

EVOLUTION DES POPULATIONS DE BACTERIES MARINES HETEROTROPHES AU BASSIN DE CHASSE D'OSTENDE (BELGIQUE) EN 1971

by

Jo. PODAMO

RÉSUMÉ. — L'étude bactériologique de l'eau du bassin de chasse d'Ostende a été réalisée pendant la période de fermeture du bassin en 1971, soit du 31 mars au 29 juillet.

Les résultats montrent que différentes populations de bactéries marines hétérotrophes se succèdent pendant cette période. Cette conclusion découle de plusieurs types de données : 1 — comptage total des bactéries ; 2 — comptage séparé des bactéries à colonies blanches et colorées ; 3 — détermination grossière (morphologie, réaction de Gram) de quelques souches bactériennes.

Ces variations de populations pourraient être expliquées par des variations de la teneur de l'eau en matières organiques.

INTRODUCTION

Le bassin de chasse peut être considéré comme un milieu marin fermé, sans échange important avec l'extérieure, pendant la période de fermeture des écluses qui le relie au fond du port d'Ostende. C'est pourquoi il représente un biotope particulièrement favorable pour une étude écologique approfondie.

Dans ce cadre, nous nous sommes attachés à essayer de définir les populations de bactéries marines hétérotrophes et de détecter leur évolution.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Les échantillons sont prélevés dans des bouteilles stériles ; les ensemencements pour comptages sont réalisés en laboratoire, au maximum 4 heures après le prélèvement. Après dilutions dans de l'eau de mer vieillie et stérilisée, des parties aliquotes (0,05 ml) sont étalées à

l'aide d'une tige de verre coudée à la surface de boîtes de Petri contenant un milieu gélosé («Spread-plate method»).

Deux milieux de culture sont utilisés : le Marine Agar 2216 (DIFCO) pour les bactéries hétérotrophes marines, et le Nutrient Agar (BBL) pour les bactéries hétérotrophes d'eau douce.

Les incubations sont réalisées à $18^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$, à l'abri de la lumière.

2) Choix des conditions de comptage.

1° Comptage des colonies apparaissant sur des boîtes de Petri en fonction du temps d'incubation (tableau I). Le nombre de colonies par boîte augmente pendant plusieurs jours, puis se stabilise ; le résultat obtenu est comparable à celui de Persoone (1966). Il nous a conduit à compter, par la suite, toutes les boîtes après 4 et 12 jours d'incubation, définissant ainsi 2 classes de comptage. Aucune distinction entre ces 2 classes ne s'étant cependant révélée au cours du travail, nous n'utiliserons ici que le chiffre total obtenu après 12 jours d'incubation.

2° Comptage d'un même échantillon, après conservation au frigo (4°C).

Tableau I

*Conditions de comptages :
résultats de comptage en fonction du temps d'incubation
des boîtes de Petri et du temps de conservation au frigo.*

(Prélèvement : 13.2.1971)

Date d'ensemencement	Date de comptage	Nombre de bactéries aérobies par ml	
		marines	d'eau douce
13.2.1971 (0 jours de frigo)	16.2	$3,10 \cdot 10^5$	$1,35 \cdot 10^4$
	19.2	$5,15 \cdot 10^5$	$6, 0 \cdot 10^4$
	25.2	$6, 0 \cdot 10^5$	$1, 4 \cdot 10^5$
-au frigo jusqu'au) 15.2.1971	17.2	$7, 2 \cdot 10^4$	$7, 3 \cdot 10^3$
	20.2	$2, 9 \cdot 10^5$	$7, 5 \cdot 10^4$
	25.2	$3, 7 \cdot 10^5$	$1, 1 \cdot 10^5$
-au frigo jusqu'au) 20.2.1971	23.2	$2, 5 \cdot 10^6$	
	25.2	$2, 6 \cdot 10^6$	
	1.3	$2, 6 \cdot 10^6$	
-au frigo jusqu'au) 24.2.1971	26.2	$3, 4 \cdot 10^6$	$6, 2 \cdot 10^3$
	2.3	$4, 5 \cdot 10^6$	$2, 7 \cdot 10^4$

Il est connu que le contenu en bactéries d'un échantillon d'eau de mer évolue très rapidement lors de sa conservation. Il est dès lors utile de vérifier dans quelle mesure, en cas de nécessité, il est possible de conserver des échantillons au froid avant le comptage.

