

UNIVERSITE DE RENNES I

FACULTE DE PHARMACIE

Année 1995

N° 35

THESE

EN VUE DU

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE RENNES I

Mention :

SCIENCES BIOLOGIQUES ET SANTE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 30 mars 1992

**DEVENIR DES BACTERIES ENTERIQUES  
EN MILIEU LITTORAL.  
EFFET DU STRESS SUR LEUR SURVIE.**

par

Monique POMMEPUY née MIGINIAC

Présentée et soutenue publiquement le 13 octobre 1995

**JURY**

<b>Président :</b>	Monsieur M. Cormier	Professeur Université de Rennes I
<b>Directeur de thèse :</b>	Monsieur M. Cormier	
<b>Membres du jury :</b>	Madame I. Barcina	Docteur Université du Pays Basque
	Monsieur B. Baleux	Ingénieur de Recherche Université de Montpellier II
	Madame R.R. Colwell	Professeur Université du Maryland
	Monsieur P. Bourlioux	Professeur Université de Paris XI
	Monsieur J.F. Guillaud	Ingénieur IFREMER
	Monsieur G.P. Allen	Professeur University of Brisbane

**FACULTE DE PHARMACIE**  
**PERSONNELS ENSEIGNANTS**

1994-1995

=====

**Laboratoire de BIOCHIMIE**

Monsieur le Docteur BIHAIN Bernard, Chef de Service  
Monsieur HANNOUCHE Nabil, Maître de Conférences  
Mademoiselle Frances YEN, Maître de Conférences  
Monsieur CHEVREUIL, ATER  
Madame LE ROY Brigitte, assistante  
Mademoiselle KHALLOU Jamila, ATER

**Laboratoire de BIOLOGIE CELLULAIRE & VEGETALE**

Monsieur le Professeur CILLARD Pierre, Chef de Service  
Madame le Professeur CILLARD Josiane  
Madame DELAGE Elisabeth, Maître de Conférences  
Mademoiselle MOREL Isabelle, Maître de Conférences  
Madame FERRY Jocelyne, ATER

**Laboratoire de CHIMIE ANALYTIQUE & BROMATOLOGIE**

Monsieur le Professeur BURGOT Jean-Louis, Chef de Service  
Madame PLANTARD Claude, Maître de Conférences  
Monsieur BOUDEVILLE Philippe, Maître de Conférences  
Madame BURGOT Gwénola, Maître de Conférences  
Monsieur BERTRAND Hugues, ATER

**Laboratoire de CHIMIE PHARMACEUTIQUE**

Madame le Professeur SAULEAU Armelle  
Monsieur le Professeur LEBORGNE Jean-Yves  
Madame DAVID Michèle, Maître de Conférences  
Monsieur SAULEAU Jean, Maître de Conférences  
Monsieur URLAC Philippe, Maître de Conférences  
Monsieur CORBEL Jean-Charles, Assistant  
Monsieur MEILLARD Didier, Assistant  
Madame OLLIVIER Christine, Assistante  
Mademoiselle MARTIN Ghislaine, ATER  
Monsieur JEGO Jean-Michel, ATER

**Laboratoire de BIO-MATHEMATIQUES ET PHYSIQUE PHARMACEUTIQUES**

Monsieur le Professeur SEGUI Alain, Chef de Service  
Monsieur le Professeur TAIEB Guy (en congé thématique)  
Monsieur GUERIN Jacques, Maître de Conférences  
Monsieur HOUeix Alain, Maître de Conférences  
Madame LE FLOCH Marie, Maître de Conférences

**Laboratoire de MICROBIOLOGIE & IMMUNOLOGIE PHARMACEUTIQUE**

Monsieur le Professeur CORMIER Michel, Chef de Service  
Madame le Professeur GENETET Noëlle  
Madame POMMEPUY Monique, Professeur Associé  
Madame SAUVAGER Françoise, Maître de Conférences  
Monsieur MINET Jacques, Maître de Conférences  
Madame SCHAAN Marisella, ATER

#### **Laboratoire de PARASITOLOGIE PHARMACEUTIQUE**

Monsieur le Professeur DEUNFF Jean, Chef de Service  
Madame BEAUCOURNU Françoise, Maître de Conférences  
Madame BUNETEL Laurence, Maître de Conférences

#### **Laboratoire de PHARMACIE GALENIQUE, BIOPHARMACIE & PHARMACIE CLINIQUE**

Monsieur le Professeur LEVERGE Roger, Chef de Service  
Madame le Professeur ACAR Liliane,  
Monsieur le Professeur SADO Pierre  
Monsieur LECORRE Pascal, Maître de Conférences  
Monsieur GIBASSIER Denis, Maître de Conférences

#### **Laboratoire de PHARMACODYNAMIE et PHARMACOLOGIE MOLECULAIRE**

Monsieur Le Professeur LEGRAND Alain, Chef de Service  
Monsieur le Professeur LAGENTE Vincent, ATER  
Madame LAGENTE, ATER  
Melle MARTIN Corinne, ATER

#### **Laboratoire de PHARMACOGNOSIE & MYCOLOGIE**

Monsieur le Professeur GIRRE René-Loïc, Chef de Service  
Madame AMOROS Maryvonne, Maître de Conférences  
Monsieur BOUSTIE Joël, Maître de Conférences

#### **Laboratoire de PHYSIOLOGIE PHARMACEUTIQUE**

Monsieur le Professeur RAULT Bernard, Chef de Service  
Monsieur SAIAG Bernard, Maître de Conférences  
Monsieur FARDEL Olivier, ATER  
Madame GIRRE Annie, Assistante

#### **Laboratoire de TOXICOLOGIE**

Monsieur le Professeur ANGER Jean-Pierre, Chef de Service  
Madame PELLISSIER Catherine, Maître de Conférences  
Madame ANGER Françoise, Assistante

#### **ANGLAIS**

Monsieur BOUER Guy

# **AVANT-PROPOS**

*Je remercie Monsieur le Professeur M. Cormier qui me fait l'honneur de présider le jury de la thèse, pour avoir initié et soutenu cette recherche, pour son intérêt, ses conseils et ses encouragements tout au long de ces années de travail.*

*J'adresse tous mes remerciements à Madame le Docteur I. Barcina qui m'a fait l'honneur de juger ce travail. Qu'elle soit assurée de ma profonde considération.*

*Tous mes sincères remerciements à Monsieur le Docteur Baleux d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, qu'il reçoive ma reconnaissance à bien vouloir l'honorer de son jugement.*

*Je remercie le Professeur R.R. Colwell qui me fait l'honneur de participer à ce jury, pour l'exemple qu'elle m'a montré par sa compétence et sa disponibilité. Qu'elle soit assurée de mon admiration et de mon respect.*

*Je remercie très vivement Monsieur le Professeur Bourlioux d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse, qu'il reçoive le témoignage de ma sincère gratitude.*

*J'adresse tous mes remerciements à Monsieur le Professeur G.P. Allen pour m'avoir fait découvrir l'océanographie et en particulier les estuaires, son approche pluridisciplinaire des mécanismes est à l'origine de ce travail. Qu'il soit assuré de ma gratitude et de mon admiration.*

*Je remercie chaleureusement Monsieur J.F. Guillaud. Sa compétence et sa disponibilité m'ont soutenue dans ce travail. Sans son aide certains aspects n'auraient pu être mis en valeur. Qu'il trouve ici le témoignage de ma reconnaissance.*

*Cette étude est le résultat d'un travail d'équipe pluridisciplinaire. Elle n'aurait pu avoir lieu sans la contribution de mes collègues du département Environnement Littoral de l'IFREMER. Je tiens à remercier vivement toutes les personnes qui de loin ou de près ont participé à ce travail :*

*Tout particulièrement le laboratoire de Microbiologie de Brest et de Nantes et spécialement Melle Derrien A. et Mme M.P. Caprais pour leur collaboration quotidienne, Mme E. Dupray, Mme M. Gourmelon, Melle Melikechi pour leur compétence. Merci également à S. Le Guyader pour ses encouragements et ses conseils lors de la synthèse de ce travail.*

*Je tiens à remercier J. L'Yavanc et Ph. Bassoullet ; ce travail n'aurait pu avoir lieu sans leur aide, leur participation aux campagnes et aux analyses ; merci aussi pour leur compétence et leur amitié.*

*Mme D. Guillerm a contribué à la réalisation matérielle de cet ouvrage, je tiens à la remercier ici de sa disponibilité et de son aide.*

*Merci aussi à C. Alzieu pour sa confiance, aux collègues des équipes hydrodynamique et sédimentologie, Chimie des contaminants et Modélisation pour leur contribution : Mme M. Breton et MM. P. Le Hir, A. Aminot, R. Kerouel, J.C. Salomon, J.L. Mauvais, et P. Lazure.*

*Un grand merci pour mes collègues du laboratoire de Microbiologie de l'Université de Rennes pour leur collaboration au cours de ces années.*

*Merci enfin à Madame le Professeur L. Fiksdal, qu'elle trouve ici l'expression de mon admiration et de ma considération.*

# SOMMAIRE

INTRODUCTION .....	1
--------------------	---

## CHAPITRE I - LES APPORTS BACTERIENS A LA COTE

INTRODUCTION .....	2
I - MATERIEL ET METHODES .....	2
1. Coliformes thermotolérants .....	2
2. Streptocoques fécaux .....	3
3. Salmonelles .....	4
4. Autres paramètres .....	4
II - OUEST COTENTIN .....	6
1. Généralités .....	6
2. Calcul des flux potentiels .....	11
2.1. <i>Protocole adopté</i> .....	11
2.2. <i>Résultats</i> .....	12
3. Conclusion .....	14
III - LA RADE DE BREST .....	17
1. Généralités .....	17
2. Concentrations et flux bactériens .....	18
3. Conclusion .....	20
IV - L'ESTUAIRE DE MORLAIX .....	23
1. Généralités .....	23
2. Concentrations et flux bactériens .....	23
V - SITE DE TOULON .....	25
1. Généralités .....	25
2. Concentrations et flux bactériens .....	25
3. Conclusion .....	26
VI - LA BAIE DE FORT DE FRANCE .....	27
1. Généralités .....	27
2. Concentrations et flux bactériens .....	28
3. Conclusion .....	30
VII - RECHERCHE DES SALMONELLES .....	31
1. Ouest Cotentin .....	31
2. Sites de Morlaix et de Toulon .....	31
VIII - CONCLUSIONS .....	32



## CHAPITRE II - QUALITE DU MILIEU

INTRODUCTION .....	36
<b>I - MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>37</b>
1. Coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux.....	37
2. Coliformes totaux .....	37
3. Flore hétérotrophe.....	38
4. Autres paramètres .....	38
<b>II - L'OUEST COTENTIN .....</b>	<b>40</b>
1. Distribution des concentrations bactériennes aux débouchés des havres de Regnéville et de la Vanlée.....	41
2. Etude de la contamination des eaux côtières (entre Granville et l'embouchure du havre de Regnéville.....	42
3. Conclusion .....	45
<b>III - RADE DE BREST .....</b>	<b>47</b>
1. Distribution des concentrations bactériennes.....	47
1.1. Variations spatiales.....	47
1.2. Variations temporelles .....	47
2. Etude des relations entre les bactéries et les paramètres physico-chimiques .....	47
3. Etude des corrélations entre les germes-tests .....	50
4. Conclusions.....	53
<b>IV - ESTUAIRE DE MORLAIX .....</b>	<b>56</b>
1. Contamination des eaux en mortes eaux .....	56
2. Contamination des eaux en vives eaux .....	59
3. Conclusion .....	59
<b>V - LA BAIE DE TOULON.....</b>	<b>61</b>
1. Dilution des eaux usées.....	61
2. Résultats du modèle (Thouvenin, 1991).....	62
3. Conclusions.....	63
<b>VI - LA BAIE DE FORT DE FRANCE .....</b>	<b>65</b>
1. Contamination fécale de la baie.....	65
2. Conclusion .....	67
<b>VII - CONCLUSIONS .....</b>	<b>67</b>

