fixent très rapidement sur la poudre de verre ce qui indique une forte faculté d'adhésion, ce phénomène reste cependant dépendant de la charge en adsorbant. En effet, seule la présence d'une forte charge de poudre de verre, permet une fixation maximale des œufs. Par conséquent, dans les milieux fortement chargés en matière organique (eau usée brute, boues primaires), il existe une forte probabilité de retrouver les œufs sur un support. Cependant, de nombreux paramètres peuvent interférer.

Dans notre étude, il a été observé une amélioration de la fixation des œufs sur poudre de verre avec des solutions à pH 9 ou des solutions ioniques. BAILLENGER (1979) avait également montré une modification des propriétés de surface des œufs d'*helminthe* en fonction de la nature des solutions utilisées pour leur conservation. Il avait aussi constaté une variation de la balance lipophile/hydrophile suivant le pH. En cas de traitement physico-chimique des eaux, ces indications laissent penser que l'élimination des œufs sera dépendante de la teneur en agent floculant ainsi que du pH de l'eau traitée. Étant donné, l'hétérogénéité des milieux concernés susceptibles de modifier les propriétés des surfaces des œufs, il conviendra cependant d'évaluer sur le terrain les paramètres capables d'améliorer l'épuration. Dans notre étude, l'adhésion est également dépendante de la température, démontrant ainsi l'influence de facteurs physiques sur l'adhésion et donc sur les propriétés de la couche externe. De même la nature complexe (mucopolysaccharridique, protéique et lipidique) de la couche externe (WHARTON, 1980) suggère que les traitements biologiques pourraient modifier la capacité d'adhésion des œufs avec en partie une dégradation de cette couche par les micro-organismes.

L'étude de différentes solutions éluantes utilisées pour la recherche des œufs d'*helminthes* dans l'environnement a montré une nette supériorité de l'hypochlorite de sodium avec une suppression totale des phénomènes d'adhésion. Les mêmes solutions testées sur des sols contaminés artificiellement avec des œufs d'*Ascaris* ont confirmé l'efficacité de la solution d'hypochlorite de sodium (GASPARD et SCHWARTZBROD, 1993). Son activité doit résulter de l'action oxydante avec une destruction des liaisons établies entre l'œuf et les supports.

En conclusion, cette étude met en évidence une grande capacité d'adhésion des œufs d'*Ascaris*, cette caractéristique reste cependant dépendante du milieu avec une possible modification des propriétés de surface en fonction des conditions environnementales.

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce au support financier de l'ADEME et du NANCIE.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAILLENGER J., 1979. Mechanisms of parasitological concentration in coprology and their practical consequences. *J. Amer. Med. Technol.* 41, 65-71.
- BOISVENUE R.J., 1990. Effects of aeration and temperature in vitro and in vivo studies on developing and infective of *Ascaris suum*. *J. Helminthol. Soc. Wash.* 57 (1), 51-56.
- Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France, 1991. Recommandations sanitaires concernant l'utilisation, après épuration, des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation des cultures et espaces verts. juillet, 40 pages.
- GASPARD P., SCHWARTZBROD J., 1993. Irrigation with waste water : Parasitological analysis of soil. *Zbl. Hyg.* 193, 513-520.
- HESPAHOL I., PROST A.M.E., 1994. WHO guidelines and national standards for reuse and water quality. *Wat. Res.*, 28 (1), 119-124.
- JACKSON G.J., BIER J.W., RUDE R.A., 1978. Recycling of refuse into the food chain : the parasite problem. In : *Risk assessment and health effects of land application of municipal wastewater and sludges*, edited by SAGIN B.P., SORBER C.A., San Antonio (Texas) : 116-127.
- KAGEI N., 1983. Techniques for the measurement of environmental pollution by infective stage of soil-transmitted helminths. In : *Collected Papers on the Control of Soil-transmitted Helminthiases*, vol 2, edited by M. Yokogawa et al. (Tokyo : Asian Parasite Control Organization), 27-46.
- MARSHALL K.C., BITTON G., 1980. Microbial Adhesion in Perspective. In : *Adsorption of microorganisms to surfaces.*, edited by BITTON, G., MARSHALL, K. C., Wiley-Interscience Publication, 1-5.
- RUDOLF W., FALK L.L., RAGOTZWIE R.A., 1951. Contamination of vegetables grown in polluted soil, III Field studies of *Ascaris* eggs. *Sew. Ind. Waster*, 23, 656-660.
- STIEN J.L., 1989. Œufs d'helminthes et environnement : le modèle d'œufs d'*Ascaris*. Thèse université (METZ).
- WHARTON D.A., 1980. Nematode egg shells. *Parasitology*, 81, 447-463.