Les résultats de ce test (tableau I) montrent que les échantillons pourraient être conservés au frigo pendant 2 jours, sans modifier significativement les résultats du comptage. Cette possibilité n'a cependant pas été utilisée, tous les échantillons prélevés ayant pu être traités endéans les 4 heures qui suivent la récolte.

3° Reproductibilité des comptages.

Afin de tester la variabilité des résultats de comptage, un même échantillon a été compté en multipliant le nombre de boîtes de Petri. Le tableau II reprend les valeurs obtenues pour 2 échantillons équivalents (pris en même temps au même endroit).

4° Reproductibilité de l'échantillonnage.

D'autre part, on est amené à se demander dans quelle mesure un échantillon prélevé dans une masse d'eau est représentatif de cette masse d'eau.

Tableau II

Reproductibilité des comptages

Deux prélèvements simultanés (20.2.1971) subissent deux séries de dilution (10^{-2} , 10^{-3}) ; chaque tube de dilution sert à ensemercer 5 ou 10 boîtes de Petri.

Comptages après 4 jours d'incubation à 18°, en aérobiose.

Echan- tillon	Dilu- tion	Nombre moyen de colonies par boîte					
		Bactéries marines			Bactéries d'eau douce		
		nombre de boîtes	m	≧	nombre de boîtes	m	≧
1	10^{-2}	10	94.2	19.2	5	4.4	2.1
	10^{-3}	8	19.3	10.3	5	1.0	0.6
	10^{-2}	6	67.5	14.5	5	4.2	2.3
	10^{-3}	5	2.8	3.4			
2	10^{-2}	5	65.4	5.4	10	2.7	2.2
	10^{-3}	5	8.0	2.4			
	10^{-2}	5	80.0	8.7	10	2.9	1.9
	10^{-3}	5	3.6	3.5			

Afin de tester ce type de reproductibilité, une série de 10 échantillons ont été prélevés simultanément au même endroit, puis chaque échantillon a servi à ensemencer 3 boîtes de Petri pour le comptage des bactéries marines. Le tableau III montre que cette reproductibilité de l'échantillonnage est satisfaisante.

5° Conclusion : De l'ensemble de ces tests préliminaires (tableau I à III), nous tirons la conclusion qu'il suffit de prendre un échantillon par station ; une seule série de dilutions peut servir à ensemencer les boîtes de comptages ; chaque type de boîte de comptage est réalisé en 3 exemplaires équivalents.

RÉSULTATS DE L'ENQUÊTE BACTÉRIOLOGIQUE 1971 AU BASSIN DE CHASSE

a. *Analyse bactériologique globale du bassin.*

1° Bactéries hétérotrophes planctoniques «marines» et d'eau douce.

Des comptages réalisés à partir d'un même échantillon sur milieux riches marin et d'eau douce permettent de définir les proportions entre deux classes de bactéries hétérotrophes : les bactéries marines et estuariennes d'une part, d'eau douce d'autre part. Les proportions ob-

Tableau III

Reproductibilité de l'échantillonnage

Dix prélèvements identiques ont été réalisés simultanément (le 21.5.1971) ; chacun de ces échantillons a servi à ensemencer trois boîtes de comptages, à partir d'une dilution 10^{-1} .

Comptage le 31.5.1971 — Milieu marin — Aérobiose.

Echantillon	Nombre de colonies par boîte (moyenne de trois boîtes identiques)
1	117
2	97
3	77
4	104
5	92
6	100
7	105
8	71
9	95
10	70
moyenne	93

tenues sont les suivantes : les bactéries marines sont toujours majoritaires ; les bactéries d'eau douce représentent de 0,05 à 25% du nombre de bactéries marines (voir tableaux I, II et IV).

2° Bactéries aérobies et anaérobies.

De même, des bactéries d'un même échantillon ont été incubées en aérobie et en anaérobie.

Les nombres obtenus montrent que, dans l'eau, les bactéries aérobies sont nettement plus nombreuses ; dans la boue, par contre, le nombre relatif de bactéries anaérobies augmente (tableau V).