## CHAPITRE III - DEVENIR EN MER DES BACTERIES ENTERIQUES

INTRODUCTION.....	70
I - MATERIEL ET METHODES.....	74
1. L'étude des relations bactéries-particules.....	74
2. Etude de la décantation des bactéries.....	75
3. Etudes de la contamination du sédiment (Ouest-Cotentin).....	75
4. Etude de l'implantation d'une souche d' <i>Escherichia coli</i> dans le sédiment .....	76
5. Etude de la survie d' <i>E. coli</i> en mer (T90) .....	76
II - ETUDE DES RELATIONS BACTERIES-PARTICULES (RADE DE BREST) .....	78
1. Filtration différentielle .....	78
2. Examens au microscope à balayage .....	78
3. Conclusions.....	81
III - ETUDE DE LA CONTAMINATION D'UN SEDIMENT SABLEUX (OUEST COTENTIN) .....	84
IV - ARTICLE 2 - REJETS URBAINS ET CONTAMINATION FECALE.....	90
V - ARTICLE 3 : IMPLANTATION <i>D'ESCHERICHIA COLI</i> EN PILOTE EXPERIMENTAL ET INFLUENCE DES COMPETITIONS DE FLORE .....	91
VI - ETUDE DU COEFFICIENT DE DECROISSANCE (T90) .....	92
INTRODUCTION.....	93
1. Résultat sur le site de l'Ouest Cotentin.....	94
2. Martinique .....	97
3. Conclusion .....	101
VII - ARTICLE 4 : MATHEMATICAL MODEL OF BACTERIAL CONTAMINATION OF MORLAIX ESTUARY (FRANCE).....	105
VIII - ARTICLE 5 : MODELISATION DU TRANSPORT DISSOUS ET PARTICULAIRE DANS L'ESTUAIRE DE MORLAIX. APPLICATION AU DEVENIR DES BACTERIES ENTERIQUES.....	106
IX - ARTICLE 6 : A MATHEMATICAL MODEL FOR ENTERIC BACTERIA IN COASTAL AREAS.....	107
X - CONCLUSION.....	108

## CHAPITRE IV - LE STRESS LIE AU MILIEU MARIN

INTRODUCTION.....	112
I - ARTICLE 7 : ENTERIC BACTERIA SURVIVAL FACTORS.....	119
II - ARTICLE 8 : USE OF THE DIRECT VIABLE COUNT (DVC) FOR THE ASSESSMENT OF SURVIVAL OF <i>E. COLI</i> IN MARINE ENVIRONMENTS.....	120
III - ARTICLE 9 : RETENTION OF ENTEROPATHOGENICITY BY VIABLE BUT NONCULTURABLE <i>ESCHERICHIA COLI</i> EXPOSED TO SEAWATER AND SUNLIGHT .....	121
IV - ARTICLE 10 : VISIBLE LIGHT DAMAGE TO <i>ESCHERICHIA COLI</i> IN SEAWATER : OXIDATIVE STRESS HYPOTHESIS.....	122
V - ARTICLE 11 : EFFECT OF CARBONYL CYANIDE M-CHLOROPHENYL-HYDRAZONE ON <i>ESCHERICHIA COLI</i> HALOTOLERANCE.....	123
VI - ARTICLE 12 : PRODUCTION OF 4-METHYLUMBELLIFERYL HEPTANOATE HYDROLASE BY <i>ESCHERICHIA COLI</i> EXPOSED TO SEAWATER.....	124
VII - ARTICLE 13 : EFFECT OF SEAWATER ON <i>ESCHERICHIA COLI</i> $\beta$ -GALACTOSIDASE ACTIVITY.....	125
VIII - ARTICLE 14 : MONITORING OF FECAL POLLUTION IN COASTAL WATERS BY USE OF RAPID ENZYMATIC TECHNIQUES .....	126
IX - CONCLUSION.....	127
V - CONCLUSIONS.....	131
LISTE DES ABREVIATIONS.....	134
BIBLIOGRAPHIE.....	136

Carte IGN série verte  
n° 6 - Caen-Cherbourg  
n° 13 - Brest Quimper  
n° 16 - Rennes-Granville  
n° 68 - Toulon-Nice  
"Les Spéciales" - La Martinique  
© IGN - Paris - 199  
Autorisation n° 41.0537

# INTRODUCTION

## INTRODUCTION

Lorsqu'en 1980, le Ministère de l'Environnement a lancé sur la rade de Brest l'étude "acceptabilité du milieu marin" la question était simple : "Que peut-on rejeter comme bactéries fécales dans une zone littorale sans qu'une contamination chronique des eaux ne s'installe".

Les premiers travaux sur la rade de Brest et en particulier sur l'estuaire de l'Elorn avaient pour but de décrire la flore bactérienne de ce site, sa composition, les variations d'abondance. Il s'agissait d'identifier les sources responsables de la contamination afin d'envisager des mesures pour y remédier.

Une partie des résultats obtenus dans l'Elorn est présentée dans l'article 1, ci-joint, et montre la complexité des mécanismes de contamination des eaux côtières :

- Dans cet estuaire de très fortes variations de contaminations fécales sont observées dans le temps et dans l'espace. Ainsi à un point donné la contamination peut en quelques heures passer d'un niveau faible à un niveau très élevé. Ces variations sont dues en partie aux fluctuations de débits de l'Elorn et aux modifications des coefficients de marée et donc de l'amplitude du marnage. Ces facteurs conditionnent les mélanges, la stratification des eaux et les remises en suspension des sédiments déposés dans l'estuaire.

- La flore évolue de l'amont vers l'aval. Près de l'embouchure de la rivière les bactéries sont abondantes et les espèces entériques, dominantes. En aval, les halophiles strictes représentent plus de la moitié de la flore bactérienne en raison de la salinité des eaux (> 30 ‰) et donc de la pression de sélection due au sel.

- Trois sources majeures de contamination sont identifiées : la rivière, le rejet de la station d'épuration et le sédiment. Les deux premières sont directes et continues. La troisième, le sédiment est un apport indirect et discontinu. Alors qu'en période de mortes eaux et donc de faible courant, les eaux de l'estuaire sont fortement contaminées par les apports anthropiques, en vives eaux, les courants remettent en suspension les sédiments déposés au fond. La flore fécale issue du sédiment est bien différenciée, son impact sur la qualité de l'eau n'est pas négligeable.

A partir de ce travail et d'une question simple, bien des problèmes fondamentaux sont posés.

Plusieurs sites côtiers français ont été étudiés pour répondre aux questions soulevées. Les sites sont : la côte située à l'ouest du Cotentin dans la baie du Mont Saint-Michel, la rade de Brest, l'estuaire de Morlaix, la baie de Toulon et la baie de Fort de France en Martinique. Sur ces entités géographiques nous avons tenté d'identifier les flux, la qualité de l'eau et les facteurs responsables du devenir des bactéries fécales rejetées en mer. Ces études ont donné lieu à des travaux collectifs et pluridisciplinaires, car l'approche environnementale ne peut se satisfaire d'une seule discipline.

L'objet de ce travail est d'étudier la contamination fécale identifiée par les coliformes thermotolérants et les streptocoques fécaux. Quelques résultats concernent également les salmonelles. Quatre points sont développés :

- **L'étude des concentrations et des flux bactériens** apportés dans les zones choisies.

- **L'étude de la qualité du milieu** : sur les cinq sites choisis, nous avons étudié la répartition spatio-temporelle de la contamination fécale et de certains paramètres physico-chimiques associés. A travers les caractéristiques des sites, certains facteurs responsables des variations ont été identifiés : lumière solaire, matière organique...

- **Le devenir des bactéries en mer** a ensuite fait l'objet d'études particulières : le comportement des effluents à leur arrivée en mer, la décantation, la contamination du sédiments, les remises en suspension, l'effet de la dilution et de la lumière ont donné lieu à des expérimentations *in vitro* et *in situ*. Ce travail a permis de hiérarchiser sur les sites les facteurs responsables des décroissances bactériennes (effet biologique, physique).

- **Les facteurs du stress marin** ayant été identifiés, nous nous sommes particulièrement intéressés aux **stress osmotique et lumineux (ou oxydatif)** et à leur action sur le métabolisme bactérien : perte de cultivabilité, effet sur les échanges énergétiques et sur quelques activités enzymatiques.

**ARTICLE 1**

**ETUDE DE LA FLORE BACTERIENNE  
D'UN ESTUAIRE BRETON  
(ELORN, RADE DE BREST, FRANCE)**



# Étude de la flore bactérienne d'un estuaire breton (Élorn, rade de Brest, France)

Monique POMMERUY <sup>a</sup>, Michel CORMIER <sup>b</sup>, Laurence BRUNEL <sup>b</sup>,  
Marguerite BRETON <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Direction de l'Environnement et des Recherches Océaniques, Environnement Littoral, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), Centre de Brest, B.P. 337, F 29273 Brest cedex, France.

<sup>b</sup> Laboratoire de Bactériologie Pharmaceutique, UER de Pharmacie, Université de Rennes, avenue du Pr.-L.-Bernard, F 35043 Rennes cedex, France.

Reçu le 4/6/85, révisé le 25/9/86, accepté le 18/11/86.

## RÉSUMÉ

Le but de ce travail est d'étudier la réponse de la flore bactérienne d'un estuaire soumis à un fort marnage et à différentes sources bactériennes : l'eau douce issue d'une rivière et d'une station d'épuration, et le sédiment. Plusieurs milieux de culture (sélectifs ou non), ont été utilisés pour déterminer la provenance des bactéries. L'analyse multivariable des résultats montre que l'estuaire est soumis à deux régimes bien différenciés : en période de faible turbulence (morte eau), il n'y a pas de remise en suspension des sédiments : la flore bactérienne diminue d'amont en aval, les deux sources principales d'alimentation en bactéries étant la rivière et la station d'épuration. On note une augmentation progressive de la fréquence des bactéries endogènes marines par rapport aux flores contaminantes (entérobactéries). En période de turbulence (vive eau - crue de la rivière), il vient s'ajouter au processus précédent une troisième source de contamination constituée par la remise en suspension du sédiment. Cette dernière ne doit pas être négligée puisque le sédiment sert de piège aux bactéries contaminantes.

*Oceanol. Acta*, 1987, 10, 2, 187-196.

## ABSTRACT

Bacterial flora studied in a Brittany estuary (Elorn, rade de Brest, France).

The purpose of this study is to evaluate the behaviour of the bacterial flora of a macrotidal estuary, originating from different sources: the Elorn freshwater river, a sewage treatment plant (STP), and the sediment.

Viable counts were done using several culture media in order to determine where bacteria originated. Principal component analysis showed that the estuary was subjected to two well-defined conditions. On the one hand, during periods of low turbulence (neap tide), resuspension of bottom sediments did not occur. Bacterial flora decreased from the upper reaches of the estuary to its lower part, coming mainly from two sources (river and STP). As a function of salinity variations, bacterial flora showed a progressive increase of the endogeneous flora percentage versus contaminating flora (Enterobacteria). On the other hand, during periods of high turbulence (spring tide, high river flow), a third source of contamination as sediment resuspension was combined with the previous processes.

This third source was far from negligible, and might moreover constitute an important component of the exogeneous contaminating flora of Enterobacteria.

*Oceanol. Acta*, 1987, 10, 2, 187-196.

## INTRODUCTION

De tout temps, les estuaires ont été le lieu de rencontre de diverses activités, parfois antagonistes sur le plan de la qualité des eaux : urbanisation, industrialisation,

loisirs et conchyliculture. De nombreux auteurs ont étudié le comportement des bactéries des estuaires, sous l'angle écologique ou sanitaire.

