

C.I.P.S.

MODELE MATHEMATIQUE DE LA
POLLUTION EN MER DU NORD

Dr. ir. E. JASPERS

TECHNICAL REPORT
1973/BACT.07

This paper not to be cited without prior reference to the author

EFFET ANTIBIOTIQUE POTENTIEL DE L'EAU DU BASSIN DE CHASSE D'OSTENDE - 1973.

C. JOIRIS (avec l'aide technique de A. De Bock-Fonck)
Laboratorium voor Ekologie en Systematiek
VRIJE UNIVERSITEIT BRUSSEL

Les résultats obtenus en 1973 sur l'effet antibiotique de l'eau du bassin de chasse d'Ostende vis-à-vis d'E. coli sont présentés sous forme résumée dans ce rapport. Les détails expérimentaux restent bien sûr à la disposition des personnes intéressées.

I. Cycle annuel

Chaque expérience comporte au moins une cinétique réalisée avec de l'eau fraîche non traitée : les valeurs de latence et de t_{50} obtenus se trouvent dans le tableau I.

Les témoins réalisés avec de l'eau stérilisée par autoclavage et testée à l'obscurité, ont également été systématiquement suivis ; aucun effet antibiotique significatif n'y a jamais été décelé. Les témoins réalisés avec la même eau stérile, mais exposés à la lumière, par contre, montrent tantôt une disparition des E. coli (résultats notés + dans le tableau I), tantôt un maintien de cette population, voire une légère croissance (résultats notés -), tantôt enfin, un comportement intermédiaire où les E. coli diminuent un peu, puis repoussent à

à leur niveau initial (résultats notés +).

Une troisième série d'expériences consiste à "réensemencer" l'eau stérilisée par de l'eau fraîche, à raison de 1/10 et 1/1.000 d'eau fraîche. Le résultat généralement obtenu est celui d'un effet antibiotique dont le t_{50} est comparable à celui de l'eau fraîche, mais la latence nettement allongée (figure 1); ce type de résultat est noté + dans le tableau I (le résultat noté - signifie que les courbes d'effet antibiotique sont comparables dans l'eau fraîche et l'eau fraîche 1/10).

L'utilisation de tels témoins, indépendamment de l'interprétation qui peut en être donnée, permet en tout cas de discerner diverses périodes dans l'année, correspondant vraisemblablement à des mécanismes différents de l'effet antibiotique (voir plus loin). Par exemple, en se basant sur les témoins stériles exposés à la lumière, on peut à partir du 12.02.1973, discerner 4 grandes périodes : jusqu'au 14.03; du 16.03 au 02.05, du 10.05 au 06.06; du 14.06 au 09.08.

II. Variations au cours d'un cycle de 24 heures

Les 7 mesures d'effet antibiotique réalisées au cours d'un cycle de 24 heures (tableau II) ne reflètent aucune variation marquée ni de la latence, ni du t_{50} : elles servent ainsi à montrer que la reproductibilité de la méthode est satisfaisante.

III. Effet de la température

Comme il fallait s'y attendre, la température a un effet marqué sur les cinétiques d'effet antibiotique (tableau III). Cet effet semble surtout influencer la latence, moins le t_{50} . Il est donc clair que la température peut, en partie du moins, expliquer les variations saisonnières d'effet antibiotique mis en évidence in situ, à partir des comptages des bactéries de la pollution (voir notre rapport de synthèse 1972).

IV. Comparaison entre des valeurs obtenues in situ et in vitro

Lorsque le bassin de chasse vient d'être rempli avec de l'eau polluée du port d'Ostende à forte contamination par les bactéries coliformes, il est possible de suivre au cours du temps la disparition de ces bactéries de l'eau.

Une telle situation ne s'est pas présentée souvent en 1973, pour deux types principaux de raisons :

- d'une part, l'eau qui entre dans le bassin ne contient pas toujours assez de bactéries coliformes pour que leur nombre puisse être suivi par nos techniques de comptage;
- d'autre part, si les ouvertures des écluses ont été très fréquentes en 1973, au point de saboter une grande partie de notre travail, elles ont généralement lieu sans que nous en soyons prévenus. De sorte qu'il ne nous a que très rarement été possible de profiter, du seul aspect positif que peut à nos yeux avoir un remplissage du bassin par de l'eau fraîche.