Tableau IV

Comparaison des résultats de comptage d'un même échantillon sur les milieux marins et d'eau douce

(ensemble des échantillons d'eau prélevés — résultats obtenus après 12 jours d'incubation, en aérobie)

Date	nombre de bactéries/ml	
	marines	d'eau douce
13.2.1971	3,8.10 ⁵	2,0.10 ⁴
20.2.1971	1,8.10 ⁵	8,3.10 ³
31.3.1971	4,5.10 ⁵	8,8.10 ³
12.4.1971	8,0.10 ⁴	1,0.10 ⁴
15.4.1971	5,6.10 ⁴	4,7.10 ³
22.4.1971	9,6.10 ⁴	2,4.10 ³
29.4.1971	5,7.10 ³	66
6.5.1971	1,3.10 ³	650
13.5.1971	1,2.10 ³	64
21.5.1971	1,8.10 ⁴	70
27.5.1971	2,4.10 ⁴	40
5.6.1971	2,8.10 ⁴	300
10.6.1971	1,3.10 ⁴	1,1.10 ³
24.6.1971	9,3.10 ⁴	900
1.7.1971	2,6.10 ⁵	400
8.7.1971	1,8.10 ⁵	426
16.7.1971	2,0.10 ⁵	26
23.7.1971	6,1.10 ⁴	54
29.7.1971	1,4.10 ⁵	1,5.10 ³
4.8.1971	5,4.10 ⁴	400
11.8.1971	1,4.10 ⁵	550
19.8.1971	3,5.10 ⁴	19
26.8.1971	3,5.10 ⁴	40
3.9.1971	1,2.10 ⁵	40
10.9.1971	2,6.10 ⁵	2,8.10 ³

Tableau V

Comptage des bactéries anaérobies

Les boîtes de comptage ont été incubées dans une jarre anaérobie (BBL).

Date	Echantillon	Nombre de bactéries/ml d'eau (ou par cc de boue)	
		marines	d'eau douce
31.3.71	eau	$2,5 \cdot 10^3$	$5,0 \cdot 10^3$
	BOUE	$4,0 \cdot 10^5$	$4,0 \cdot 10^5$
15.4.71	eau	$4,5 \cdot 10^3$	(- que 10^3)
	BOUE	$1,1 \cdot 10^6$	$2,0 \cdot 10^5$
13.5.71	eau	$5,2 \cdot 10^2$	
21.5.71	eau	$2,6 \cdot 10^3$	
	BOUE	$3,0 \cdot 10^3$	
27.5.71	eau	$2,6 \cdot 10^3$	
	boue	$3,0 \cdot 10^3$	
16.7.71	eau	$1,3 \cdot 10^5$	(- que 10^3)
29.7.71	eau	$4,10^4$	10^2

Tableau VI

*Comptage des bactéries aérobies de la boue
(point central)*

Date	Nombre de bactéries hétérotrophes de la boue/cc	
	marines	d'eau douce
31.3.1971	$5 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$
12.4.1971	$5,5 \cdot 10^4$	—
15.4.1971	$2,3 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^4$
22.4.1971	$3 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$
29.4.1971	$3 \cdot 10^5$	$1,5 \cdot 10^4$
6.5.1971	$4,4 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^5$
13.5.1971	$2 \cdot 10^6$	$7,7 \cdot 10^5$
27.5.1971	$4 \cdot 10^4$	—
5.6.1971	$3,6 \cdot 10^4$	$4,6 \cdot 10^3$
10.6.1971	$1,8 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^4$

Tableau VII

*Hétérogénéité de l'eau du bassin de chasse
au point de vue bactériologique*

Date	Nombre de bactéries aérobies marines/ml à la station (1)					
	1	2	3	3M	4	5
31.3			4,5.10 ⁵	4,0.10 ⁵		
12.4	8,7.10 ⁴		8,2.10 ⁴	7,1.10 ⁴		
15.4	2,6.10 ⁴	7.10 ⁴	5,1.10 ⁴	3,3.10 ⁴		10 ⁵
22.4	1,7.10 ⁵	10 ⁵	2.10 ⁴	4,2.10 ⁴	8,6.10 ⁴	1,6.10 ⁵
29.4			6.10 ³	6.10 ³		4,3.10 ³
6.5			1,7.10 ³	1,2.10 ³		4,7.10 ²
13.4			1,1.10 ³	7,4.10 ²		1,8.10 ³
21.5			1,4.10 ⁴	1,2.10 ⁴		
27.5	5.10 ⁴	2,5.10 ⁴	1,1.10 ⁴	4,2.10 ⁴	4.10 ³	1,4.10 ⁴
5.6	5.10 ⁴	2.10 ⁴	8.10 ³	1,4.10 ⁴	5.10 ⁴	2,7.10 ⁴
10.6			1,5.10 ⁴	1,9.10 ⁴		5,2.10 ³
24.6			10 ⁵	10 ⁵		8.10 ⁴
1.7			2.10 ⁵	1,7.10 ⁵		4.10 ⁵
8.7			1,8.10 ⁵	2,2.10 ⁵		1,6.10 ⁵
16.7			2,9.10 ⁵	2.10 ⁵		8.10 ⁴
23.7			6,1.10 ⁴			6,1.10 ⁴
29.7	2,4.10 ⁵	1,1.10 ⁵	1,3.10 ⁵	1,5.10 ⁵	8.10 ⁴	1,5.10 ⁵
4.8			5,5.10 ⁴	5,3.10 ⁴		5,6.10 ⁴
11.8			1,4.10 ⁵	1,4.10 ⁵		
19.8			3.10 ⁴	4.10 ⁴		4,4.10 ⁴
3.9	7,6.10 ⁴	3,2.10 ⁴	3,4.10 ⁴	—	4,4.10 ⁴	7,3.10 ⁴

