

## V.- Pollution bactérienne

Le programme 28, du cadre microbiologique, visait à l'étude des facteurs de pollution microbienne dans l'eau de mer et des estuaires : il avait été envisagé de rechercher et de dénombrer la flore aérobie totale, les coliformes, les *Escherichia coli*, les streptocoques fécaux et les staphylocoques pathogènes. Nous exposerons, ci-après, les techniques que nous avons retenues pour ces diverses déterminations ainsi que les résultats que nous avons obtenus à partir des échantillons prélevés en haute mer (programme initial), dans le petit réseau côtier et dans l'estuaire de l'Escaut.

### 1.- Le prélèvement des échantillons

La technique qui a été retenue pour le prélèvement aseptique des échantillons aux différentes profondeurs à considérer est la technique décrite par Cobett. L'eau est aspirée à l'intérieur de « pouches » en caoutchouc, préalablement stérilisées par autoclavage, dont l'ouverture est commandée, à la profondeur voulue, par l'envoi d'un messager qui brise l'extrémité du tube d'obturation. Le contenu des « pouches » est exprimé à l'intérieur d'un flacon stérile et est directement soumis à l'analyse, dans le laboratoire aménagé à bord.

### 2.- Le dénombrement de la flore aérobie totale

Le dénombrement des germes aérobies revivifiables a été effectué par la technique du *pour plate count*, en utilisant le milieu *marine agar* décrit par Zobell et commercialisé par Difco.

La technique est simple : 1 ml de l'eau à examiner et 1 ml des différentes dilutions décimales – réalisées à l'aide d'une solution de tryptone-sel stérile – sont inoculés dans des boîte de Pétri stériles. Dans les dix minutes qui suivent cette répartition, le contenu d'un tube de milieu *marine agar*, fondu et ramené à 45 °C, est versé aseptiquement dans la boîte et l'ensemble est homogénéisé suivant les techniques classiques. Après solidification par refroidissement, les boîtes retournées sont incubées à 25 ou 30 °C, suivant les possibilités pratiques actuelles. Le dénombrement

des colonies est effectué après 3 et 5 jours d'incubation et la moyenne des populations obtenues est établie.

### 3.- Le dénombrement des coliformes, des *Escherichia coli*, des streptocoques fécaux et des staphylocoques pathogènes

Le dénombrement de ces divers germes peut s'effectuer de deux manières différentes : en employant la technique du *most probable number* et en inoculant un grand nombre de tubes à l'aide de volumes différents ou en employant la technique de filtration sur membrane. Chaque technique possède ses ardents défenseurs mais les conditions rencontrées nous ont forcé la main tout en résolvant le dilemme : les teneurs en ces différents germes étaient telles que seule une technique de concentration restait utilisable. Nous avons donc uniquement employé la technique de filtration sur membrane même dans le cas de l'étude des eaux très polluées de l'Escaut à Anvers : nous utilisions (afin de conserver, tout au long des déterminations, une technique unique permettant l'obtention de résultats comparables) une filtration des dilutions décimales.

Le principe de la méthode est bien connu. Un volume déterminé de l'eau à examiner (ou de la dilution adéquate) est filtré par dépression, au travers d'une membrane filtrante stérile, de porosité convenablement choisie ( $2,45 \mu$ ). Après rinçage des parois de l'entonnoir à l'aide d'une solution stérile, la membrane est transférée aseptiquement à la surface d'un milieu adéquat et incubée dans des conditions favorables au développement des germes envisagés. Les colonies caractéristiques sont dénombrées après 24 ou 48 heures suivant les cas.

### 4.- Le dénombrement des coliformes

La membrane filtrante est déroulée à la surface d'une boîte de milieu au tergitol 7 , décrit par Buttiaux. La boîte est incubée à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 24 heures et les colonies réduisant ou non le triphényltétrazolium et fermentant le lactose sont dénombrées comme coliformes.

#### 5.- Le dénombrement des *Eschericia coli*

Ce dénombrement est identique au dénombrement des coliformes, mise à part la température d'incubation qui est de 44 °C et qui permet le seul développement des *Eschericia coli*. Les colonies présentent le même aspect que les colonies de coliformes.

#### 6.- Le dénombrement des streptocoques fécaux

La membrane filtrante est déroulée à la surface d'une boîte de milieu de Slanetz ou *M. enterococcus* agar. La boîte est incubée à 37 °C pendant 48 heures et les colonies réduisant le triphényltétrazolium sont dénombrées comme streptocoques fécaux.

#### 7.- Le dénombrement de staphylocoques pathogènes

La membrane filtrante est déroulée à la surface d'une boîte de milieu de Baird-Parker. La boîte est incubée à 37 °C pendant 48 heures et les colonies produisant une réduction franche du tellurite de potassium tout en élaborant lipase et lécithinase sont dénombrées comme staphylocoques pathogènes.

Les résultats des divers dénombremens ont été rassemblés dans les tableaux publiés dans divers *Technical Reports*.

#### 8.- Discussion des résultats

Quelle est la valeur des indicateurs choisis ?

Les déterminations que nous avons retenues, à priori, ont-elles une certaine valeur intrinsèque pour définir une pollution ?

Il est bien évident que le dénombrement des germes aérobies revivable n'est pas, en soi, un indicateur de pollution. Cette détermination sert cependant d'indice car, ainsi que l'on peut aisément le constater, la population est très élevée dans les eaux du port d'Anvers pour devenir assez faible dans les eaux du large. Il n'est évidemment pas possible d'étudier la

diversité de cette population, de la répartir en familles, genres, groupes et sous-groupes et de préjuger, pour chaque type de germe rencontré, des possibilités d'origine fécale ou humaine. Il est bien clair que deux populations numériquement identiques peuvent être fondamentalement différentes et avoir des significations diamétrallement opposées.

Le dénombrement des coliformes, des *Escherichia coli* et des streptocoques fécaux intéressent des germes plus spécifiques d'une pollution d'origine fécale. Il ne faut pas nier que ces groupes contiennent des individus qui peuvent avoir une origine tellurique mais, dans l'état actuel de nos connaissances et de nos possibilités, nous suivrons la toute grosse majorité des chercheurs qui accordent à ces déterminations une valeur primordiale comme indicatrices de pollution fécale, quelle que soit son origine : humaine ou animale.

Nous avons également recherché les staphylocoques pathogènes qui sont, eux, considérés comme plus spécifiques d'une pollution humaine; les staphylocoques étant les hôtes habituels des cavités naturelles de l'homme. Le fait que nous n'ayons pu en mettre en évidence confirme nos observations antérieures sur les eaux des plages : il semble bien que le staphylocoque soit rarement retrouvé dans les eaux marines.

Les observations recueillies nous ont confirmés dans l'opinion que nous avions à priori, opinion que nous avons déjà pu vérifier lors des essais menés dans le cadre du groupe de travail T.W.O.Z. au large de Lombardsijde. Nous pensons en effet, et les résultats le prouvent, que la pollution bactérienne est importante au niveau des plages et que son importance décroît très rapidement lorsque l'on quitte le rivage pour se préoccuper des eaux du large. Si nous voulons étudier la cinétique de cette décroissance de la pollution bactérienne, il sera nécessaire de quadriller la zone côtière. Il ne faudra cependant pas négliger le réseau de haute mer mais, au contraire, l'étudier à des intervalles plus réduits, afin de pouvoir obtenir une idée statistiquement exacte de la situation en chacun des points. Cette étude systématique et répétée pourra confirmer nos premières impressions et nous permettra d'élucider quelques situations assez étranges du type de celles rencontrées aux points 03 et 04 du réseau marin, par exemple.