Ainsi, Ferguson *et al.* (1977), Palumbo et Ferguson (1978) ont montré que les estuaires se comportent vis-



à-vis du milieu marin comme une source de bactéries. Les concentrations trouvées sont fonction des conditions hydrodynamiques (Churchland *et al.*, 1982; Goulder, 1976; 1977; Goulder *et al.*, 1980), de la salinité (Prieur *et al.*, 1984), de la présence d'un bouchon vaseux (Frenel, 1978; Ottmann, Quere, 1979). Des espèces marines telles que les vibrions, dont certains pathogènes (*V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*), se trouvent de façon permanente dans certains estuaires dont ils constituent une partie de la flore autochtone (Colwell *et al.*, 1981; Kaper *et al.*, 1979; 1981; Moltes *et al.*, 1983).

La qualité des eaux rejetées peut conditionner la contamination fécale de l'estuaire (Read *et al.*, 1982) mais, outre les apports anthropiques, le sédiment est pour de nombreux auteurs, une source importante de bactéries. Ainsi Gerba et McLeods (1976), Irving (1977), Labelle *et al.* (1980), Erkenbrecher (1981) observent 100 à 1 000 fois plus de bactéries dans le sédiment que dans l'eau et ceci quel que soit le type de bactéries étudié. Les teneurs en matière organique du sédiment pourraient expliquer en partie ce phénomène; en effet d'excellentes corrélations sont trouvées entre les numérations bactériennes et les teneurs en carbone organique (Dale, 1974; Rublée, 1982).

Ce travail a pour but d'étudier l'influence de différentes sources de bactéries: l'eau douce issue de la rivière Élorne ou de la station d'épuration et le sédiment, sur la flore bactérienne d'un estuaire soumis à un fort

marnage. La technique utilisée ici fait appel à l'obtention de numérations sur plusieurs milieux de culture, permettant de caractériser les différents types de flores.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Cadre de l'étude (fig. 1)

L'estuaire de l'Élorne est situé au nord-est de la rade de Brest. Son bassin versant (400 km<sup>2</sup>) draine une région où les activités agricoles et industrielles (agro-alimentaires) sont importantes. Le débit de la rivière est en moyenne de 4 m<sup>3</sup>/s (évalué au point ED, fig. 1). L'Élorne dans son cours maritime, reçoit le rejet de la station d'épuration de Landerneau (point SE, 40 000 éq/h; traitement secondaire par boues activées). L'estuaire est soumis aux fluctuations de la marée; le marnage en aval varie de 3 m en morte eau à 7 m en vive eau, tandis qu'en amont, il n'est plus que de 1 à 4 m.

A marée haute, la largeur du lit de l'estuaire varie d'une centaine à quelques centaines de mètres. La marée basse découvre de larges vasières, ne laissant plus qu'un chenal large de quelques dizaines de mètres, dont la profondeur est parfois inférieure à 1 m dans la partie amont (points 4 à 7).

Les courants dus à la marée et au débit de la rivière peuvent être élevés (1 à 2 m/s en vive eau à mi-jusant), tandis qu'en morte eau, ils n'excèdent pas 40 cm/s (L'Yavanc *et al.*, 1985).

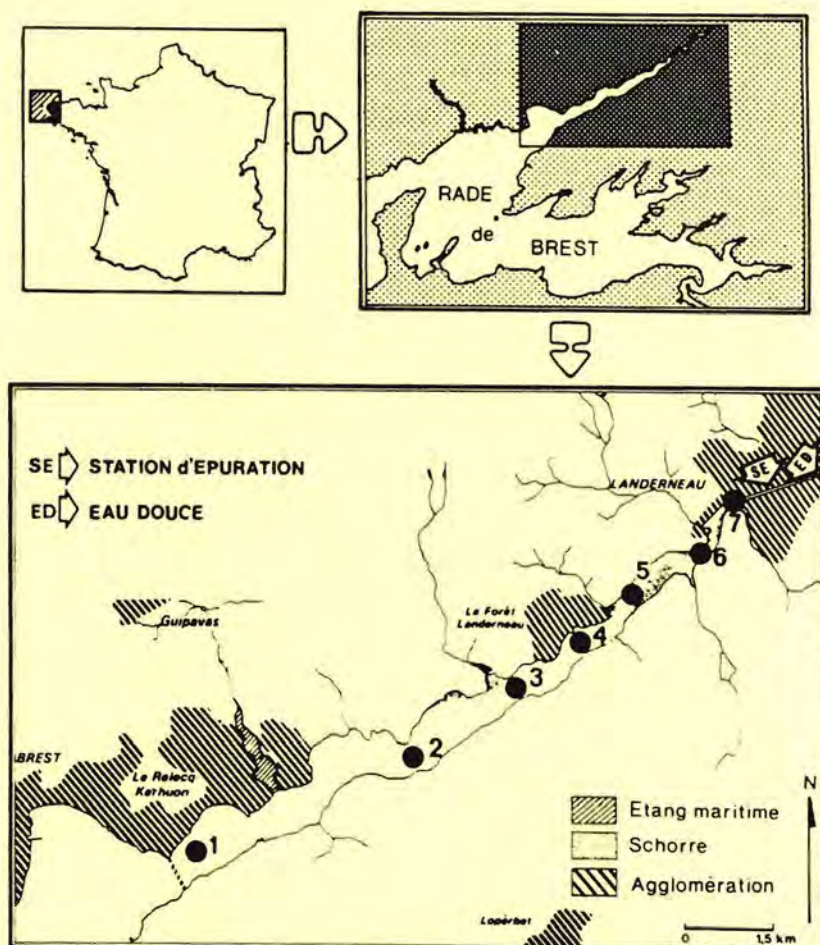


Figure 1  
Présentation du cadre de l'étude.  
Stations, i.e. locations sampled, in Elorn Estuary.

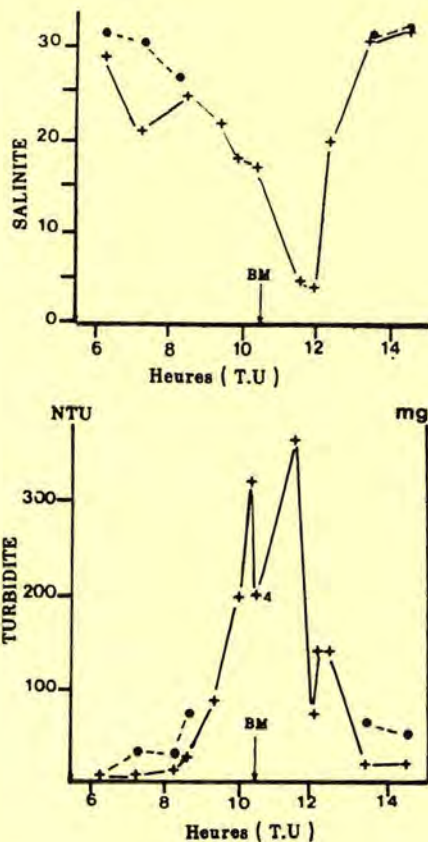


Figure 2  
Évolution de la salinité, de la turbidité et de la vitesse du courant au point fixe (point 5). Estuaire de l'Élorn, 9 août 1983.  
Variations in salinity, turbidity and currents during spring tide (station 5).

La vitesse du courant a pour effet de remettre en suspension les sédiments du fond et des vasières : on peut observer la création d'un bouchon vaseux dynamique, dont l'extension et l'intensité dépendent du débit de la rivière et du coefficient de marée. Ces phénomènes ont déjà été très étudiés dans de nombreux estuaires (Allen, 1972; Bassoullet, 1979; Avoine, 1981; Salomon, Allen, 1983).

Les mesures réalisées sur l'Élorn en 1983 rendent compte de ces phénomènes. La figure 2 illustre les résultats obtenus le 9 août 1983 au point 5 : on note l'importance de la vitesse des courants; l'augmentation de la turbidité 2 à 3 heures avant la basse mer accompagne la chute de salinité; le phénomène de « bouchon vaseux » (turbidité > 100 mg/l) est visible pendant 4 à 5 heures.

**Conditions de mesures**

Plusieurs campagnes de mesures se sont déroulées de janvier à septembre 1983. Le tableau suivant résume les conditions hydrodynamiques de ces mesures.

Jours	Coefficient de marée	Débit Élorn (m <sup>3</sup> /s)
15 janvier	54-58	9,5
25 février	85-85	12
1 mars	110-108	6
22 mars	49-45	7
19 avril	61-55	8
17 mai	75	14
21 juin	63-65	5
9 août	97-101	3
6 septembre	90-97	3,5

Les prélèvements sont réalisés en 7 points répartis le long de l'estuaire; l'eau est prélevée à 1 m au-dessus du fond et à 20 cm sous la surface à l'aide de bouteilles stériles (Arrondeau *et al.*, 1977) pour les analyses bactériologiques, et d'une bouteille Niskin pour les analyses physico-chimiques.

Les stations sont visitées de l'aval vers l'amont à basse mer et à pleine mer; le temps total des prélèvements n'excédant pas 1 h 30 autour des étales, ces mesures sont considérées comme synchrones. Lorsque la navigation n'est pas possible (à basse mer de vive eau, en amont), les prélèvements sont réalisés depuis la rive. A basse mer, on a pu prélever l'eau du rejet même de la station d'épuration. Enfin des échantillons sont pris en eau douce en amont du déversoir de l'Élorn à Landerneau (point ED). Les prélèvements de sédiment sont réalisés à partir d'un zodiac qui, s'échouant sur les vasières en bordure du chenal, permet de prélever directement le sédiment superficiel (premier centimètre) à l'aide d'une boîte stérile.

**Méthodes analytiques**

Dès le prélèvement, les échantillons sont stockés en glacière (5-10°C). La turbidité est mesurée à l'aide du turbidimètre HACM 2100 A. Les résultats sont donnés en unités de turbidité néphélométrique (NTU); un étalonnage permet de convertir ces résultats en milligrammes par litre. La salinité est mesurée avec le salinomètre Beckman RS7C (précision 0,05).

Des analyses de sels nutritifs (NH<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub>, NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>) et de la matière organique dissoute et particulaire ont

également été réalisées sur les mêmes prélèvements et donnent lieu à une exploitation parallèle (Quemeneur, 1984).

Les échantillons prélevés pour la bactériologie, conservés en glacière, sont traités 5 à 6 heures au maximum après le prélèvement.

#### Filtrations, ensemencements et numérations

Seuls les prélèvements de sédiment sont ensemencés au rateau : une anse de 1 g de sédiment est mise en suspension dans 1 ml d'eau physiologique, puis des dilutions sont éventuellement réalisées; les numérations sont exprimées pour 100 ml.

Les numérations bactériennes dans l'eau sont obtenues après filtration sur membrane cellulosique (Millipore, 0,22  $\mu$ , 47 mm).

Selon la turbidité, la charge bactérienne présumée et le milieu à ensemencer, différentes dilutions sont utilisées (chaque prélèvement est traité à deux dilutions différentes). Chaque filtre est ensuite posé sur un milieu de culture.

Les températures d'incubation utilisées sont 25, 37, 42°C. A 25°C, les bactéries des milieux extérieurs sont favorisées, alors qu'à 37°C, et à plus forte raison à 42°C, elles sont inhibées.

Le dénombrement des bactéries est effectué après 24 h ou 48 h d'incubation; le nombre d'unités formant colonies (UFC) est exprimé pour 100 ml.

#### Les milieux de culture

##### Milieux de Drigalski (Institut Pasteur Production)

Deux milieux de Drigalski préparés à l'eau distillée sont ensemencés; l'un est incubé à 37°C (DD), l'autre à 42°C (D42).

Un milieu de Drigalski, préparé à l'eau de mer filtrée (0,22  $\mu$ ), d'une teneur en NaCl voisine de  $40.10^{-3}$ , est incubé à 25°C (DS).

Le milieu de Drigalski est sélectif des bacilles à gram négatif. Il permet de différencier les bactéries lactose positif (L+), colonies jaunes, des bactéries lactose négatif (L-), colonies vertes ou bleues. Les bactéries L+ se développant à 37°C, et surtout à 42°C sont représentatives de la flore de contamination (enterobactéries), tandis que les bactéries L- se développant à 25°C sont représentatives d'une partie de la flore autochtone (*Pseudomonadaceae*, *Vibrio*, etc.), comme cela a été vérifié lors de nos identifications.

