

## Chapitre IX

### Etudes bactériologiques

Rapport de synthèse

présenté par

L. DE CONINCK

(basé sur les travaux de J. BARBETTE, C. JOIRIS, J. PINON, A. BOUYE)

Les bactéries jouent dans la biosphère un rôle très important. Il est naturel qu'elles soient surtout connues en tant que pathogènes. Mais leur action de recyclage des matières premières du monde vivant, aux dépens de matières organiques sécrétées et d'organismes morts, est sans aucun doute d'une portée beaucoup plus grande dans l'économie du vivant.

Il est en effet presque certain que dans le milieu marin, le rôle des bactéries n'est pas moins important que dans les sols et dans les eaux douces. Malheureusement, la bactériologie marine est encore, en grande partie, *terra incognita*. De sorte que toutes les données acquises au cours du programme dans le cadre du *Modèle mathématique de la mer du Nord* ont leur importance.

La bactériologie comporte de nombreux domaines, d'après leur distribution dans l'espace, d'après leur action sur le substrat ou d'après leur interaction avec un milieu qui favorise ou qui contrarie leur développement.

a) Bactéries pathogènes

Dans le milieu marin, le domaine des bactéries pathogènes présente deux volets différents. Il y a d'abord celui des bactéries pathogènes terrigènes, qui sont déversées avec les eaux domestiques usées par les estuaires et par les égouts et qui polluent ainsi au moins une partie de la mer, surtout la zone des marées, les plages et les organismes vivant dans les biotopes intertidaux et sublittoraux. Ces bactéries pathogènes intéressent surtout la communauté humaine : elles contribuent à déterminer dans quelle mesure les côtes gardent leur valeur comme lieux de villégiature et de convalescence; elles deviennent ainsi un facteur qui peut compromettre gravement toute l'économie de la région côtière.

Il y a ensuite les bactéries pathogènes qui sont propres à la mer et qui s'attaquent aux organismes marins. Cette catégorie de bactéries pathogènes autochtones ne fait pas l'objet d'études dans le cadre du projet en cours.

L'étude des bactéries pathogènes terrigènes dans les eaux marines se laisse diviser en plusieurs secteurs : 1°) les estuaires, 2°) la zone intertidale et les plages, 3°) les eaux sublittorales et de pleine mer, 4°) les fonds et sédiments.

b) Bactéries marines, non pathogènes

Ces bactéries doivent jouer un rôle très important dans le recyclage des matières premières de la matière vivante, aux dépens des organismes morts. Ce recyclage peut se faire au cours de la descente plus ou moins lente de ces restes vers le fond. La matière organique en suspension dans la colonne d'eau doit fournir d'innombrables substrats aux différentes espèces de bactéries recyclantes.

De même, les sédiments riches non seulement en organismes morts, mais aussi en substances organiques sécrétées par les mollusques, vers et autres organismes benthiques, forment un milieu de culture idéal pour toutes ces formes.

Il est probable que chaque type de sédiments, vases, sables, débris de coquillages, gravier, abrite une flore plus ou moins typique pour le substrat en question et qu'elle répond d'une manière ou de l'autre aux différentes formes de pollution.

Mais les données sur cette sorte de bactériologie sont encore excessivement rares. Il y a là un domaine des plus intéressants qui demande à être exploré. La connaissance des espèces de bactéries, caractérisées par leurs systèmes enzymatiques, donnerait en même temps une idée de la part qu'elles prennent dans le processus de recyclage de la matière, qui leur est dévolu.

### 1.- Techniques

#### 1.1.- Prélèvement des échantillons

##### 1.1.1.- Dans la colonne d'eau

On emploie la technique de Cobett (prélèvement aseptique par aspiration de l'eau à l'intérieur de *pouches* en caoutchouc, stérilisées par autoclavage; l'ouverture des pouches se fait par bris de l'extrémité antérieure du tube d'obturation, par messager. Le contenu des *pouches* est exprimé à l'intérieur d'un flacon stérile et directement soumis à l'analyse, dans le laboratoire aménagé à bord).

- Les échantillons sont prélevés dans les bouteilles (ou Erlen) stériles. Les ensemenagements pour comptages sont réalisés en laboratoire, au maximum 4 heures après le prélèvement.
- Les prélèvements dans la zone intertidale se font d'après les directives données dans APHA, AWWA, WPCF. — *Standard methods for the Examination of Water and Wastewater* (New York, 1971), à une profondeur de 30 cm (profondeur totale de la colonne d'eau 60 cm), à un moment donné de la marée, en évitant toute contamination possible au cours du *sampling*.

##### 1.1.2.- Dans les sédiments

A cause de l'impossibilité de traiter les échantillons à bord des navires utilisés pour le *sampling* dans l'estuaire et près de la côte, une étude fut faite de l'effet de la congélation sur la survie de bactéries aérobies. La congélation dans un mélange de l'anhydride carbonique solide et d'alcool, suivi de dégel après 30 minutes, donne une perte du titre en bactéries égal à  $0,24 \log_{10}$ , c'est-à-dire que 40 % des colonies sont perdues. La conservation de l'échantillon congelé à  $-20^{\circ}\text{C}$ , pendant une semaine, donne une perte de titre de  $0,85 \log_{10}$ , c'est-à-dire 88 % de

toutes les colonnes sont perdues. Lorsque, par contre, les échantillons congelés sont conservés à - 70 °C pendant une semaine, il n'y a pas de perte décelable. Cette dernière méthode a été adoptée pour l'étude des bactéries des sédiments. Des essais analogues, avec des échantillons d'eau au lieu de sédiments, congelés en un mélange d'alcool saturé en CO<sub>2</sub> solide, conservé à - 18 °C et à - 60 °C, donne de très sérieuses pertes du nombre de colonies, ces pertes augmentant avec la durée du maintien en congélation. Les streptocoques fécaux semblaient être sensiblement plus résistants à la congélation que les autres catégories de la flore bactérienne (cf. les deux tableaux ci-après). La méthode ne se prête manifestement pas à l'étude des bactéries de la colonne d'eau.