(1) Tous les prélèvements sont réalisés en surface, sauf : 3M = 1 m de profondeur.

Tableau VIII

*Nombre de colonies blanches et colorées apparaissant
sur les boîtes de comptage (milieu marin)*

Sta- tion	29.7 colonies		4.8 colonies		11.8 colonies		19.8 colonies		26.8 colonies	
	bl	col	bl	col	bl	col	bl	col	bl	col
1	184	58							35	3
2	17	98,3							14,5	1,7
3	12,3	113,4	30	25	63	4,5	7,7	7	13	4,3
3M	15,7	129,6	27	26	59	10	9,3	10		
4	43	105,7							18	4
5	2,1	75,6					6	16	2,7	34

3° Densité des populations bactériennes dans l'eau et la boue.

Des échantillons de boue et d'eau montrent, comme prévu, une richesse plus élevée des boues en bactéries hétérotrophes, et particulièrement en bactéries anaérobies (voir tableaux V et VI).

4° Hétérogénéité de l'eau du bassin au point de vue bactériologique.

Des comptages réalisés à partir d'eau superficielle provenant de cinq points du bassin de chasse (voir carte n° 1) montrent une certaine hétérogénéité de cette eau au point de vue bactériologique (tableau VII). Cette hétérogénéité apparaît plus nettement lorsque l'on étudie la structure des populations (proportions des colonies blanches et colorées : voir tableau VII).

Un échantillon supplémentaire prélevé à un mètre de profondeur au point 3 (3M) montre, par contre, qu'aucune hétérogénéité n'est décelable en fonction de la profondeur dans l'eau.

b. *Evolution des populations de bactéries marines hétérotrophes de l'eau ; de février à septembre 1971.*

Tenant compte des caractéristiques citées dans l'alinéa précédent, il a été décidé de réaliser deux prélèvements hebdomadaires au point central du bassin de Chasse, un en surface et un à 1 m de profondeur.

Les résultats à discuter concernent surtout la période où le bassin de Chasse est resté fermé : du 31 mars au 29 juillet 1971.

1° Evolution du nombre total de bactéries marines aérobies hétérotrophes de l'eau (Graphique 1).

— Au moment de la fermeture des écluses (31 mars 1971), le bassin de Chasse est rempli d'eau provenant du port d'Ostende, très riche en

Tableau IX

*Détermination rapide (morphologie et réaction de Gram)
de quelques bactéries*

Date prélèvement	du	Nombre de bactéries déterminées				
		Micro- coccus	Bacillus	Coryne- formes	Total Gram +	Gram —
31.3.1971		10	1	3	14	4
13.5.1971		12	4	9	25	6
21.5.1971		6	7	7	20	7
5.6.1971		12	1	18	31	5
11.8.1971		3	0	14	17	4
total					107	26