##### Gelose trypticase salée (Institut Pasteur Production)

Ce milieu, préparé à l'eau de mer filtrée (teneur en NaCl  $40.10^{-3}$ ), incubé à 25°C pendant 48 heures, permet la croissance des espèces hétérotrophes halotolérantes.

#### Détermination du besoin en sel

Pour chaque prélèvement, à partir du milieu trypticase salée, 10 colonies prélevées au hasard sont réisolées, et leur besoin en sel mis en évidence par ensemencement d'une eau peptonée dépourvue de NaCl. L'absence de

croissance sur un tel milieu révèle le caractère halophile strict des souches étudiées.

#### Traitement des données

Dans un premier temps, les résultats des numérations sur milieu de Drigalski et sur gélose trypticase ont été étudiés en fonction des deux paramètres qui influencent de façon nette l'évolution de la flore bactérienne de l'estuaire : la salinité et les sources de contamination (la station d'épuration et le sédiment).

Nous avons ensuite procédé à une analyse globale de l'ensemble des numérations obtenues sur les différents milieux de culture. Pour ce faire nous avons utilisé l'analyse des correspondances (cf. Le Bart *et al.*, 1977). Les effectifs sont transformés en  $\text{Log}(x+1)^2$ . Les paramètres physicochimiques (turbidité, salinité) étant exclus, seule la variabilité de la flore bactérienne est donc prise en compte. Une technique de traitement similaire, appliquée sur la flore bactérienne littorale de la baie de Saint-Brieuc, a déjà été utilisée par Bunetel et Cormier (1984).

## RÉSULTATS

### La salinité : son rôle sur la pression de sélection et les phénomènes d'halotolérance

Les travaux réalisés sur l'Élorn (L'Yavanc *et al.*, 1985) montrent que ce site se comporte, du point de vue de la salinité, comme un estuaire type : le débit de la rivière et le coefficient de marée régissent les mélanges eau douce-eau salée; ainsi, pour un coefficient de marée donné, plus le débit de la rivière est élevé et plus la stratification verticale des eaux est importante. Pendant les périodes où le débit est faible les eaux sont bien mélangées.

Sur la figure 3 sont présentés les résultats obtenus en surface, lors de conditions moyennes. A basse mer, les eaux douces et salées se mélangent régulièrement, la salinité diminue progressivement de l'aval vers l'amont.

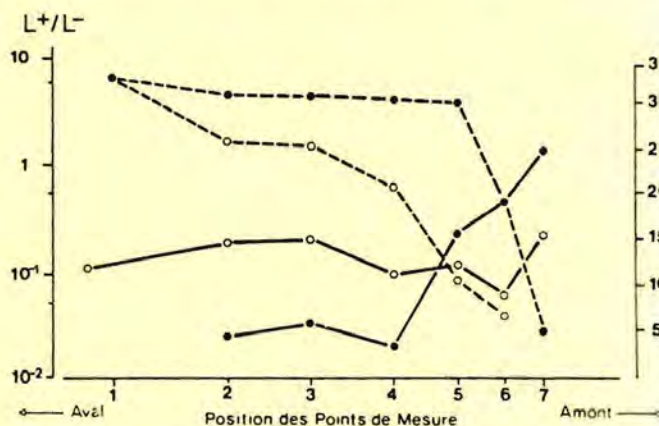


Figure 3

Évolution le long de l'estuaire de la salinité (---) et du rapport (—) des bactéries L+ et L- cultivés sur milieu de Drigalski salé (21 juin 1980, Coef. 63-65, débit  $5 \text{ m}^3/\text{s}$ ). PL ●, BM ○.

Evolution of salinity and L+/L- bacterial ratio along the Elorn Estuary (Drigalski medium, 21 June 1980, neap tide, river flow:  $5 \text{ m}^3/\text{s}$ ). HT ●, LT ○.

l'eau est douce à partir du point 37. A pleine mer, l'influence de la rivière est moins sensible, la salinité demeure très élevée jusqu'au point 5, elle chute alors brutalement en surface. Au point 7 l'eau est douce en surface, alors qu'au fond (non représenté ici), on note la présence d'eau marine ( $27.10^{-3}$ ).

Les numérations bactériennes, et plus particulièrement le rapport L+/L- montrent à basse mer, une relative homogénéité de la flore (rapport presque constant); alors qu'à pleine mer, dans la zone aval, la fréquence de bactéries L+ est faible, elle devient de plus en plus élevée en amont.

Si l'on se reporte aux courbes de salinité pendant le jusant, on observe un mélange progressif des eaux, alors qu'au flot il existe un front de salinité au-delà duquel on constate l'augmentation de la fréquence des bactéries L+ et le changement de flores dans l'estuaire. L'étude de la possibilité pour les bactéries de se développer en l'absence de NaCl (fig. 4) montre que la proportion de bactéries halophiles strictes est importante en aval (elles représentent au point 1 à pleine mer 70% des bactéries) et faible à nulle en amont, ce qui signifie qu'en amont 100% des bactéries isolées sont halotolérantes (même à pleine mer). En fait, dans ce petit estuaire où les fluctuations de salinité sont importantes (d'amplitude supérieure à  $20.10^{-3}$ ) et rapides (quelques heures), la flore de l'estuaire est dominée par les bactéries halotolérantes.

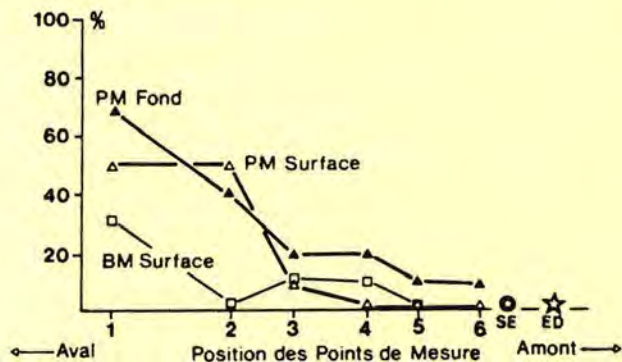


Figure 4  
Évolution le long de l'estuaire du pourcentage de bactéries halophiles strictes (17 mars 1983), en surface à basse mer (□) et à pleine mer (△), et au fond à pleine mer (▲).  
*Evolution of halophilic bacteria ratio along the Elorn Estuary (March 17, 1983). □ Surface at low tide, surface at high tide (△); bottom at high tide (▲).*

#### Rôle de la station d'épuration et dilution de la pollution fécale

La contamination de l'estuaire peut être appréhendée par l'étude des numérations des bactéries fermentant le lactose, incubées à  $42^{\circ}\text{C}$ , sur milieu de Drigalski.

La figure 5 représente un diagramme de dilution des bactéries L+ ( $42^{\circ}\text{C}$ ) en fonction de la salinité. Nous avons tracé les courbes de dilution théorique de l'eau douce dans l'eau de mer : dilution des eaux issues de la rivière (courbe 1) et des eaux issues du point 7 à basse mer (courbe 2); elles correspondent à une dilution des germes dans l'eau de mer qui ne fait intervenir ni mortalité ni apports contaminants.

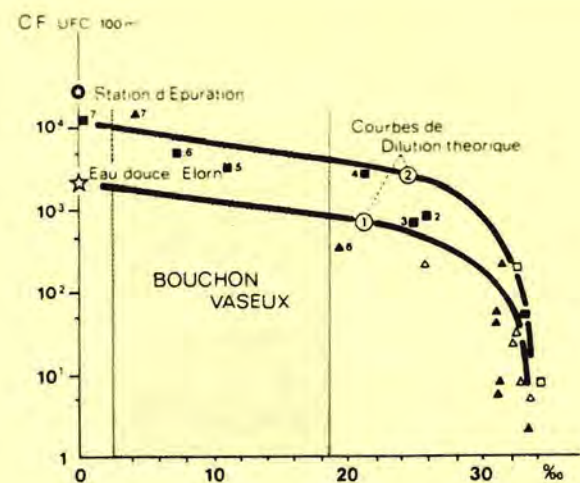


Figure 5  
Comparaison de la dilution théorique des bactéries issues de l'Elorn (courbe 1) et celles issues du point 7 (courbe 2) avec les concentrations bactériennes observées dans l'estuaire à basse mer (surface : ■, fond : □) et à pleine mer (surface : ▲, fond : △).  
*Comparison between theoretical bacterial dilution from Elorn water (curve 1) and from station 7 water (curve 2) and concentrations taken from the estuary at low tide (surface: ■, bottom: □) and during high tide (surface: ▲, bottom: △).*

On constate tout d'abord que la station d'épuration est une source importante de contamination, puisqu'elle élève les concentrations au niveau du point 7 d'un facteur voisin de 10.

D'autre part à basse mer, les numérations suivent, jusqu'au point 4 compris, la droite de dilution théorique (courbe 2). Pour expliquer ce phénomène, deux hypothèses peuvent être avancées : ou bien le temps de transit entre les points 7 et 4 (estimé à 1 ou 2 heures) n'est pas suffisant pour que les phénomènes de mortalité interviennent, ou bien la mortalité est compensée par l'apport de bactéries issues du bouchon vaseux.

A la sortie de la zone de forte turbidité et à leur arrivée dans des eaux plus salées (salinité supérieure à  $25.10^{-3}$ ), les numérations bactériennes chutent. A pleine mer, le flot ramène vers l'amont des eaux faiblement contaminées.

#### Rôle du sédiment et des remises en suspension sur les numérations bactériennes

L'examen des figures 6 et 7 permet de définir le rôle du sédiment et des remises en suspension sur la qualité bactériologique des eaux de l'estuaire.

Sur la figure 6 sont reportées, pour l'ensemble des campagnes, les numérations obtenues dans le sédiment (milieu Drigalski doux). Dans la partie aval de l'estuaire (points 2 et 3), on note des valeurs faibles et constantes. Par contre, plus en amont, au point 5, les numérations sont fortes et la variabilité des résultats importante d'une campagne à l'autre : il y a alternance de fortes numérations, correspondant à des périodes de mortes eaux, où le sédiment se dépose (22 mars-19 avril), et de faibles numérations qui sont en relation avec les périodes de crue de l'Elorn (19 avril) ou de vives eaux (1<sup>er</sup> mars), où le sédiment est érodé dans cette partie de l'estuaire : cette dynamique est caractéristique de la zone du bouchon vaseux, et l'on voit ici les consé-

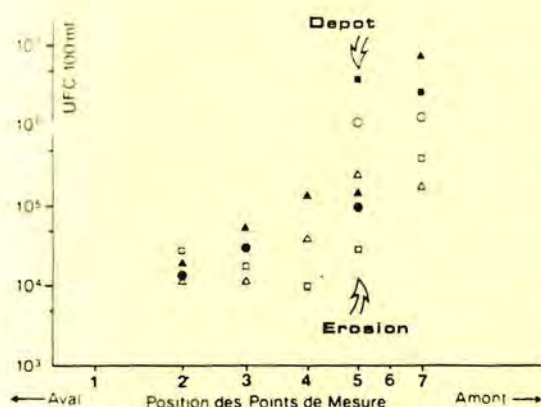


Figure 6

Évolution des concentrations bactériennes dans le sédiment le long de l'estuaire (□ : 1<sup>er</sup> mars, ■ : 22 mars, ○ : 19 avril, ● : 17 mai, △ : 21 juin, ▲ : 6 septembre). Numérations obtenues sur milieu Drigalski doux.

Counts of bacteria in sediments along the Elorn estuary (□ : March 1, ■ : March 22, ○ : April 19, ● : May 17, △ : June 21, ▲ : September 6, 1983). Counts taken from saltfree Drigalski medium.

quences des phénomènes hydrodynamiques sur la contamination et la décontamination du sédiment.

Au point 7, situé en amont du bouchon vaseux, les mécanismes qui gèrent la contamination du sédiment sont différents : d'une part les courants de marée sont plus faibles, donc l'érosion du sédiment plus limitée; d'autre part la proximité de la station d'épuration fait que les numérations obtenues à ce point sont toujours plus élevées que dans le reste de l'estuaire.