De sorte que nous ne disposons que d'une valeur pour l'année 1973, qui permette de comparer les vitesses de diminution d'*E. coli* in vitro et du groupe des coliformes in situ. Dans ce cas précis (tableau IV), les valeurs obtenues semblent identiques.

V. Etude de la latence

Le problème théorique principal qu'il faut résoudre pour pouvoir transposer les résultats obtenus in vitro aux relations existant réellement in situ semble être la compréhension du mécanisme sous-jacent aux deux phases observées au cours d'une cinétique. Jusqu'à présent en effet, nous avons utilisé la valeur t_{50} comme caractérisant le mieux une cinétique.

Mais les phénomènes qui peuvent se dérouler pendant la latence (croissance de bactéries, excrétion de substances par le phytoplancton, destruction partielle du phytoplancton, etc...) risquent de transformer la mesure réalisée en une mesure d'effet antibiotique POTENTIEL, dont le t_{50} ne serait pas toujours comparable aux vitesses réelles de disparition des *E. coli* in situ.

C'est pourquoi quelques expériences ont été faites au laboratoire, dans le but de glaner quelques informations sur le mécanisme responsable de la période de latence :

1. Nous avons déjà décrit (paragraphe I, figure 1) les expériences de "réensemencement" d'eau stérilisée par de l'eau fraîche. Des résultats plus complets sont repris dans le tableau V. On peut considérer que, par cette manipulation, on a dilué dans de l'eau stérile inactive les organismes (ou les substances) responsables de l'effet antibiotique. Suivant le modèle théorique que l'on retient pour expliquer la cinétique de disparition des *E. coli* dans l'eau fraîche, le résultat obtenu (allongement de la latence) peut permettre de calculer grossièrement une vitesse de croissance des organismes responsables, ou une vitesse d'excration des substances responsables, par exemple.

2. Addition de matières organiques

L'addition de matières organiques à de l'eau fraîche, au temps zéro de la cinétique d'effet antibiotique, ne modifie pas fondamentalement la cinétique de disparition des *E. coli* (tableau VI et tableau VII, partim). Ainsi donc, la chute des *E. coli* n'est pas supprimée, ni même retardée, par cette addition : ce résultat semble suffisant pour éliminer l'hypothèse, souvent avancée dans la littérature, d'une simple compétition entre bactéries hétérotrophes et *E. coli* pour des matières organiques trop rares dans l'eau de mer.

S'il en était ainsi, en effet, une addition importante de matières organiques devrait supprimer l'effet antibiotique en permettant la survie des *E. coli*, ou tout au moins en retarder la disparition.

Une autre méthode d'expérimentation consiste à ajouter des matières organiques dans de l'eau de mer, puis de suivre au cours du temps l'évolution de la latence (et du t_{50}) en ensemencant successivement des aliquotes de cette eau avec *E. coli*.

Chronologiquement, nous avons d'abord voulu savoir quelle fraction de la culture d'*E. coli* influençait le plus la latence (tableau VII); puis si la nature de la matière organique ajoutée jouait un rôle important (tableaux VIII et IX) enfin, si la concentration ajoutée modifiait le résultat obtenu (tableau X).

On peut constater, à partir de ces résultats, que l'addition de matières organiques au temps zéro (donc en l'absence de *E. coli*) déclenche l'équivalent de la latence, de sorte que les latences ultérieurement observées sont de plus en plus courtes, mais gardent une valeur stable si l'on calcule ("latence totale") le temps qui s'est réellement écoulé depuis l'addition des matières organiques. Le type de matières organiques ajoutées, ni leur concentration, ne semblent jouer un rôle particulier dans ce déclenchement de la latence. Ce n'est qu'aux très fortes concentrations (voir tableau X, bouteille B) que les matières organiques permettent une croissance des *E. coli* telle que tout effet antibiotique y est masqué.