Bactéries hétérotrophes marines : total

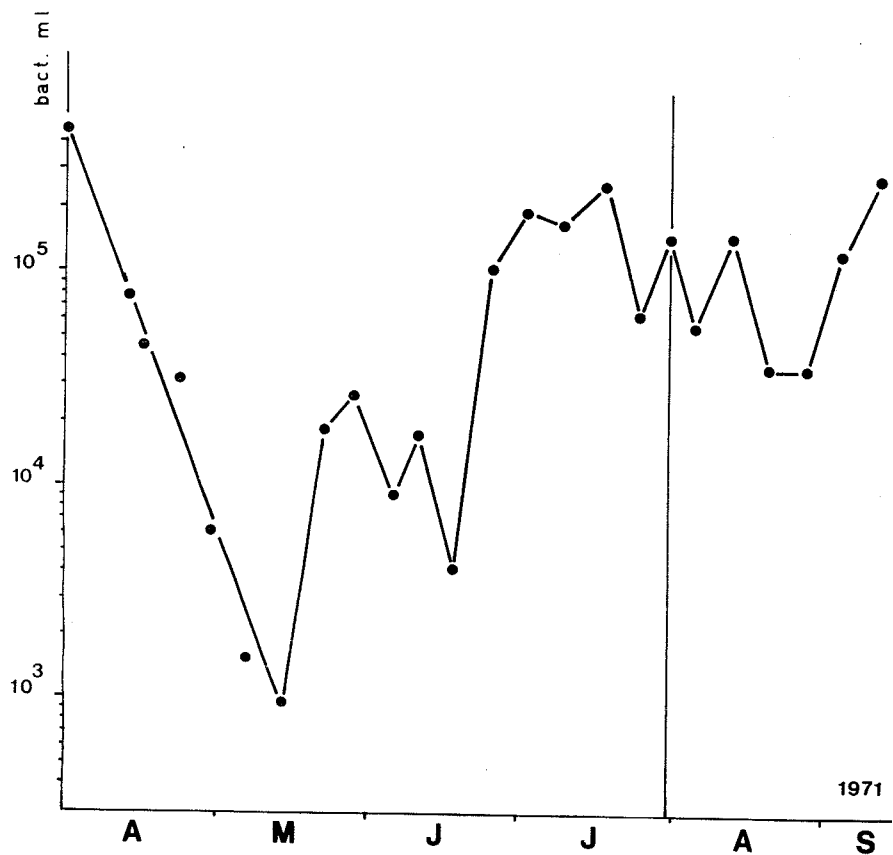


FIG. 1. — Evolution du nombre total de bactéries marines hétérotrophes dans l'eau du point central (n° 3) du Bassin de Chasse d'Ostende en 1971.

bactéries hétérotrophes (500.000 bactéries/ml) (voir aussi Persoone, 1968 ; Podamo 1972).

— Il se déclenche immédiatement une diminution progressive de cette teneur en bactéries, jusqu'à atteindre, vers la mi-mai un nombre de 1.000 bactéries/ml environ. Cette chute apparaît comme un phénomène exponentiel ($T_{50} = 5$ jours environ), de sorte qu'elle est plus facilement explicable par des phénomènes d'origine physico-chimique, que par des phénomènes tels que prédation par d'autres organismes, par exemple. C'est ainsi que trois types principaux