Il est intéressant de relier les phénomènes d'érosion du sédiment à la contamination de l'eau, cette dernière devant présenter des numérations plus élevées durant ces périodes que lors des périodes de dépôt. Sur la figure 7 est reporté l'ensemble des résultats obtenus sur l'eau prélevée à basse mer [les numérations concernent comme pour le sédiment (figure 6) le milieu Drigalski doux]. On constate que, dans la partie aval de l'estuaire (points 2, 3, 4), l'eau peut être effectivement plus chargée en période érosive (1<sup>er</sup> mars-17 mai) que pendant la période de dépôt (par exemple le 19 avril).

Dans le cas du 17 mai, c'est dans la zone du bouchon vaseux (2, 3, 4) que l'on trouve les plus fortes valeurs (par rapport à l'aval, point 1, et à l'amont, point 6), le point 7 étant par ailleurs sous l'influence directe de la station d'épuration.

Cependant la relation contamination de l'eau-érosion du sédiment n'est pas systématiquement mise en évidence. En effet, des valeurs élevées peuvent être observées dans l'eau et expliquées par l'activité seule de la station d'épuration : par exemple le 6 septembre. Cette dernière rejetait des eaux nettement plus contaminées que les 1<sup>er</sup> mars et 17 mai (résultats des numérations des L+ sur Drigalski à 42°C exprimées en UFC/100 ml : 6 septembre :  $8 \cdot 10^6$ , 1<sup>er</sup> mars :  $10^6$ , 17 mai :  $1,2 \cdot 10^5$ ).

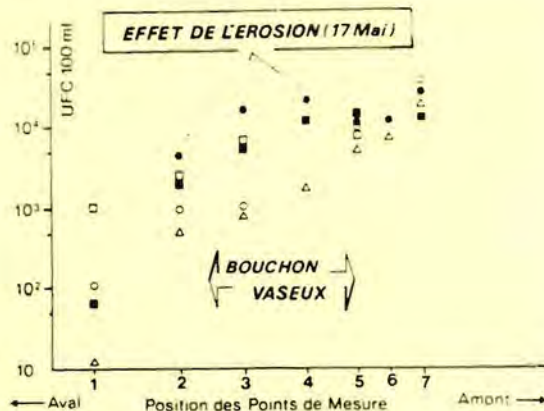


Figure 7

Effet de l'érosion du sédiment sur la qualité de l'eau de l'estuaire à basse mer (□ : 1<sup>er</sup> mars, ■ : 22 mars, ○ : 19 avril, ● : 17 mai, △ : 21 juin, ▲ : 6 septembre). Numérations obtenues sur milieu Drigalski doux.

Sediment erosion and water bacterial counts in Elorn Estuary at low tide (□ : March 1, ■ : March 22, ○ : April 19, ● : May 17, △ : June 21, ▲ : September 6, 1983). Counts taken from saltfree Drigalski medium.

### Mise en évidence des différentes sources contaminantes par la méthode de l'analyse des correspondances

Du fait de la multiplicité des facteurs jouant sur les résultats des numérations, qu'ils soient dus à l'action des sources elles-mêmes ou à la réponse des milieux de culture plus ou moins sélectifs, nous avons utilisé l'analyse des correspondances pour traiter les résultats.

Dans cette étude, l'analyse des correspondances a été appliquée en premier lieu à deux campagnes successives et présentant des conditions hydrodynamiques très différentes : 1<sup>er</sup> mars 1983 (vives eaux : coefficient 110-108) et 22 mars 1983 (mortes eaux : coefficient 49-45). Les 51 observations ont été transformées en  $\text{Log}(x+1)^2$ , afin de stabiliser leur distribution. Les variables utilisées pour ce traitement sont les numérations des bactéries fermentant ou non le lactose (L+ et L- respectivement), obtenues à partir des milieux de culture Drigalski à 42°C (D42), à 37°C (D37), à 25°C (DS) : V1 = (L+ D42); V2 = (L- D42); V3 (L+ D37); V4 (L- D37); V5 (L+ DS); V6 (L- DS).

La figure 8 représente la projection du nuage des observations et des variables dans le plan défini par les deux premiers axes de l'analyse des correspondances et extrayant respectivement 64 et 14% de la variance totale du phénomène. La contribution des variables aux axes est la suivante : pour l'axe I : V6 = 54%, V4 = 30%; axe II : V4 = 46%, V1 = 28%, V6 = 17%; l'axe III (non représenté ici) extrait seulement 9% de la variance totale, et la contribution de V5 à cet axe est importante : 78%. A titre d'illustration, nous avons reporté les résultats obtenus à des points caractéristiques de l'estuaire (valeurs discrètes, transformées ici en  $\text{Log}(x+1)$  pour des facilités de lecture). On observe une réponse très variable des différents milieux de culture avec la prédominance en amont des numérations

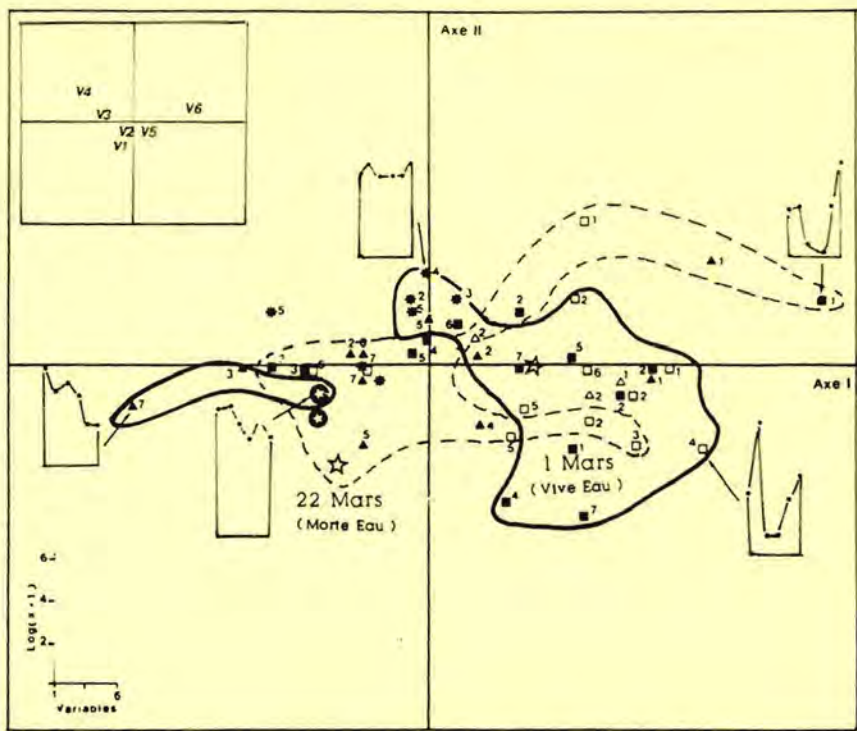


Figure 8

Projections simultanées du nuage des 51 observations et des 6 variables sur les deux premiers axes de l'analyse des correspondances (variance extraite : 78,7%). Les traits pleins entourent la situation du 1<sup>er</sup> mars 1983 (vives eaux), les tiretés le 22 mars 1983 (mortes eaux).

Observations : ■ : PM surface, □ : PM fond, ▲ : BM surface, △ : BM fond, \* : sédiment, ⊗ : station d'épuration, ★ : Élorn.

Variables : numérations de bactéries fermentant le lactose (L+) ou non (L-) sur milieux Drigalski incubé à 42°C (D42), à 37°C (D37) et sur Drigalski salé à 25°C (DS).

V1 : L+ D42; V2 : L- D42; V3 : L+ D37; V4 : L- D37; V5 : L+ DS; V6 : L- DS.

Position of the 6 variables and the 51 observations on the first two axes from correspondance analysis (extracted variance: 78.7%). Solid lines enclose spring tide observations (1 March 1983) dotted lines enclose neap tide observations.

Observations : □ : surface at high tide, ■ : bottom, ▲ : surface at low tide, △ : bottom, \* : sediment, ⊗ : STP, ★ : Elorn.

Variables : counts of bacteria fermenting the lactose (L+) or not (L-) on Drigalski medium incubated at 42°C (D42), at 37°C (D37) and Drigalski salt medium incubated at 25°C (DS).

V1 : L+ D42; V2 : L- D42; V3 : L+ D37; V4 : L- D37; V5 : L+ DS; V6 : L- DS.

sur D42 (V1 et V2 : représentatifs de la flore contaminante) et la prépondérance en aval des numérations des milieux salés (V5, V6) sur les milieux doux (V3, V4).

La structure obtenue suggère l'interprétation suivante : en vives eaux la flore est relativement homogène; l'ensemble des observations se trouve à droite et proche de V6 (prédominance des bactéries poussant sur milieu salé en opposition avec V4 caractéristique des bactéries issues d'eau douce (Élorn ou station d'épuration)).

Les points sédiments sont proches des points eaux et notamment du point 5 à basse mer (zone du bouchon vaseux), ce qui reflète la similitude des flores du sédiment et de l'eau dans les zones de remises en suspension, c'est-à-dire la possibilité, en vives eaux, d'une contamination de l'eau par le sédiment.

Le 1<sup>er</sup> mars, trois points, à gauche du plan, s'isolent par rapport aux autres; il s'agit de la station d'épuration et de deux prélèvements effectués en amont de l'estuaire à basse mer. On peut conclure qu'en vives eaux, l'effet de la station d'épuration sur la qualité de l'eau de l'estuaire est limité.

En mortes eaux, l'ensemble des points de l'estuaire est déporté vers la gauche de la figure, c'est-à-dire près du prélèvement « Élorn » et de la station d'épuration (on remarque la stabilité de la flore de la station d'épuration d'une campagne à l'autre). Seul le point 1, situé en aval, et les points prélevés au fond à pleine mer (2, 3, 5) présentent une flore plus « marine » et voisine de celle observée le 1<sup>er</sup> mars. Ceci est en accord avec la connaissance que l'on a du fonctionnement d'un estuaire, où l'eau marine pénètre à pleine mer par le fond.

La majorité de l'eau de l'estuaire et le sédiment présentent une flore voisine de celle de la station d'épuration et de l'eau douce; on remarque que V1 et V2, qui caractérisent la flore contaminante, se situent également dans cette zone.

Le déplacement de la flore « eau douce » d'une campagne à l'autre est difficile à expliquer. Une hypothèse serait que ce point serait malgré tout influencé par l'intrusion saline lors des marées de vives eaux.

En conclusion, les résultats de cette analyse confirment que pendant les mortes eaux, la station d'épuration et l'Élorn marquent profondément la qualité des eaux et du sédiment dans la partie amont de l'estuaire, tandis qu'en vives eaux leur influence est plus limitée, l'estuaire évolue vers une flore plus marine et le sédiment peut jouer un rôle dans la contamination des eaux de l'estuaire.

Le même traitement a été réalisé à partir des trois campagnes effectuées à différentes périodes de l'année afin de mettre en évidence une éventuelle évolution saisonnière dans l'estuaire.

La figure 9 représente la projection du nuage des observations (73 points eaux et 18 sédiments) et des 6 variables précédemment décrites, sur les deux premiers axes de l'analyse des correspondances (variance extraite par l'axe I : 60,2%, par l'axe II : 28,8%). Les points sédiments sont figurés par des étoiles. L'ensemble des points de mars est entouré par une ligne tiretée, en juin un trait plein délimite les observations et une zone ombrée est utilisée pour le mois de septembre.