Tableau 1

Variations des populations microbiennes des eaux de mer congelées et conservées à - 18 °C

	Avant congélation	Conservation		
		24 h	48 h	216 h
Germes totaux	100		20	5,2
Coliformes	100	2,5	1,4	0,6
Escherichia coli	100	5	4,4	0,4
Streptocoques fécaux	100	45	30	22

Tableau 2

Variations des populations microbiennes des eaux de mer congelées et conservées à - 60 °C

	Avant congélation	Conservation		
		24 h	48 h	216 h
Germes totaux	100		42	2,7
Coliformes	100	2,7	5,1	2
Escherichia coli	100	4,4	8	2
Streptocoques fécaux	100	50	23	20

Il est probable que la nature de l'échantillon à congeler, eau ou sédiment, ainsi que son volume, influencent de façon importante l'action du phénomène de congélation. Plus la congélation est rapide, et plus l'organisme est protégé contre les pressions qui sont engendrées au moment du passage de la phase liquide à la phase solide, moins il y aura de germes détruits. Tous ces facteurs permettent de comprendre pourquoi la flore des sédiments résisterait mieux à la congélation, que celle des eaux libres.

Il est de plus probable que les grains cristallins, une fois formés, réagissent comme tout corps solide à un changement de température, se contractant aux températures plus basses et se dilatant à des températures plus hautes, de sorte que des passages de - 80 °C à - 20 °C s'accompagnent de nouvelles hausses de pression, dans quel cas de nouveau le volume de l'échantillon et la présence de sédiments protecteurs, faisant office de tampon de choc, peuvent influencer sensiblement les chances de survie ou de destruction, selon le cas.

#### 1.2.- Dénombrement de la flore bactérienne

##### 1.2.1.- Flore bactérienne totale

Ce dénombrement a été effectué par la technique du *pour plate count*, en utilisant le milieu *marine agar* (Zobell), commercialisé par Difco.

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 boîtes de Pétri stériles. Dans les 10 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. Toute inoculation se fait à plusieurs dilutions et en double.

- Pour dénombrer les bactéries marines et estuariennes d'une part, les bactéries d'eau douce d'autre part, l'incubation se fait sur milieu riche marin pour les premières, sur milieu riche d'eau douce pour les dernières.

- Dans l'étude des bactéries des sédiments, il y a d'abord le problème de la conservation des échantillons à étudier, entre la prise des échantillons et leur dénombrement. L'action de la congélation a déjà été évoquée. Il y a, en outre, le fait que le nombre de colonies dénombrées sur un milieu nutritif ne correspond pas nécessairement au nombre de bactéries présentes dans l'échantillon. Ces bactéries en effet s'agglutinent et forment des amas de nombreuses cellules individuelles ou elles se développent autour et à l'intérieur d'un organisme mort ou de déchets organiques. Un individu isolé peut former une colonie; d'un agglomérat de bactéries également peut naître une colonie : elle occupera une surface un peu plus grande mais il ne sera pas possible d'établir le nombre initial des bactéries. De là, la nécessité d'homogénéiser l'échantillon avant d'ensemencer le milieu nutritif. Des essais avec plusieurs appareils d'homogénéisation, utilisés pendant des temps plus ou moins longs à des vitesses plus ou moins rapides, ont montré que toutes les méthodes d'homogénéisation donnaient des résultats à peu près équivalents, de sorte que ce sont des arguments de maniabilité qui ont porté le choix sur un homogénéisateur *Vortex*, tournant pendant 30 secondes. L'homogénéisation de l'échantillon au moyen d'ultra-sons sera étudiée plus tard. Pour pouvoir comparer le nombre de bactéries (titre) aérobies et anaérobies, 0,1 ml de toutes les dilutions de l'échantillon benthique homogénéisé est ensemencé en quadruple sur agar marin *Zobell* : 2 plaques sont incubées à l'air, les 2 autres dans des conditions anaérobies, toutes à 18 °C , pendant 10 jours.
- Dans chaque laboratoire bactériologique qui a contribué au *Projet Mer*, le dénombrement des colonies sur les plaques de culture se fait toujours par ensemencement de 2 plaques; la moyenne des 2 résultats donne le titre de la flore bactérienne. C'est la méthode universellement employée. Elle permet la comparaison des résultats obtenus par divers chercheurs dans divers milieux. Mais, voulant estimer dans quelle mesure les chiffres obtenus étaient vraiment représentatifs pour le milieu étudié, les auteurs (J. Barbette, A. Bouyé) ont multiplié le nombre de plaques de cultures et les dilutions : un échantillon unique, subdivisé pour ensemencer un grand nombre de plaques, donne des chiffres qui peuvent varier environ du simple au double, les écarts entre les chiffres minima et maxima et la moyenne

étant à peu près de l'ordre de 33 %. Une distribution inégale des bactéries dans le milieu et leur agglutination sont à l'origine de ces différences.

Si on prend plusieurs échantillons séparés à un endroit donné, la différence des titres bactériens entre les différents échantillons est sensiblement plus grande. Ici aussi, une distribution inégale des matières en suspension ou sédimentées, avec leur charge bactérienne, est à l'origine de ces différences. Des différences de titre du simple ou décuple peuvent par conséquent être considérées comme normales, dans un milieu donné. Lorsque les différences deviennent plus grandes, du simple au centuple, ou plus, alors elles deviennent significatives.