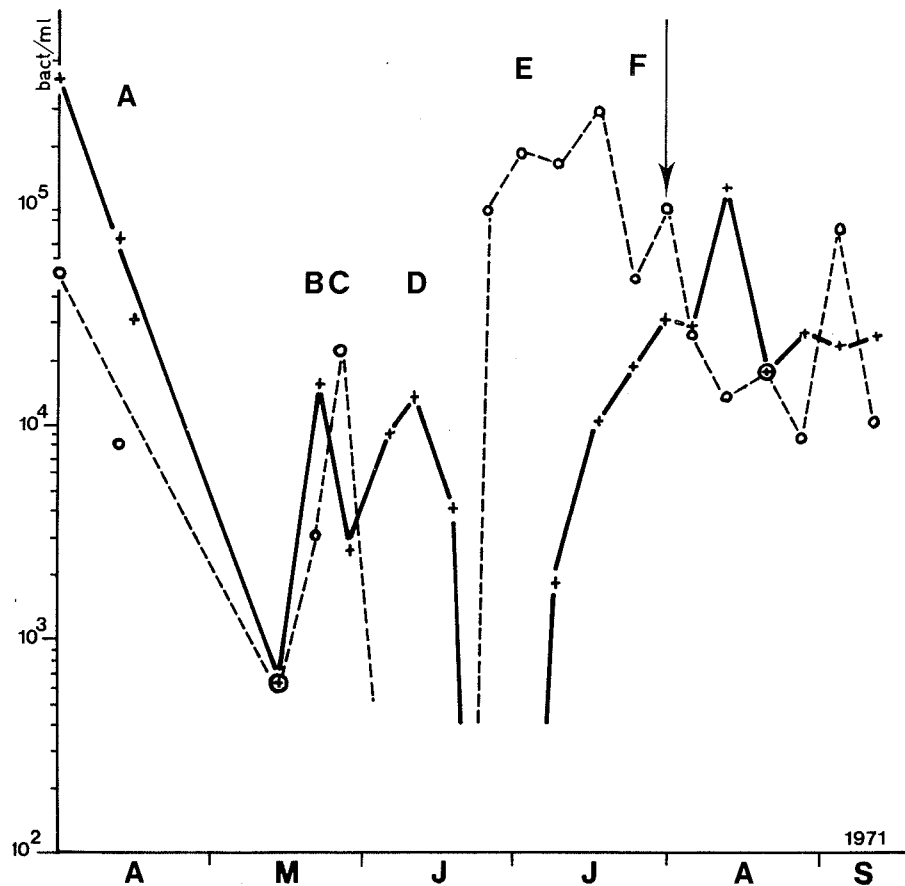


FIG. 2. — Evolution du nombre de bactéries marines hétérotrophes dans l'eau du point central (n° 3) du Bassin de Chasse d'Ostende 1971. Comptage indépendant des bactéries à colonies blanches (+) et colorées (0).

d'hypothèses peuvent être avancés pour expliquer la phase de décroissance :

α — Les bactéries hétérotrophes dépendent des matières organiques disponibles. Au cours du temps, sans apport nouveau de matières organiques de l'extérieur, les bactéries peuvent donc consommer ces matières et ainsi épuiser leur propre « milieu de culture », ce qui a pour effet de limiter leur nombre.

β — Un effet bactéricide de la lumière solaire pourrait avoir des conséquences particulièrement importantes sur la masse d'eau em-

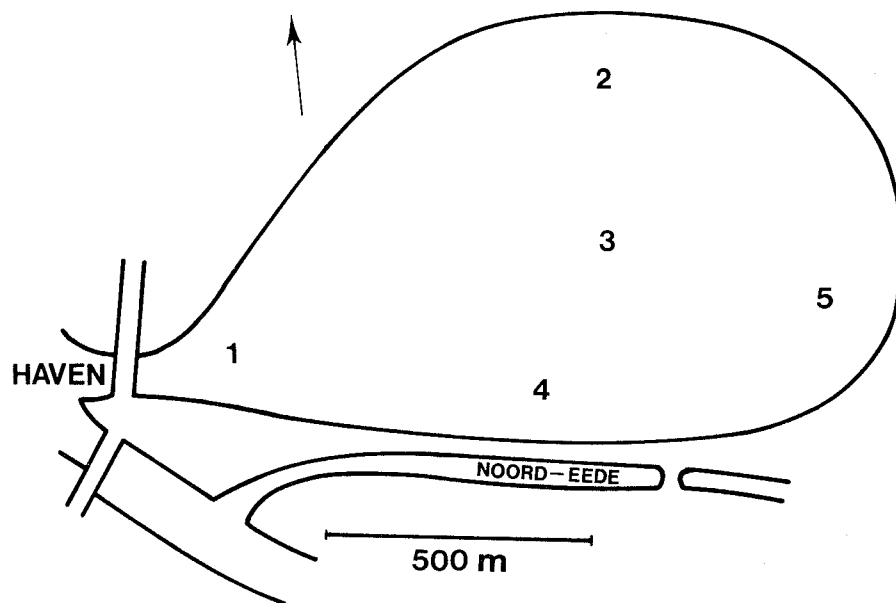


FIG. 3. — Bassin de Chasse d'Ostende et lieux de prélèvement.

prisonnée dans le bassin, à cause de la faible profondeur de celui-ci (1,5 m en moyenne).

δ — Dès le début de l'année, le nombre de cellules phytoplanc-toniques est élevé, de sorte qu'un effet antibiotique de ces cellules n'est pas à exclure et pourrait expliquer la chute du nombre de bactéries.

Ces trois hypothèses seront testées expérimentalement par la suite.

Qu'il suffise momentanément de constater que la première (con-sommation des matières organiques) est la plus simple, qu'elle suffit pour expliquer le phénomène et permet aussi d'expliquer la suite des variations de populations bactériennes, ce qui n'est pas immédiatement le cas des deux autres hypothèses.