On note la remarquable stabilité de la configuration des variables dans les deux analyses. Comme sur la

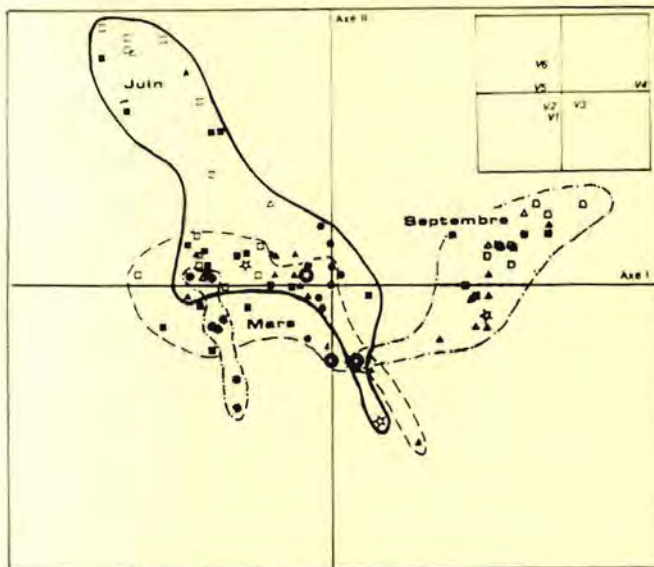


Figure 9

Projection simultanée du nuage des 91 observations et des 6 variables sur les deux premiers axes de l'analyse des correspondances (variance extraite : 83%). Les traits tiretés entourent la situation du 1<sup>er</sup> mars, les traits pleins celle du 21 juin, la zone grisée correspond au 6 septembre 1983.

Observations : ■ : PM surface, □ : PM fond, ▲ : BM surface, △ : BM fond, \* : sédiment, ⊗ : station d'épuration, ★ : Élorn.

Variables : numérations de bactéries fermentant le lactose (L+) ou non (L-) sur milieux Drigalski incubé à 42°C (D42), à 37°C (D37) et sur Drigalski salé à 25°C (DS).

V1 : L+ D42; V2 : L- D42; V3 : L+ D37; V4 : L- D37; V5 : L+ DS; V6 : L- DS.

Position of the 91 observations and the 6 variables on the first two axes from correspondence analysis (extracted variance: 83%). Dotted line enclose March observations, solid line enclose June observations and shaded area covers September observations.

Observations: ■: surface at high tide, □: bottom, ▲: surface at low tide, △: bottom, \*: sediment, ⊗: STP, ★: Elorn.

Variables: counts of bacteria fermenting the lactose (L+) or not (L-) on Drigalski: medium incubated at 42°C (D42), at 37°C (D37) and Drigalski salt medium incubated at 25°C (DS).

V1: L+ D42; V2: L- D42; V3: L+ D37; V4: L- D37; V5: L+ DS; V6: L- DS.

figure précédente, on remarque l'opposition des variables V6 et V4 (la contribution de V4 à l'axe I est de 71%, tandis que V6 contribue pour 11% à l'axe I et 49% à l'axe II). V1 et V2 se retrouvent à proximité des eaux de la station d'épuration, dont la flore fluctue assez peu d'une campagne à l'autre (contrairement à celle de l'Élorn). On observe un déplacement du nuage des points au cours de l'année, les points « sédiments » restent généralement groupés près des points « eaux » à l'exception du mois de septembre où l'on observe une très grande différenciation des deux types de flore. Afin d'expliquer ces variations saisonnières, le même traitement a été réalisé sans le sédiment et en incluant comme variables témoins, des paramètres physico-chimiques mesurés dans l'eau : la température, la salinité et la turbidité.

En première analyse, on constate que le nuage obtenu est très semblable, que l'on fasse intervenir ou non le sédiment (fig. 10 : projection sur le plan I,II, 61 et 28% de la variance extraite). Ceci est vraisemblablement dû au fait que la structure créée par les variations saisonnières est très forte et que le rôle du sédiment est alors secondaire. On trouve V6 à côté de la salinité, ce qui confirme notre première interprétation : cette

variable — et plus faiblement V5 — traduit bien la flore marine, par opposition à V3 et V4 plus caractéristiques de la flore d'eau douce. La contribution des variables à l'axe I est la suivante : V4 : 47% ; V6 : 25% ; V3 : 15% et à l'axe II : V6 : 43% ; V1 : 26% ; V2 : 22%.

Les variables V1 et V2 spécifiques de la flore contaminante, sont proches de la variable turbidité et des points de la station d'épuration ainsi que de quelques points du mois de mars (prélèvements de basse mer). Par contre, aucun des paramètres physico-chimiques mesurés n'est proche des points septembre; ces derniers étant proches de V4 (et opposés à la salinité) suggèrent l'influence de l'eau douce sur les numérations obtenues. Ceci est confirmé par la place du point « Élorn » dans le nuage des points du mois de septembre. Le débit mesuré dans la rivière lors de la campagne est néanmoins très faible (3,5 m<sup>3</sup>/s), et seuls des débits élevés les jours précédents pourraient expliquer ce phénomène. La température peut également avoir influencé les numérations trouvées en septembre, cependant la mesure des extrema journaliers rendrait certainement mieux compte des changements de flore, notamment au niveau du sédiment.

## CONCLUSION

L'étude de la flore bactérienne de l'estuaire de l'Élorn montre que la qualité des eaux est soumise à trois sources : deux sont permanentes et directes mais de niveau contaminant variable (la rivière et surtout la station d'épuration), la troisième est discontinue et indirecte (le sédiment).

En période de faible turbulence ou de dépôt (morte eau ou marée moyenne ou lorsque le débit de la rivière est faible) il n'y a pas de remise en suspension du

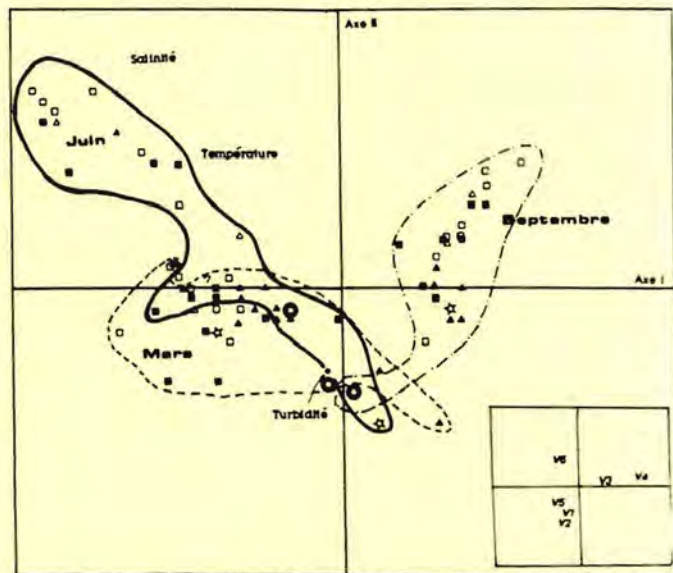


Figure 10

Même analyse que celle réalisée figure 9, en excluant le sédiment et en portant les paramètres physico-chimiques (salinité, turbidité, température) en points témoins (variance extraite 88%; légende: idem fig. 9).

Same analysis as Fig. 9 without sediment observations. The physical and chemical parameters (salinity, turbidity, temperature) are plotted as test points (key: see Fig. 9).

sédiment ; les deux sources principales qui contaminent l'estuaire sont la station d'épuration et la rivière elle-même. Il y a alors vraisemblablement une période favorable au dépôt des particules contaminées issues de ces deux sources sur les sédiments du fond dans la partie amont de l'estuaire : dans cet écosystème, cette flore exogène subira un remaniement dû à la compétition avec les espèces endogènes bien adaptées au milieu ; comme l'ont constaté Dale (1974) et Rublee (1982), la présence de la matière organique dans cette zone proche des rejets de la station d'épuration doit jouer un rôle important, surtout si, comme le montrent les observations en microscopie à balayage (Cormier *et al.*, 1984), la plupart du temps les bactéries issues de ces rejets sont agglomérées dans de la matière organique, qui les protège et leur offre les éléments nutritifs nécessaires à leur survie.

Les numérations trouvées dans l'eau pendant ces périodes de dépôt peuvent être 10 à 100 fois inférieures à celles trouvées dans le sédiment, ce qui est en accord avec les résultats de Labelle *et al.* (1980) et Erkenbrecher (1981). La flore bactérienne diminue de l'amont vers l'aval et se modifie, avec un remplacement progressif des flores contaminantes par les bactéries marines, en relation avec l'augmentation de la salinité. Il semble que, dans la partie amont de l'estuaire, les phénomènes de mortalité bactérienne soient faibles ou compensés par les bactéries issues du bouchon vaseux. On note une dilution remarquablement conservatrice des coliformes au cours de leur transport. Ces phénomènes ont déjà été remarqués par Palumbo et Ferguson (1978) sur le Newport River Estuary en Caroline du Nord. De plus, le caractère d'halotolérance très marqué des souches mis en évidence dans cette étude a déjà été souligné par Prieur *et al.* (1984) dans l'estuaire de la Gironde.

En période de forte turbulence ou d'érosion (vives eaux ou crue de l'Élorn), il vient s'ajouter au fonctionnement

précédent une troisième source de contamination par le sédiment qui est remis en suspension. Cette source est loin d'être négligeable, et peut même être très importante en ce qui concerne la flore contaminante exogène, les entérobactéries. On observe alors une érosion du fond, provoquant d'une part une diminution des concentrations bactériennes dans les sédiments superficiels, et d'autre part la modification de la flore bactérienne de l'eau, qui s'apparente alors à celle du sédiment.

Enfin, au cours de l'année, on constate une évolution saisonnière de la flore de l'estuaire qui pourrait être expliquée, en partie, par les variations de salinité ou de température dans l'estuaire.

Ottmann et Quere (1979) et Frenel (1978) avaient déjà mis en évidence l'effet de l'expulsion du bouchon vaseux sur la contamination de l'estuaire externe ; l'intérêt de notre travail a été de montrer qu'il y avait, outre une variation saisonnière, une alternance des phases de dépôt et d'érosion : les sédiments contaminés remis en suspension surimprimant leur effet à ceux provoqués par le rejet continu d'eaux polluées issues de la station d'épuration de Landerneau (et à un moindre degré par l'Élorn). La prise en compte de paramètres bactériens multiples tels que les numérations sur différents milieux de cultures, peut aider à mieux cerner la variété des flores caractéristiques des différentes sources et à évaluer ainsi leur impact respectif sur la qualité d'une zone littorale.

#### Remerciements

Nous remercions P. Gros (IFREMER) pour ses précieux conseils concernant les analyses statistiques de cette étude.

#### RÉFÉRENCES

- Allen G. P., 1972. Étude des processus sédimentaires dans l'estuaire de la Gironde, *Thèse Doct. État, Univ. Bordeaux I*, 314 p.
- Arrondeau J. P., Frenel P., Ledouarec P., 1977. Méthodologie d'étude pour des eaux polluées, application à l'estuaire externe de la Loire, *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, **47**, 141-146.
- Avoine J., 1981. L'estuaire de la Seine : sédiments et dynamique, *Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Univ. Caen*, 236 p.
- Bassoullet P., 1979. Étude de la dynamique des sédiments en suspension dans l'estuaire de l'Aulne (rade de Brest), *Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Univ. Bretagne Occidentale*, 136 p.
- Bunetel L., Cormier M., 1984. Détermination du profil des flores bactériennes des zones littorales, application à l'évaluation de l'impact des rejets, 2<sup>e</sup> colloque international de bactériologie marine, Brest 1-5 octobre 1984.
- Churchland M., Kan G., Ages A., 1982. Variations in fecal pollution indicators through tidal cycles in the Fraser River Estuary, *Can. J. Microbiol.*, **28**, 239-247.
- Colwell R. R., Sleider R. J., Kaper J., 1981. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype 01 in Maryland and Louisiana estuaries, *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 555-558.
- Cormier M., Bassoullet P., Pommepuy M., 1984. Étude au microscope électronique à balayage des relations entre bactéries et matières en suspension en milieu marin, 2<sup>e</sup> colloque international de bactériologie marine, Brest 1-5 octobre 1984.
- Dale N. G., 1974. Bacteria in intertidal sediments: factors related to their distribution, *Limnol. Oceanogr.*, **10**, 509-518.
- Erkenbrecher C. W., 1981. Sediment bacterial indicators in an urban shell-fishing subestuary of the lower Chesapeake Bay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 484-492.
- Ferguson R. L., Palumbo A. V., Rublee P. A., 1977. Source and significance of suspended bacteria in the coastal zone, Annual Report to the Energy Res. and Dev. Adm. Beaufort Laboratory, 165-183.
- Frenel P., 1978. Relations entre l'hydrologie et les bactéries témoins de la contamination fécale dans l'estuaire externe de la Loire, *Thèse 3<sup>e</sup> cycle, Univ. Nantes*, 75 p.
- Gerba C. P., McLeods J. S., 1976. Effects of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 114-120.
- Goulder R., 1976. Relationships between suspended solids and standing crops and activities of bacteria in an estuary during a neap-spring-neap tidal cycle, *Oecologia*, **24**, 83-90.