A. Bouyé a isolé une centaine de colonies, originaires de sédiments en pleine mer, loin des côtes. En déterminant les espèces bactériennes représentées, et en étudiant leurs systèmes enzymatiques, on pourra se former une idée plus exacte du rôle que jouent ces espèces dans le recyclage des matières organiques et voir si les différents fonds marins présentent une flore différente.

#### 1.2.2.- Dénombrement des coliformes, des *Escherichia coli*, des streptocoques fécaux et des staphylocoques pathogènes

La technique de filtration sur membrane fut employée, même dans le cas de l'étude des eaux très polluées de l'Escaut à Anvers : fut utilisée alors une filtration des dilutions décimales appropriées afin de conserver, tout au long des déterminations, une technique unique permettant l'obtention de résultats comparables.

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 ( $0,45 \mu$ ). 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.

##### 1°) 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 °C pendant

24 heures et les colonies réduisant ou non le triphényltétrazolium et fermentant le lactose sont dénombrées comme coliformes.

2°) Escherichia 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 *Escherichia coli*. Les colonies présentent le même aspect que les colonies de coliformes.

3°) 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.

4°) 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 microbes pathogènes étant d'origines diverses, la concentration globale des microbes potentiellement pathogènes fut déterminée (*microbes totaux*, 37 °C : TM). Pour l'étude de ce groupe, une faible salinité du milieu de culture et une température de 37 °C paraissent nécessaires pour permettre le développement de la majorité des germes potentiellement pathogènes et pour éliminer les bactéries halophiles strictes, les psychrophiles et une partie des mésophiles. Ces bactéries ne sont pas d'origine terrestre et ne présentent aucun intérêt du point de vue sanitaire. L'ensemencement se fait en surface, sans filtration préliminaire.

Un deuxième groupe, les *coliformes totaux* (TC), est cultivé, après filtration sur membrane, sur m Endo medium (APHA, AWWA, WPCF, USA 1971). Ce groupe contiendrait moins de 7 % de microbes qui ne sont pas d'origine fécale d'animaux à sang chaud.

Un troisième groupe, les *coliformes fécaux* (FC), est cultivé, après filtration sur membrane, sur m FC medium.

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 Pétri 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  $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , à l'abri de la lumière.

### 1.3.- Effets antibiotiques dans les eaux de la mer du Nord, en particulier concernant les bactéries fécales

La survie et la multiplication de bactéries fécales terrigènes dans le milieu marin pourrait être compromise, soit par des salinités ou des températures inadéquates, soit par des facteurs antibiotiques d'origine biologique dans l'eau de mer.

Un erlen stérile est rempli d'eau de mer fraîchement prélevée ( $\pm 100$  ml) etensemencé avec une aliquote ( $\pm 0.05$  ml) d'une culture d'*Escherichia coli* arrivée au plateau de sa croissance en milieu riche, ce qui donne un titre, au temps 0, d'environ  $10^6$  bactéries par ml. Incubation à  $18^{\circ}\text{C}$ , à l'obscurité, sans agitation.

L'évolution du nombre d'*Escherichia coli* est ensuite suivie au cours du temps par comptages sur milieu de Mac Conkey (*spread-plate method* - incubation à  $37^{\circ}\text{C}$ ). Les dilutions utilisées sont  $10^{-2}$  en début d'expérience, puis  $10^{-1}$  et  $10^0$  en fonction des nécessités. Chaque prise diluée (ou non) sert à ensemencer 3 boîtes de Pétri équivalentes.

## 2.- Résultats

### 2.1.- Flore microbienne totale

#### 2.1.1.- Dans la colonne d'eau (J. Barbette et al.) (fig. 1)

##### a) Dans l'estuaire

Le nombre de germes totaux dans les eaux de l'Escaut, au nord d'Anvers, est très élevé et diminue très fortement avant d'arriver à la mer où il