— Après le 15 mai, le nombre de bactéries augmente nettement. Il reste ensuite toujours élevé, la plupart des résultats de comptage se situant entre 10.000 et 200.000 bactéries/ml.

2° Détection des changements de populations bactériennes.

Une première approche, élémentaire, qui permet de définir les populations a consisté à compter séparément sur les boîtes de Petri, les colonies blanches et les colonies colorées (jaunes et orangées).

Cette méthode a permis de reconnaître 6 populations différentes, se

succédant pendant la période de fermeture du bassin (graphique n° 2, A, B, C, D, E, F).

La seconde méthode, plus approfondie mais plus lourde au point de vue technique, consiste à déterminer, lors de chaque comptage, une série de souches bactériennes apparaissant sur les boîtes de comptage. Seuls quelques tests préliminaires ont été réalisés dans cette voie. Sont repris dans le tableau IX : morphologie de la bactérie et réaction à la coloration de Gram. Parmi les bactéries Gram —, une classification simple (Shewan) a été appliquée sur la base suivante : Micrococcus ; bacilles sporulés = Bacillus ; autres bâtonnets = Corynéformes.

La proportion de bactéries à Gram positif est particulièrement élevée toute l'année, ce qui serait une caractéristique des eaux marines côtières (Wood, 1965) plutôt que de la mer ouverte, où les bactéries Gram — dominant largement.

Par ailleurs, ces résultats ne sont pas en opposition avec l'existence de changements de populations, détectées par l'évolution des proportions de bactéries à colonies colorées et incolores (voir en particulier l'évolution du rapport Micrococcus/Bacillus/Corynéformes).

CONCLUSION

D'un point de vue bactériologique, un milieu marin peut subir une importante évolution au cours d'une année. Cette évolution touche tant le nombre total de bactéries hétérotrophes de l'eau, que la proportion de bactéries à colonies blanches et colorées, ou la proportion des différents types bactériens Gram + et Gram —. Il semble donc dangereux d'essayer de caractériser un milieu particulier par un seul prélèvement bactériologique.

SUMMARY

A bacteriological study of the water of the "Bassin de Chasse" of Ostend (Belgium) has been done from 31 March till 29 July 1971, when the dock has been kept closed.

The results show a succession of different populations of heterotrophic marine bacteria. This conclusion appears from different results :

1. — total count of bacteria ;
2. — separate count of bacteria forming white and coloured colonies ;
3. — rough determination (morphology and Gram-reaction) of some bacteria.

These population-variations could be explained by variations in the organic matter of the water.

BIBLIOGRAPHIE

- HENDRIE, M., HODGKISS, W. & SHEWAN, J. M. (1964). Considerations on organisms of the Achromobacter-Alcaligenes group. *Ann. Inst. Pasteur* **15** : 43-59.
- HENDRIE, M., HODGKISS, W. & SHEWAN, J. M. (1970). The Identification, Taxonomy and Classification of Luminous Bacteria. *J. gen. Microb.* **64** : 151-169.
- PERSOONE, G. (1966). Contributions à l'étude des bactéries marines du littoral Belge. III Milieux de culture et ensemencement. *Bull. Inst. r. Sci. nat. Belg.* **42** : 1-14.
- PERSOONE, G. & DE PAUW, N. (1968). Contributions à l'étude des bactéries marines du littoral Belge. IV. Recherche quantitative de la richesse microbienne de l'eau du Bassin de Chasse d'Ostende par lecture directe sur membranes filtrantes. *Bull. Inst. r. Sci. nat. Belg.* **44** : 1-9.
- PERSOONE, G. & DE PAUW, N. (1968). Pollution in the harbour of Ostend (Belgium). Biological and hydrological consequences. *Helgol. wiss. Meeresunters.* **17** : 302-320.
- PODAMO, J. (1972). Contribution à l'étude biologique et chimique du port d'Ostende. *Ann. Soc. Roy. Zool.* sous presse.
- SHEWAN, J. M., HOBBS, G. & HODGKISS, W. (1960). A determination scheme for the identification of certain genera of Gram-negative bacteria with special references to the Pseudomonadaceae. *J. appl. Bact.* **23** : 379-390.
- WOOD, FEJ. (1965). Marine Microbial Ecology.

Laboratorium voor Ekologie en Systematiek,
Vrije Universiteit Brussel.
A. Buyllaan 105, B-1050 Brussel (Belgique).