- Goulter R., 1977. Attached and free bacteria in an estuary with abundant suspended solids, *Appl. Bacteriol.*, **43**, 399-405.
- Goulter R., Blanchard A.S., Sanderson P.L., Wright B., 1980. Relationships between heterotrophic bacteria and pollution in an industrialized estuary. *Wat. Res.*, **14**, 591-610.
- Irving T.E., 1977. Preliminary investigation on the effects of particulate matter on the fate of sewage bacteria in the sea water, Res. Cent. Tech. Rep. TR55, 22 p.
- Kaper J., Lowkman H., Colwell R.R., Joseph S.W., 1979. Ecology, serology and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 91-103.
- Kaper J.B., Remmers E.F., Lockman H., Colwell R.R., 1981. Distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay during the summer season, *Estuaries*, **4**, 321-327.
- Labelle R.L., Gerba C.P., Goyal S.M., 1980. Relationships between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments, *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 588-596.
- Le Bart L., Morineau A., Tabard N., 1977. *Techniques de la description statistique. Méthodes et logiciels pour l'analyse de grands tableaux*, Dunod Éd., Paris, 351 p.
- L'Yavanc J., Bassoullet P., Pommepuy M., 1985. Hydrodynamique d'un estuaire à fort marnage : l'Élorn (rade de Brest), rapp. int. IFREMER.
- Moltes M.L., Zywno J.R., Depaola A., Becker R.E., Presnell M.W., 1983. Isolation of *Vibrio cholerae* ogawa from a Florida estuary, *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 321-322.
- Ottmann F., Quere J., 1979. Étude de la concentration bactérienne par le bouchon vaseux dans l'estuaire de la Loire. Contrat CNEXO 77.1741 + D.D.E. 44, 53 p.
- Palumbo A.V., Ferguson R.L., 1978. Distribution of suspended bacteria in the Newport River Estuary, North Carolina, *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, **7**, 521-529.
- Prieur D., Trousselier M., Romana A., Chamroux S., Mevel G., Baleux B., 1984. Évolution des peuplements bactériens selon un gradient de salinité en zone estuarienne, *Oceanis*, **10**, 329-345.
- Quemeneur M., 1984. Cycle de la matière organique dans l'estuaire de l'Élorn et relations avec les bactéries, *Mém. DEA, Univ. Bretagne Occidentale*, 39 p.
- Read P.A., Anderson K.J., Matthews J.E., Watson P.G., Halliday M.C., Shiells G.M., 1982. Water quality in the First of Forth, *Mar. Pollut. Bull.*, **13**, 421-425.
- Rublee P.A., 1982. Bacteria and microbial distribution in estuarine sediments, in: *Estuarine comparisons*, edited by V.S. Kennedy, Academic Press.
- Salomon J.C., Allen G.P., 1983. Rôle sédimentologique de la marée dans les estuaires à fort marnage, CFP, Notes et mémoires n° 18, 35-44.

## **CHAPITRE 1**

# **LES APPORTS BACTERIENS A LA COTE**

## INTRODUCTION

La connaissance des apports bactériens à la côte, tant sur le plan qualitatif que quantitatif est importante pour déterminer l'impact des activités humaines sur la qualité de l'eau.

Généralement les démarches adoptées tentent :

- **d'apprécier la qualité du rejet en terme de concentration** en bactéries dites "indicatrices de pollution fécale" : coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux et si possible, la présence de pathogènes vrais, ou de bactéries potentiellement pathogènes : *Salmonella*, *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, éventuellement *Listeria*, *Campylobacter...* ,

- **de quantifier ces apports en évaluant les flux journaliers**, voir saisonniers déversés à la côte. Ces flux pour être précis doivent s'appuyer sur un ensemble de données concernant les débits (variation saisonnière, pluriannuelle...), les concentrations (variation journalière et saisonnière). Ces valeurs ne sont pas toujours disponibles. Pour pallier à ce manque de données, des approches bibliographiques, et en particulier des études basées, sur le recensement de la population (animale et humaine) vivant sur les bassins versants, peuvent être utilisées et permettent de calculer des flux potentiels.

Dans cette partie nous présenterons des résultats acquis au cours de ces dernières années sur différents secteurs, Ouest Cotentin, Morlaix, rades de Brest et Toulon, et sur un site antillais : la baie de Fort de France. Nos recherches ont concerné essentiellement les coliformes thermotolérants, les streptocoques fécaux et sur trois sites, les salmonelles.

## I - MATERIEL ET METHODES

### 1. Coliformes thermotolérants

La recherche des coliformes thermotolérants autrefois appelés coliformes fécaux (CF), a été réalisée selon les normes AFNOR 90413 (milieu liquide) ou AFNOR 90414 (filtration sur membrane) par les différents laboratoires agréés du littoral (sauf sur le site de Toulon) ; ces laboratoires sont chargés par les DDASS (Direction Départementale de l'Action Sanitaire et Sociale) ou les DDE (Direction Départementale de l'Equipement) des analyses officielles concernant la qualité bactériologique des eaux ; leurs résultats servent au plan national à valider la potabilité de l'eau et à classer les eaux de baignade. Concernant les coliformes thermotolérants, les deux normes peuvent être interprétées différemment selon les laboratoires, ce qui doit rendre prudent dans l'interprétation des résultats et surtout dans les comparaisons d'un site à un autre. Nous rappellerons ci-dessous, par site, les techniques employées. Les travaux reportés dans cette partie ont été réalisés sur un laps de temps assez important (1980-1994) d'où la diversité des techniques employées. Actuellement ces techniques tendent vers une homogénéisation nationale.

Les méthodes par laboratoire sont présentées ci-dessous :

***Laboratoire Départemental d'analyse, Saint-Lô, Manche***

Sur le site de l'Ouest Cotentin les recherches de coliformes thermotolérants ont été réalisées par culture en milieu liquide et dénombrement direct selon le procédé NPP (Nombre le Plus Probable) en Bouillon MacConkey (Merk - France) incubation à 30 °C durant 48 h puis confirmation en milieu de Schubert à 44 °C durant 24 h (norme AFNOR 90413).

***Laboratoire Municipal de la Ville de Brest, Finistère***

Lors de l'étude sur la rade de Brest et sur l'estuaire de Morlaix, les coliformes thermotolérants ont été recherchés par filtration sur membrane (50 ml, 10 ml et 1 ml). Le filtre est rincé avec de l'eau distillée stérile. La membrane est ensuite déposée sur une gélose lactosée au TTC Tergitol 7 (Institut Pasteur) et incubée de 16 à 24 heures à 44 °C (norme AFNOR 90414). Lors du dénombrement seules les colonies jaunes à centre orangé sont prises en compte. Le contrôle des colonies sur galerie API 20E a montré la prédominance des *Escherichia. coli*. Quelques *Enterobacter* et *Klebsiella* ont également été trouvées.

***Institut Océanographique Ricard, Laboratoire d'Hydrologie, USTL (Montpellier)***

Sur le site de Toulon les coliformes thermotolérants sont recherchés par filtration sur membrane, dénombrement sur gélose au TTC Tergitol (Tergitol 7 agar SBL). L'incubation s'est faite 24 h à 44,5 °C. Des contrôles ont montré que 80 % des souches isolées appartenaient au groupe des coliformes thermotolérants avec prédominance d'*E. coli* (soit 75 % des souches) (rapport IFREMER, 1987).

***Laboratoire Départemental d'Hygiène de la Martinique, Fort de France.***

La recherche et le dénombrement des coliformes thermotolérants se sont faits par une technique en microplaque (Diagnostic Pasteur), le milieu liquide est additionné de 4-méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide ; l'incubation est réalisée pendant 48 h à 44,5 °C (Hernandez *et al.*, 1991).

**2. Streptocoques fécaux**

***Laboratoire Départemental d'analyse, Saint-Lô, Manche***

Comme pour les coliformes thermotolérants, la technique NPP a été utilisée pour le dénombrement des streptocoques du groupe D : test présomptif en milieu de Rothe avec une incubation de 48 h à 37 °C puis confirmation en milieu de Litsky à 37 °C durant 24 h (norme AFNOR 90411).

### *Laboratoire Municipal de la ville de Brest, Finistère*

La méthode employée est la filtration sur membrane : filtration de 50 ml et 1 ml d'eau de mer. Après rinçage à l'eau distillée stérile et dépôt de la membrane sur milieu de Slanetz, les boîtes sont incubées 48 h à 37 °C. Les streptocoques fécaux se multiplient sous forme de colonies rouges ou marrons.

### *Inst. Océanographique Ricard, Laboratoire d'Hydrologie USTL (Montpellier)*

Les streptocoques fécaux sont recherchés sur le site de Toulon par incorporation en gélose D-Coccosel (Biomérieux) incubée 24 h à 37 °C.

### *Laboratoire Départemental d'Hygiène de la Martinique, Fort de France*

Les streptocoques fécaux (streptocoques du groupe D) ont été recherchés par la méthode en microplaque (Diagnostic Pasteur). Le milieu liquide est additionné de 4-méthylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucoside. L'incubation est réalisée 48 h à 37 °C (Hernandez *et al.*, 1993).

## **3. Salmonelles**

Sur trois sites la recherche de salmonelles a été réalisée par deux techniques différentes.

Sur le site du Cotentin : la recherche a été effectuée par enrichissement direct dans 4 000, 400 et 4 ml d'eau en présence du milieu de Rappaport modifié (Merk-France) incubé 24 h à 37 °C, puis isolement sur gélose XLD et hektoën 24 h à 37 °C. L'identification biochimique a été effectuée sur galerie rapide d'identification API 20E et sérotypage.

Sur les sites de Morlaix et Toulon après enrichissement en bouillon sélénite (Biomerieux) additionné de Prill ® et de novobiocine et incubation 24 heures à 43 °C, les isolements ont été effectués sur gélose *Salmonella-Shigella* (Biomerieux) et incubés 24 heures à 37 °C. L'identification a été réalisée à l'aide de galeries API 20 E. Cette technique (Baleux *et al.*, 1988) a été utilisée en semi-quantitatif.

## **4. Autres paramètres**

Certains paramètres physico-chimiques ont été également mesurés selon les méthodes décrites par Aminot et Chaussepied (1983).

La **salinité** a été mesurée en laboratoire avec un salinomètre Beckman RS9.

La **turbidité** a été mesurée avec un turbidimètre HACH Model 2100A.