o germes totaux/ml

x coliformes/l

□ Escherichia coli/l

-200.000 20.000

-100.000 10.000

-10.000 1.000

-1.000 100

pleine mer

km

60

45

30

15

côte 0

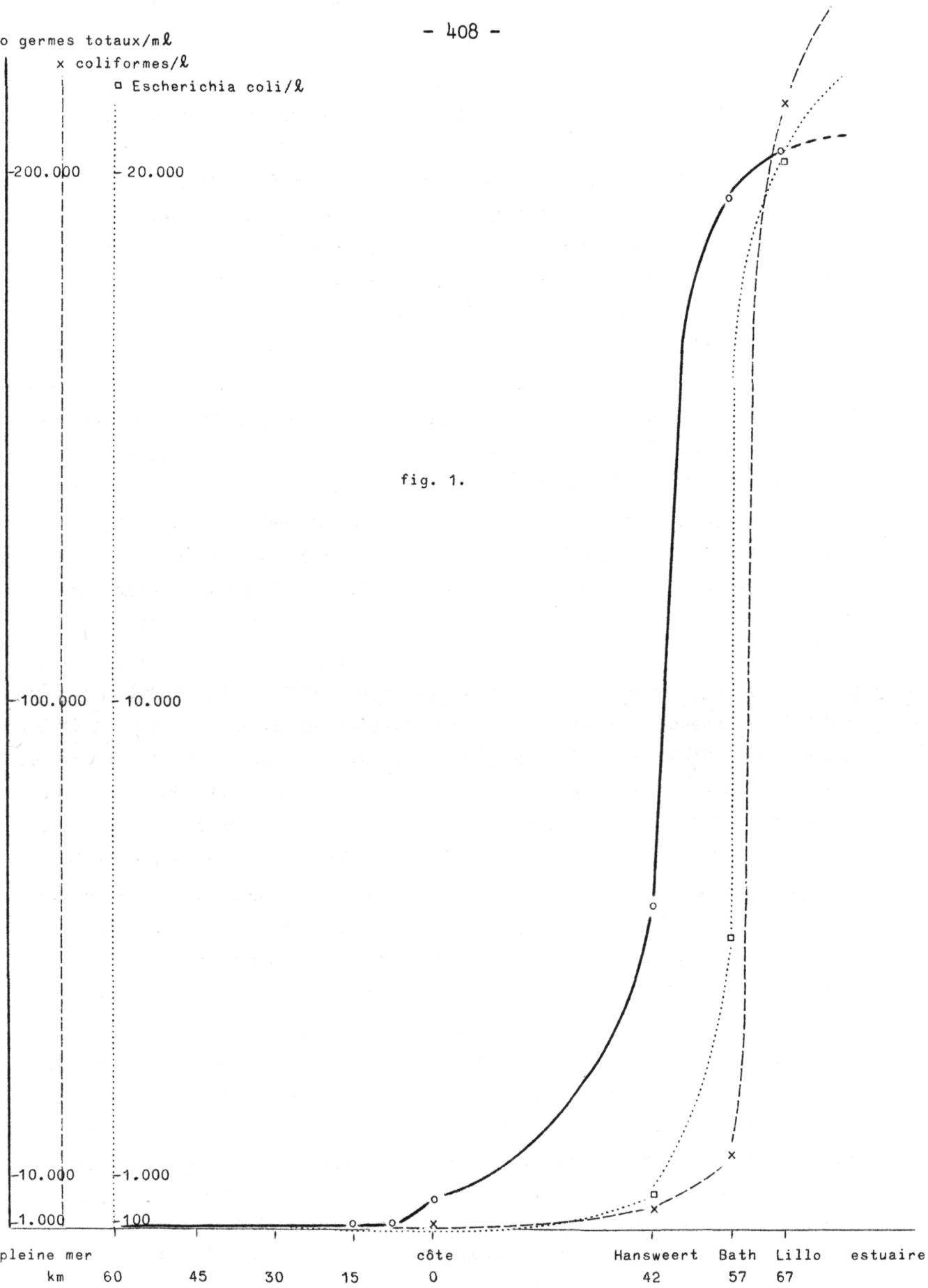
Hansweert 42

Bath 57

Lillo 67

estuaire

fig. 1.



atteint des valeurs qu'on retrouve à peu près le long de la côte (Lillo : 204.000/ml ; Bath : 195.000/ml ; Hansweert : 61.000/ml ; embouchure et côte : 4.790/ml). On voit que dans le parcours élargi du fleuve, à partir de Bath, le nombre diminue très rapidement en direction de la mer. En été, les chiffres sont nettement plus élevés qu'en automne. Ils varient très fortement d'échantillon à échantillon, en rapport, probablement, avec la charge très variable des matières en suspension.

b) En mer

Le long de la côte, le nombre de germes approche à peu près 5.000/ml ( $\bar{m} = 4.790$ ). Ce nombre diminue rapidement en s'éloignant de la côte (à environ 7,5 km : 820 ; à 15 km : 165 ; à 30 km : 127 ; à 45 km : 74 et à 60 km : 11/ml en moyenne). Il y a quelques résultats qui s'écartent sensiblement de ces chiffres moyens : dans l'embouchure de l'Escaut, en août 1972, les points 1189, 1186 et 1209 comptaient environ 15.500 germes par ml. Mais ailleurs, près de la côte, il devient moins grand ( $\pm 2.800/ml$ ) et à une distance de 2 à 4 km, il devient de l'ordre de 1.860/ml.

Les estuaires et les grandes agglomérations semblent créer les conditions nécessaires pour un pullullement de bactéries. Les eaux près de Rotterdam (point 2552 : 12.750/ml) comptent 5 fois plus de bactéries que celles près d'Ostende (point 1097 : 2.250/ml). Les bactéries terrigènes semblent disparaître en très grande partie, soit par l'augmentation de la salinité, soit par la dilution, soit par des effets bactéricides et être remplacées par des bactéries propres aux eaux marines. En pleine mer, les chiffres deviennent très faibles à part au point 1348, à environ 33 km, avec 2.515 germes/ml, contre  $\bar{m} = 127/ml$  pour cette distance de la côte; le point 2001, à  $\pm 55$  km, avec 772/ml contre  $\bar{m} = 74/ml$  et le point 1358, à  $\pm 60$  km, avec 140/ml contre  $\bar{m} = 11/ml$ .

Aux points côtiers, le nombre de coliformes est en moyenne d'environ 200/l. Il y a des exceptions, à la hauteur de Rotterdam (en M 2552 avec 1.035/l) et d'Amsterdam (en M 2689, avec 1.580/l). Plus vers le large, les coliformes disparaissent rapidement, à de très rares exceptions près, aux points M 1693 (avec  $\pm 110/l$ ) et M 0065 (avec  $\pm 125/l$ ), où ils sont présents aussi en profondeur.