Cet effet des matières organiques ajoutées se perd après quelques jours (1 semaine environ), ce qui correspond vraisemblablement à un retour à la normale, après que toutes les matières ajoutées aient été consommées par les bactéries hétérotrophes.

Une interprétation complète de ces résultats n'est pas simple. Constatons seulement qu'ils s'intègrent le mieux dans une hypothèse qui rendrait les bactéries hétérotrophes parfois responsables de l'effet antibiotique. (voir aussi tableau XII)

Tout en notant qu'il est également possible, mais moins vraisemblable, que des espèces phytoplanctoniques partiellement hétérotrophes soient sensibles à l'addition de matières organiques.

(à suivre)

Tableau I

Effet antibiotique au bassin de chasse (1973)

date (1973)	eau fraîche latence (h)	t_{50} (h)	eau stérile (lumière)	eau fraîche diluée dans de l'eau stérile
08.01	63	2.30	-	+
(05.02)*	25	2.15	-	+
06.02	49	3.30	-	-
12.02	48	3.30	+	+
(19.02)	71	3	-	+
05.03	39	3	+	+
14.03	50	2	+	+
16.03	59	2.30	-	-
19.03	61	2.10	-	-
20.03	46	3	-	-
21.03	66	1.30	-	+
22.03	42	3	-	-
23.03	43	2.10	-	-
29.03	48	5	-	-
05.04	47	4.10	-	-
10.04	63	4	-	+
11.04	55	3.30	-	+
18.04	59	3	-	-
25.04	41	5.15	-	-
02.05	23	5	-	+
10.05	0	4.30	+	+
16.05	63	2.30	+	-
23.05	36	1.50	-	+
24.05	57	4.45	-	-
25.05	113	3.45	+	-
28.05	52	3	-	-
29.05	50	2	-	-
30.05	45	3	+	-
31.05	28	3	-	+

Tableau I. (suite) Effet antibiotique au bassin de chasse
(1973)

date (1973)	eau fraîche		eau stérile (lumière)	eau fraîche diluée dans de l'eau stérile
	latence (h)	t_{50} (h)		
01.06	54	3.15		
06.06	28	2	+	+
(13.06)	40	5.30		
14.06	22	5	-	+
	18	4		
19.06	16	6.30	-	+
27.06	41	5		
04.07	13	6		
18.07	35	3	-	
(23.07)	44	4	-	
25.07	35	8	-	-
30.07	53	3.45		
01.08	32	3.45	-	+
(07.08)	62	5		
09.08	38.30	2.30	-	+
20.08	42	3	+	+
29.08	33	2.30	-	+
05.09	37	2	+	+
25.09	21	2	+	+

*

Les dates notées entre parenthèses indiquent des expériences faites à la date marquée, avec de l'eau prélevée précédemment (en général, une ou deux semaines plus tôt).

Tableau II. Variations de l'effet antibiotique au cours
d'un cycle de 24 heures. Bassin de chasse, 29.05.1973

heure	lat. (h)	t_{50} (h)
00	38	3
04	50	3
08	48	2
12	50	2
16	42	2
20	36	3.30
24	44	2.30
moyenne	44	3.30

Tableau III. Effet de la température sur l'effet antibiotique

date	température d'incubation	latence (h)	t_{50} (h)
09.10.1972	18°	22	2.45
	4°	200	4
12.02.1973	18°	48	3.30
	30°	26	3.0
	04°	$\infty (> 175)$	-

Tableau IV. Comparaison entre la vitesse de disparition des bactéries coliformes in situ et des *E. coli* in vitro

Bassin de chasse, 23.05.1973

	lat.	t_{50}
<u>In situ</u>	0	1.50
<u>In vitro</u>	36	1.50

Tableau V. Effet de la dilution d'eau fraîche dans de l'eau stérile sur les cinétiques de disparition d'E. coli.