*Escherichia coli* représente environ 10 à 20 % des coliformes. A Lillo, ils sont un peu plus de 20.000/l ; à Bath, il y en a 5.500/l et à Hansweert 600/l . A l'embouchure, il n'y en a plus que  $\pm$  130/l . Dès qu'on quitte la zone côtière, leur nombre devient trop faible pour pouvoir donner des chiffres reproductibles. Ceci semble bien confirmer que la zone qui présente de l'intérêt pour l'établissement d'une équation cinétique de disparition ou d'évolution de la pollution fécale est limitée à une région assez proche des côtes et estuaires. Cette zone est en effet la seule où on peut admettre que les résultats obtenus ont une signification suffisante pour ce type d'étude.

En comparant les résultats, on s'aperçoit que le type de pollution varie au fur et à mesure que l'on évolue vers le large. La pollution fécale est étudiée sur la base des teneurs en coliformes, en *Escherichia coli* et en streptocoques fécaux des échantillons prélevés. Au niveau des plages et dans l'estuaire, le nombre des *Escherichia coli* est souvent plus élevé que le nombre des streptocoques fécaux. Lorsqu'on s'écarte du rivage, on voit que le nombre des *Escherichia coli* diminue et que, très rapidement, le nombre des streptocoques fécaux devient relativement plus important. Ceci confirme l'opinion que la résistance des streptocoques fécaux aux conditions du milieu marin est nettement plus importante que la résistance des coliformes et d'*Escherichia coli*. Les streptocoques fécaux seraient de meilleurs indicateurs de pollution fécale pour peu que l'on soit éloigné du rivage ou de l'origine de la pollution.

En ce qui concerne les variations de la pollution, en un endroit donné, en fonction de la profondeur du prélèvement, on observe très généralement une excellente corrélation entre les divers résultats obtenus pour les trois types de germes cités plus haut. Cette observation permet de ne pas attribuer au biotope considéré des fluctuations qu'on peut parfois relever dans les eaux de surface par rapport aux eaux de moyenne et grande profondeurs : il s'agit là d'interactions entre la présence du bateau de prélèvement avec le milieu marin qui le supporte.

Une situation assez étrange s'observe au niveau de la ligne 0001-0004 : à ce niveau, on constate des fluctuations qu'on ne retrouve pas dans le reste du réseau. Ces observations pourraient être imputables à la situation un peu particulière de ces points, dans la zone d'étranglement de la

Manche, et être la manifestation d'un effet très localisé de goulot qui serait très rapidement absorbé par le pouvoir tampon de la mer du Nord. La situation très côtière du point 0001 le place dans une zone d'influence terrigène importante, d'un point de vue microbiologique et, en fait, le siège de fluctuations souvent importantes et parfois très sporadiques.

Si on compare les résultats obtenus au cours des diverses campagnes de prélèvements, on observe, pour tous les points du réseau, une augmentation assez nette de la pollution fécale lors des prélèvements de janvier 1972. On peut établir une constatation semblable sur la base des résultats obtenus lors de la campagne de prélèvements du programme aux points M 0001 à M 0025, au début du mois de février. Il doit s'agir là d'un phénomène assez important et assez stable, dont on ignore l'origine et qu'il serait intéressant de suivre au cours des prochaines campagnes.

#### 2.1.2.- Dans les sédiments (A. Bouyé et al.)

Pendant les mois de janvier, février et mars, le  $\log_{10}$  du titre moyen de bactéries aérobies (par ml de sédiment) était de 4,9 pour l'estuaire de l'Escaut (10 échantillons - de 3,45 à 7,43), de 2,5 pour la mer (34 échantillons - de 1,18 à 3,85), avec un titre légèrement plus haut (2,40) dans les sédiments de la bande côtière (9 échantillons jusqu'à 20 km en mer) que dans ceux de la haute mer (19 échantillons) au-delà de 20 km (2,08), sans que cette différence soit significative.

Aux mois de juin-juillet, ce titre était de 4,26 (1 échantillon) à l'embouchure de l'Escaut, de 4,05 ( $n = 7$  - 2,48 à 5,14) dans la zone proximale et de 3,31 ( $n = 15$  - 2,28 à 4,44) dans la zone distale. Chaque fois, le titre était plus élevé en hiver qu'en été. Le  $\log_{10}$  du titre de bactéries anaérobies était moins élevé : 3,49 (1 échantillon) à l'embouchure de l'Escaut, 2,87 ( $n = 7$  - 1,70 à 3,44) en zone proximale et 2,15 ( $n = 15$  - 1,70 à 3,48) en zone distale.

Lorsqu'on étudie le titre en bactéries aérobies de la colonne d'eau et des sédiments en un même point, dans la majorité des cas le titre des sédiments dépasse de 0,5  $\log_{10}$  celui de la colonne d'eau. A. Bouyé en conclut qu'au moins en partie il s'agit d'une flore propre aux sédiments, qui ne vient pas de la flore de la colonne d'eau<sup>1</sup>.

1. Note du coordinateur : aussi vraisemblable que cela soit, il est probable aussi que les bactéries trouvent dans les sédiments un substrat plus riche qui facilite leur multiplication.

Pour mieux comprendre l'action de la flore bactérienne dans les sédiments, on a isolé, de points éloignés de plus de 20 km de la côte, une centaine de formes de bactéries, dont la détermination spécifique permettra d'évaluer les pourcentages de la constitution de la flore dans un secteur donné. Lorsque les espèces principales seront connues, la détermination de leur système enzymatique permettra de reconnaître leur rôle dans l'écologie des sédiments. Cultivés sur *marine agar Zobell 2216* (*Difco*) sous conditions aérobie à 18 °C, on étudie d'abord le besoin en NaCl dans le milieu de culture. Après, on établit la température optimale par culture à différentes températures entre 4 et 56 °C. Après avoir noté les caractéristiques macro- et microscopiques des colonies et des germes, on procède à une série de tests biochimiques et physiologiques.

On a isolé une demi-douzaine d'espèces, identiques à ou proches de *Bacillus pumilus*, *Brevibactericum sociovivum*, *Staphylococcus aureus*, *Nocardia opaca*, *Bacillus cereus* et *Brevibacterium immotum*, mais qui présentent quelques différences dans les caractères tels qu'ils sont cités dans *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (1957, 7ème édition).

## 2.2.- Bactéries pathogènes

### 2.2.1.- Dans la colonne d'eau (J. Barbette et al.) (fig. 1)

#### a) Dans les estuaires

Le nombre de coliformes, très élevé en aval d'Anvers (213.500/l à Lillo), diminue rapidement (13.560/l à Bath et 3.000/l à la hauteur de Hansweert, dans la partie élargie de l'estuaire) pour se réduire à 530/l à la hauteur de l'embouchure.

#### b) En mer

L'espace marin dans lequel les prélèvements ont été effectués est très profondément hétérogène; il n'est pas difficile d'établir une distinction très nette, sur la base des résultats obtenus, entre les points côtiers, peu éloignés des rivages et des estuaires et les points de haute mer. Dans la zone côtière, en effet, on retrouve une pollution fécale importante alors que, en haute mer, ce type de pollution est très faible, quasi inexistant.

Les observations dans le réseau étudié, rapprochées des résultats régulièrement récoltés au long du littoral, montrent que la pollution fécale, très importante sur les plages, diminue déjà nettement lorsqu'on s'écarte à environ 200 m (inventaire des polluants) et s'ameuille très rapidement lorsqu'on considère des points légèrement plus éloignés. Lorsqu'on atteint des points tels que 0007, 0008, 0009, etc., la pollution fécale est tellement affaiblie qu'elle est très souvent inférieure aux limites de détection que le mode de prélèvement impose.

J. Pinon *et al.* ont étudié la présence de bactéries pathogènes le long de la côte belge. La population côtière est de 200.000 habitants en hiver, de 800.000 en été. Furent étudiés, tous les germes qui se cultivent à 37 °C, sur milieu antibiotique medium n° 3 (*Difco 243*). Ils forment le groupe *microbes totaux* qui comprend toute une variété de micro-organismes d'origine différente qui sont potentiellement pathologiques (multiplication à 37 °C) et qui sont donc importants du point de vue sanitaire. Les coliformes totaux se cultivent à 35 °C, aérobies et facultativement anaérobies, gram-négatifs, en forme de bâtonnets, ne forment pas de spores et ne fermentent pas le lactose. 0,28 (0,16 - 0,37) % de ces *coliformes totaux* sont des *coliformes fécaux* qui sont le groupe indicateur de pollution par excellence, qui contient le plus de microorganismes pathologiques.

Dans les 9 points de prélèvement, le long de la côte belge, depuis de Panne à Knokke, le nombre de coliformes fécaux varie de 0,3 à 35,5/ml. Le nombre de coliformes totaux est en moyenne 4 fois plus grand, celui des microbes totaux, environ 40 fois plus grand.

Des variations importantes dans le temps et dans l'espace sont notées, dépassant parfois 100/1 en plus ou en moins, dans un même endroit, dans une période de 2 semaines.

#### 2.2.2.- Dans les sédiments (A. Bouyé *et al.*)

La présence des coliformes dans les sédiments et dans la colonne d'eau est généralement du même ordre de grandeur. Parfois le titre de coliformes dans les sédiments est plus élevé que celui dans les eaux.

*Escherichia coli*, par contre, est plus nombreuse dans la colonne d'eau. Il semble, par conséquent, plus indiqué de rechercher les indicateurs

fécaux dans l'eau, plutôt que dans les sédiments.

### 3.- Flore bactériologique du bassin de Chasse d'Ostende

#### 3.1.- Analyse bactériologique globale du bassin

##### 1°) Bactéries hétérotrophes marines et d'eau douce

Des comptages réalisés, à partir d'un même échantillon, sur milieux riches marins 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 obtenues sont les suivantes : les bactéries marines sont toujours majoritaires; les bactéries d'eau douce représentent de 0 à 25 % du nombre de bactéries marines.

##### 2°) Bactéries aérobies et anaérobies

De même, des bactéries d'un même échantillon ont été incubées en aérobiose et en anaérobiose. 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.

##### 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.

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

Des comptages réalisés sur de l'eau superficielle provenant de cinq points du bassin de Chasse montrent une hétérogénéité de cette eau du point de vue bactériologique. Par contre, au point central (n° 3), un échantillon supplémentaire a été pris à 1 m de profondeur et aucune différence n'a été décelée par rapport à l'échantillon de surface du même point.

#### 3.2.- Evolution des populations de bactéries marines hétérotrophes de l'eau, de février à septembre 1971

Tenant compte des caractéristiques citées dans l'alinea 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.

Evolution du nombre total de bactéries marines aérobies hétérotrophes de l'eau

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 bactéries hétérotrophes (500.000 bactéries/ml) [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 représente un phénomène exponentiel ( $t_{50} = 5$  jours), de sorte qu'elle ne peut être expliquée que par des phénomènes d'origine physico-chimique et non par des phénomènes de prédatation par d'autres organismes. Trois types principaux d'hypothèse peuvent être avancés pour expliquer la phase de décroissance :

- les bactéries hétérotrophes dépendent des matières organiques disponibles. Au cours du temps, sans apport nouveau de matières organiques de l'extérieur, ces bactéries peuvent donc consommer ces matières et ainsi épuiser leur propre *milieu de culture*, ce qui a pour effet de limiter leur nombre;
- un effet bactéricide de la lumière solaire pourrait avoir des conséquences particulièrement importantes sur la masse d'eau emprisonnée dans le bassin, à cause de la faible profondeur de celui-ci (1,5 m en moyenne);
- dès le début de l'année, le nombre de cellules phytoplanctoniques 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 (consommation 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 (voir plus loin), ce qui n'est pas immédiatement le cas des hypothèses 2 et 3 .