Pour chaque cinétique sont cités : latence/t₅₀ (en heures)

date (1973)	eau fraîche dans eau stérile (%)					
	100	10	1	0.1	0.01	0
08.01	63/2.30	75/3	96/3.30	∞	∞	∞
(05.02)	25/2.15	55/5	85/4.30	120/2.45	∞	∞
(19.02)	71/3.			153/2	∞	∞
05.03	39/3.30	85/2.30	126/3	∞	∞	∞
14.03	50/2		117/2			∞
16.03	59/2.30	62/2				∞
21.03	66/1.30		84/(6)			∞
30.03	48/5	∞				∞
05.04	47/4.10	47/4.10				∞
10.04	63/(4)	135/2.30				∞
11.04	55/3.30	67/3.10				∞
18.04	59/3	59/3		113/2		∞
03.05	23/5	55/3		82/4		∞
10.05	0/4.10	50/3.30		(116/2.30)		∞
16.05	63/2.30	63/2		113/2.10		∞
23.05	36/1.50	80/3		>150		∞
30.05	45/3	43/3.30		85/2.30		∞
06.06	28/2	45/2		83/(2)		∞
14.06	22/5	52/2		107/5.10		∞
19.06	16/6.30	50/4		93/(2)		∞
25.07	35/8	(45/8)		(45/8)		∞
09.08	38.30/2.30	84/2		110/(1)		∞
20.08	42/3	61/2.45		88/3.45		∞
(27.08)	43/4	92.30/2.15		154/4		∞
29.08	33/2.30	44/3.30	60/3	(85/1.30)	85/4	∞
05.09	37/2	58/3		98/1.45		∞
25.09	21/2	62/3		110/5.30		∞

Tableau VI. Effet de l'addition de matières organiques
 sur la cinétique d'effet antibiotique
 Milieu ajouté : milieu riche (glucose-peptone)
 servant à la préculture des E. coli.

date	addition (ml de milieu par 100 ml d'eau fraîche)	latence	t_{50}
08.01.1973	0	63	2.30
	0.01	61	3.30
	0.1	54	3.
	1	73	(2)
	11	62	(5)

Tableau VII. Influence des matières organiques sur la latence.

Au temps zéro (30.07.1973, 14 h 30), les bouteilles ont subi les additions suivantes :

bouteille A : rien (témoin : eau fraîche non traitée)
 B : 0.05 % d'une culture d'*E. coli* stérilisée par autoclavage
 C : 0.05 % du milieu d'une culture stérilisée par autoclavage, les cellules ayant été éliminées par centrifugation
 D : 0.05 % du milieu d'une culture non traitée d'*E. coli*, les cellules ayant été éliminées par centrifugation.

A partir de chacune de ces bouteilles, des aliquotes ont été ensemencées avec *E. coli* et une cinétique d'effet antibiotique mesurée aux temps suivants :

t_0 , t_1 (19 h 30 plus tard), t_2 (46 h 30 après t_0), t_3 (92 h 30), t_4 (7 jours).

Les témoins stériles, réalisés aux temps t_0 et t_4 , sont normaux et ne montrent pas de chute d'*E. coli*.

bouteille	temps t_0	t_1 (19h30)	t_2 (46h30)	t_3 (92h30)	t_4 (170 h)
A t_{50}	3.45	4	3	2.45	—
Latence	53	82	80	63	—
B t_{50}	4	3.50	4.30	3.20	7
latence	77	60	25	0	21
latence totale	77	79.30	71.30	(92.30)	—
C t_{50}	3.50	3	4.15	4	2.45
latence	64	53	31	0	35
latence totale	64	72.30	77.30	(92.30)	—
D t_{50}	4	3	3.15	(7.30)	3
latence	74	53	21	0	31
latence totale	74	72.30	67.30	(92.30)	—
B,C,D, latence moyenne	71	55	25.30	0	29
LAT. totale moy.	71	74.30	72	(92.30)	—

Tableau VIII.