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

### 3.3.- Action bactériostatique ou bactéricide de l'eau de mer

La cinétique de la disparition des *Escherichia coli* dans l'eau de mer présente trois étapes.

#### 3.3.1.- Latence

Pendant une période variant de 1 à 6 jours, le nombre d'*Escherichia coli* reste stable. L'existence d'une telle phase de latence est difficile à interpréter, ce paramètre ne sera, de fait, pas utilisé par la suite.

#### 3.3.2.- Chute exponentielle

C'est la phase de disparition exponentielle des bactéries qui nous sert à définir l'effet antibiotique de l'eau utilisée : elle permet de déterminer un  $t_{50}$  (temps nécessaire pour que la population diminue de moitié), chiffre qui reflète l'intensité de l'effet antibiotique. [La diminution de 50 % nous semble trop rapprochée des 25 à 33 % de précision de la méthode de comptage. Un  $t_{10}$  (diminution de 90 % de la flore originelle) serait plus indiqué et possible].

#### 3.3.3.- Dernière phase

Arrêt de cette chute exponentielle. Cette dernière phase n'est pas régulièrement observée. Elle ne concerne de toute façon qu'une faible proportion (moins de 1 %) de la population initiale.

Lors de la croisière de septembre 1972 (radiales), une série d'expériences d'effet antibiotique ont pu être réalisées à bord du *Mechelen* (voir exemples, fig. 2). Le tableau 1 résume les résultats obtenus, en ce qui concerne le  $t_{50}$  et, à titre indicatif, la longueur de la latence; l'ensemble des valeurs de  $t_{50}$  sont reprises sur la figure 3.

On peut nettement y voir que l'effet antibiotique est fort près de l'embouchure de l'Escaut et va en s'amenuisant lorsqu'on s'éloigne vers le large.

Une étude de l'effet antibiotique de l'eau du bassin de Chasse d'Ostende a permis de tirer les conclusions suivantes.

1) L'eau du bassin de Chasse d'Ostende présente à tout moment de l'année un effet antibiotique marqué vis-à-vis d'*E. coli*.