Influence de matières organiques de différentes natures sur la latence.
 Au temps zéro (07.08.1973, 15 h), les additions suivantes ont été réalisées :
 bouteille A : (témoin sans addition)
 B : 0.05 % milieu de culture d'E. coli, non ensemencé (glucose-peptone)
 C : 0.05 % milieu d'une culture d'E. coli, les cellules ayant été
 éliminées par centrifugation

bouteille	temps t_0	t_1 (24 h)	t_2 (48 h)	t_3 (72 h)	t_4 (120 h)	t_5 (14 jours)
A	t_{50}	5	4	4	2.30	3.10
	latence	62	54	62	42	0
B	t_{50}	4	4	6.30	5	4
	latence	60	44	14	8	32
	latence tot.	60	68	62	80	152
C	t_{50}	4.45	4.30	5	4	3.30
	latence	62	39	28	11	47
	lat. totale	62	61	76	83	167
B,C : lat. moyenne		61	41.30	28	9.30	40
lat. totale moyenne		61	65.50	76	81.30	160

Tableau IX. Influence des matières organiques sur la latence.

Au temps zéro (21.08.1973, 10 h), les additions suivantes ont été réalisées :

bouteille A : (témoin sans addition)

B : 0.05 % de milieu de culture non ensemencé

C : 0.05 % d'une solution à 30 % de glucose

D : 0.05 % d'une solution à 10 % de peptone

E : 0.05 % de milieu de culture d'E. coli, les cellules ayant été éliminées par centrifugation.

bouteille	t_0	t_1 (25 h)	t_2 (49 h)	t_3 (74 h)	t_4 (6 jours)
A	t_{50}	2	4.30	4	2.30
	latence	41	24	47	60
B	t_{50}	2.10	2	1.30	6
	latence	42	15	0	0
	lat. totale	42	40	(49)	(74)
C	t_{50}	3.15	2	1.45	1.45
	latence	32	19	0	0
	lat. totale	32	44	(49)	(74)
D	t_{50}	4	5	2.30	1
	latence	55	27	0	0
	lat. totale	55	52	(49)	(74)
E	t_{50}	1.30	2.10	2	2.30
	latence	45	16	0	0
	latence totale	45	41	(49)	(74)
B,C,D,E : latence moyenne		43.30	19.10	0	0
lat. tot. moy.		43.30	44.10	(49)	(74)

Tableau X. Influence des matières organiques sur la latence

Au temps zéro (30.08.1973, 15 h 30) ont été réalisées les additions suivantes :

bouteille A : - (sans addition)

B : 5 % de milieu de culture non ensemencé (glucose - peptone)

C : 0.05 % idem

D : 0.01 % idem

bouteille	t_0	t_1 (23 h)	t_2 (43 h)
A t_{50} latence	3 41	5 57	3 52
B t_{50} latence	*	5 57	3.30 38
latence totale			
C t_{50} latence	3 38	3 17	4.30 0
latence totale	38	40	43
D t_{50} latence	3 45	4.30 25	4.30 0
latence totale	45	48	43
C,D : latence moyenne	41.30	21	0
latence totale moyenne	41.30	44	43

*

Dans la bouteille B, au t_0 , on a observé une nette croissance des E. coli.

Tableau XI.

Comptages de bactéries hétérotrophes marines
après addition de matières organiques
(voir tableaux VII à X)
Nombre de bactéries ($\times 10^5$ b./ml)

Expérience	Bouteil-le	t_0	t_1	t_2	t_3	t_4
30.07.1973	A	0.14			0.53	
	B				2.60	1.91
	C				2.41	1.06
	D				2.91	1.57
07.08.1973	A	0.55			5.53	
	B				>8	
	C				>8	
21.08.1973	A	2.21		0.34	0.36	
	B			>12	0.43	
	C			>10	0.45	
	D			>20	6.0	
	E			2.83	0.38	
30.08.1973	A		0.35	1.11		
	B		>200	>1000		
	C		40	1.27		
	D		14.7	10.3		

Figure 1.

Effet de la dilution d'eau fraîche dans de l'eau stérile sur la cinétique de disparition d'E. coli (expérience de "réensemencement" de l'eau stérile par de l'eau fraîche).

Courbe n° 1	100 % eau fraîche
n° 2	10 % eau fraîche
n° 3	1 % eau fraîche
n° 4	0,1 % eau fraîche
n° 5	0,01 % eau fraîche
n° 6	0 % eau fraîche (témoin eau stérile)

Bassin de chasse d'Ostende, le 08.01.1973