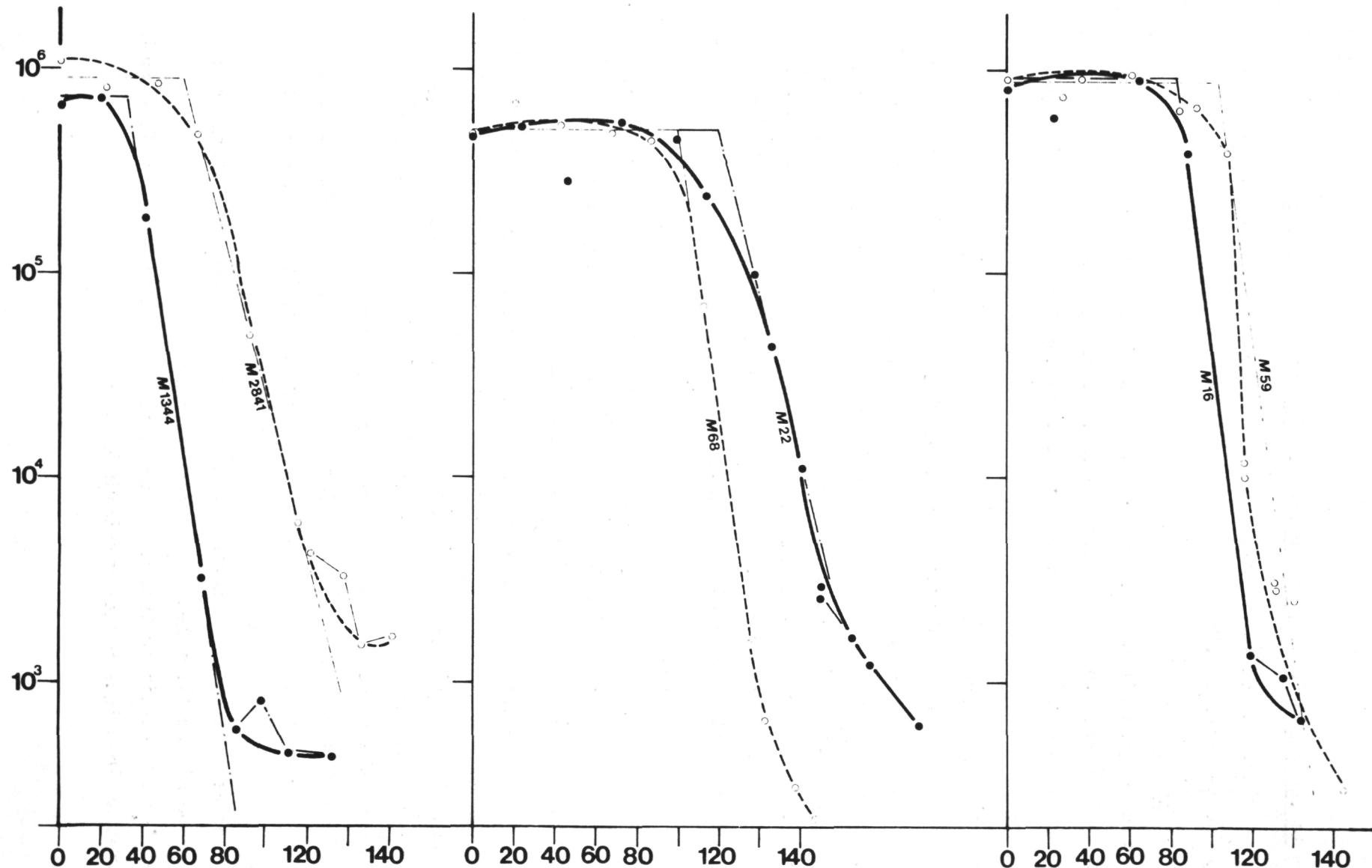


fig. 2.- Exemples de courbes de disparition des *E. coli* dans de l'eau de mer fraîche non traitée, provenant de diverses stations du secteur sud-est de la mer du Nord (septembre 1972).

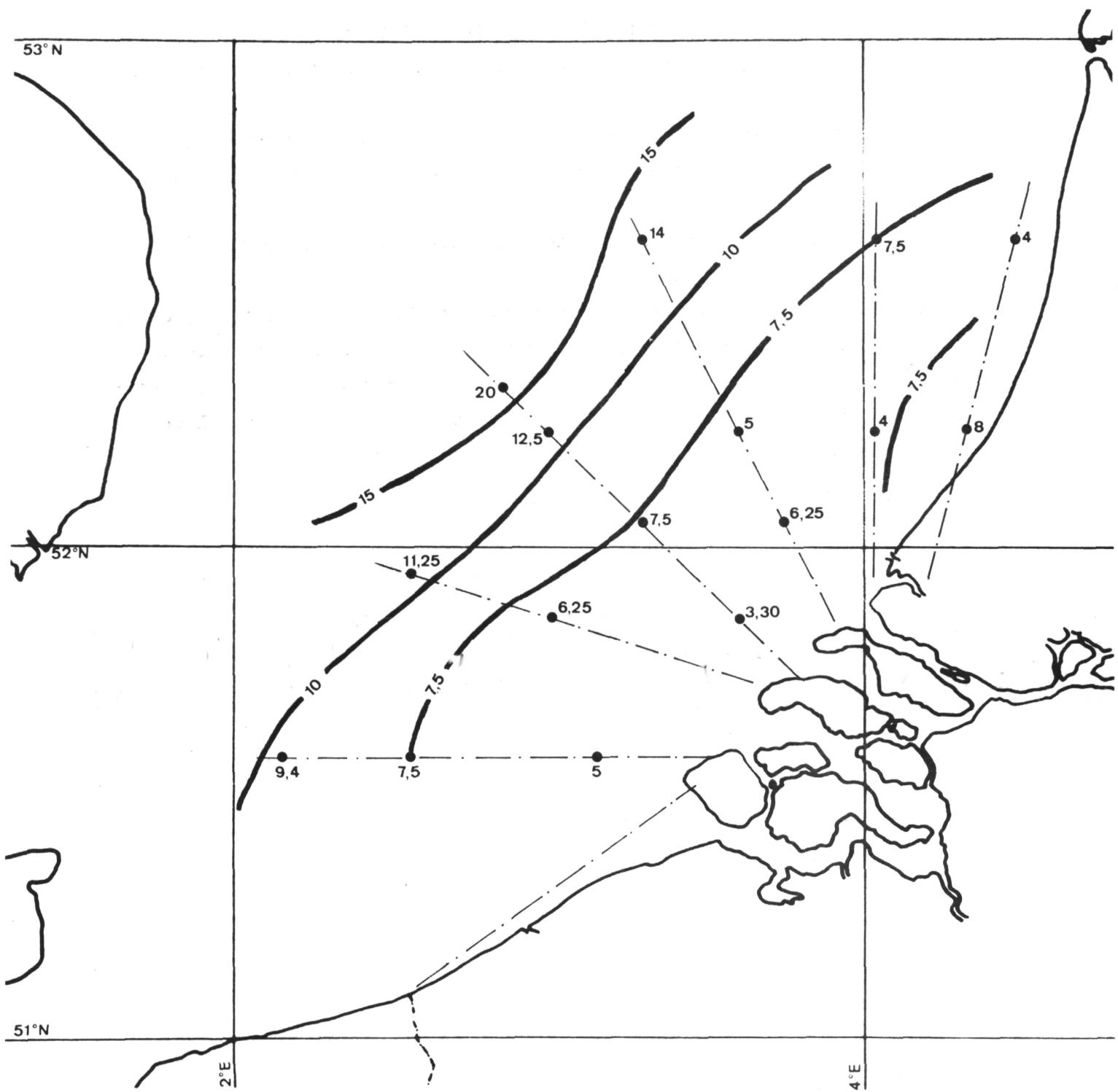


fig. 3.- Variation géographique de l'effet antibiotique de la mer du Nord (septembre 1972).

2) Lorsque cet effet antibiotique est testé à l'obscurité, il est toujours supprimé par autoclavage et filtration sur filtres de pore 0,45  $\mu$ .

Lorsque la même expérience est faite à la lumière, cependant, il arrive que les propriétés antibiotiques de l'eau autoclavée soient rétablies.

3) L'effet antibiotique semble dépendre directement des populations phytoplanctoniques présentes.

4) Les résultats peuvent donc être interprétés si l'on suppose que des espèces phytoplanctoniques peuvent excréter dans le milieu des substances à effet antibiotique vis-à-vis d'*E. coli*. Deux produits, au moins, interviennent dans le bassin de Chasse, qui peuvent être reconnus par leurs propriétés de réactivation par la lumière après autoclavage.