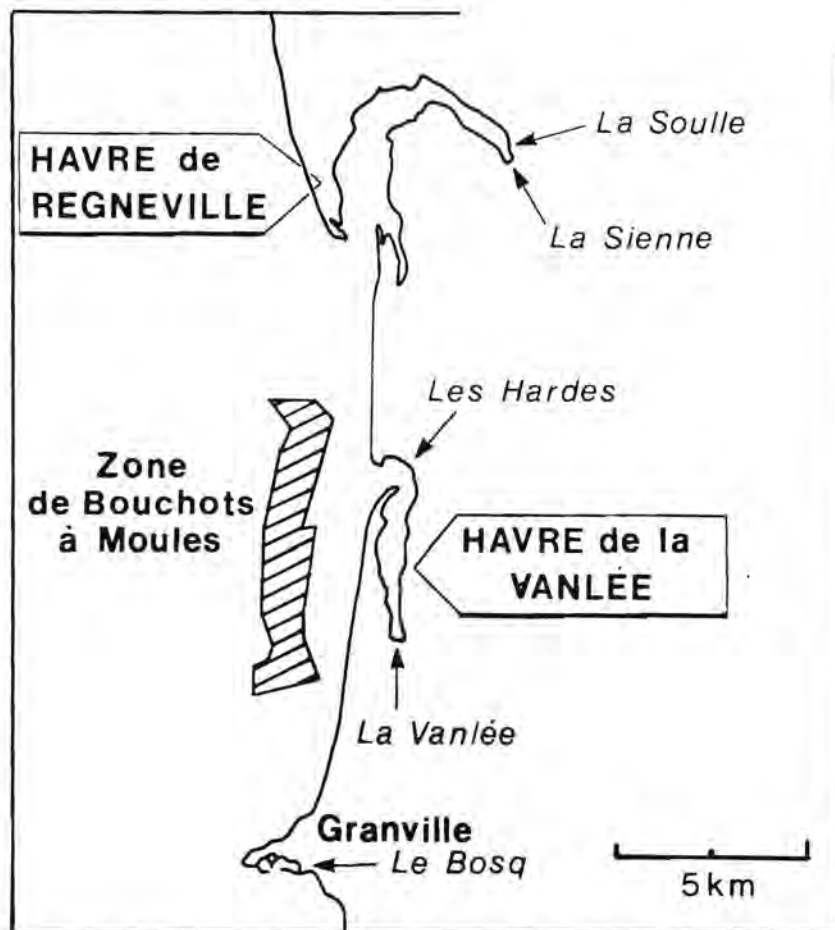


Figure 1 : Carte générale de la zone d'étude

## II - OUEST COTENTIN

### 1. Généralités

Cette partie de la côte ouest du Cotentin est alimentée par cinq fleuves ou ruisseaux (fig. 1) : La Sienne et la Soulle qui se jettent dans le havre de Regnéville, Les Hardes et la Vanlée dans le havre de la Vanlée, et enfin le Boscq qui reçoit les rejets sommairement épurés (traitement physico-chimique) de Granville ; les caractéristiques des bassins versants sont reportés sur le tableau 1.

Bassin versant	Source	Superficie (km <sup>2</sup> )	débit moyen spécifique l s <sup>-1</sup> km <sup>-2</sup>	Débits (m <sup>3</sup> /s)
Boscq-Vanlée	Inventaire 81 *	87	36,8	3,2
"	Inventaire 82 *	"	6,9	0,6
Sienne	Inventaire 81	568	19,8	11,3
"	Obaton 84	"	15,3	8,7
Soulle	Inventaire 81	187	59,0	11,0
"	Obaton 84	"	17,2	3,2
"	SRAE BN 84 *	"	16,0	3,0
Sienne + Soulle	Inventaire 81	755	ND	ND

Tableau 1 : Caractéristiques des bassins versants [\* Alméras (1985)]

Sur ces bassins, la population est très dispersée, avec un assainissement collectif peu développé, l'assainissement individuel présentant en milieu rural la meilleure formule d'épuration. Les deux villes principales, Coutances et Granville sont équipées de station d'épuration.

Pour certains bassins, l'activité agricole a été calculée et reportée sur le tableau suivant.

Bassin versant	Superficie km <sup>2</sup>	Nombre de communes	Cheptel (pour 100 ha SAU)			Culture (% SAU)		
			Bovins	Porcins	Volailles	Céréale	Fourrage	STH
Soulle + Sienne (amont)	433	45	183	19	306	1	9	83
Soulle + Sienne (aval)	322	33	175	17	99	2	13	84
Soulle + Sienne	755	78	-	-	-	-	-	-
Boscq-Vanlée	87	11	144	11	199	2	12	79

SAU : Surface Agricole Utile.

STH : Surface Toujours en Herbe.

Tableau 2 : Activité agricole (1982)

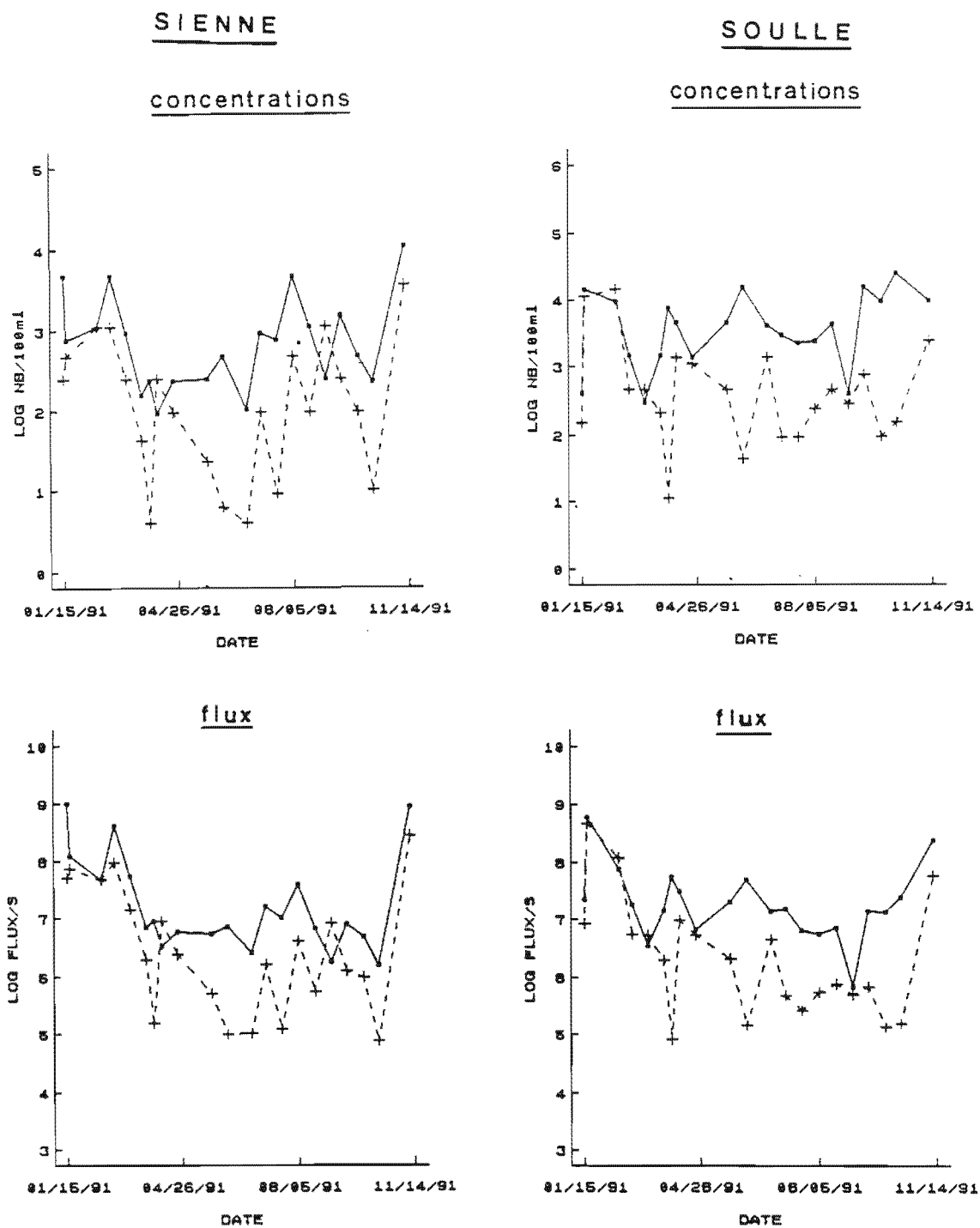


Figure 2 : Concentrations et flux des germes-test de contamination fécale dans la Sienne et la Soulle (1991) :

- coliformes thermotolérants —■—, Streptocoques fécaux ----+----,  
(date : mois/jour/an)



Dans cette étude, l'appréciation des concentrations en coliformes thermotolérants (CF) ou streptocoques fécaux (SF) a été complétée par une recherche semi-quantitative de salmonelles ; l'étude des flux a été approchée par deux techniques : des mesures sur le terrain (janvier 1990 - décembre 1991) et une étude bibliographique (calcul à partir de recensement des populations humaine et animales).

### **Concentrations et flux en coliformes bactériens : flux mesurés**

Les concentrations ont été mesurées sur des prélèvements bimensuels sur la Sienne, la Soulle et le Boscq en 1990-1991 et sur les Hardes et la Vanlée en. Les prélèvements ont été effectués à basse mer, les salinités étant alors inférieures à 2 ‰. Les variations de concentration observées ne sont donc pas imputables à une dilution des eaux douces dans les eaux de mer. Les débits ont été mesurés ou calculés par le SRAE (Service Régional d'Aménagement des Eaux) ; les concentrations sont exprimées en UFC/100 ml, les flux en CF/s ; les résultats sont reportés sur les figures 2, 3, 4, et les tableaux 3, 4. Pour le Boscq les années 1990 et 1991 sont présentées ; pour les autres rivières seule l'année 1991 est reportée.

**La Sienne** (fig. 2) : sur les deux années de l'étude, le débit de la Sienne est resté remarquablement faible ( $< 5 \text{ m}^3/\text{s}$ ) pour tous les prélèvements sauf 4 prélèvements début 1990 et en janvier 1991 (résultats non reportés). Cette remarque sera générale pour toutes les rivières : le cycle de prélèvements s'est déroulé sur une période particulièrement déficitaire en précipitations (données SRAE). Les teneurs en coliformes thermotolérants se situent entre 10 UFC/100 ml et  $10^3$  UFC/100 ml avec quelques valeurs plus élevées en fin 1990 ( $10^3$  UFC/100 ml à  $10^4$  UFC/100 ml) en liaison avec une faible remontée du débit. La moyenne annuelle pour 1990 est de  $3 \cdot 10^3$  UFC/100 ml. En 1991, les valeurs sont légèrement plus stables (avec une moyenne annuelle identique). Les concentrations en streptocoques fécaux sont légèrement plus faibles que celles en coliformes thermotolérants (1 Logarithme d'écart en moyenne) et fluctuent de manière très similaire aux coliformes thermotolérants.

Le flux moyen en coliformes thermotolérants est de  $2 \cdot 10^8$  CF/s en 1990 et  $1,2 \cdot 10^8$  CF/s en 1991 ; des pics sont observés à  $10^9$  CF/s et correspondent, la plupart du temps, à des augmentations du débit ; le maximum observé est de  $3 \cdot 10^9$  CF/s, le 27 novembre 1990, lors d'une remontée du débit après une période assez longue d'étiage de la rivière.

**La Soulle** (fig. 2) : le débit moyen de la Soulle lors de nos mesures est en 1990 de  $1,29 \text{ m}^3/\text{s}$  et en 1991 de  $0,98 \text{ m}^3/\text{s}$  ; ces débits correspondent à ceux observés les années sèches (1985-1989), soit des valeurs 3 à 4 fois inférieures à celles d'années pluvieuses (1979-1981-1982).

Les concentrations bactériennes sont, comme pour la Sienne, plus stables en 1991 qu'en 1990 : moyennes  $8,4 \cdot 10^3$  UFC/100 ml en 1990 et  $6,4 \cdot 10^3$  UFC /100 ml en 1991, avec des remontées en période de débit élevé (maximum observé :  $10^5$  UFC/100 ml). Ces moyennes sont légèrement plus élevées que celles observées sur la Sienne : cela s'explique par l'apport du rejet de la ville de Coutances qui s'ajoute aux apports du bassin versant agricole.

Le flux moyen en coliformes thermotolérants par seconde est de  $7,6 \cdot 10^7$  CF/s en 1990 et  $5,7 \cdot 10^7$  CF/s en 1991 avec des maxima liés à des augmentations de débit. Ces flux sont légèrement plus bas que ceux observés sur la Sienne bien que les concentrations soient plus fortes. Ceci est dû à la différence de débits des deux rivières.

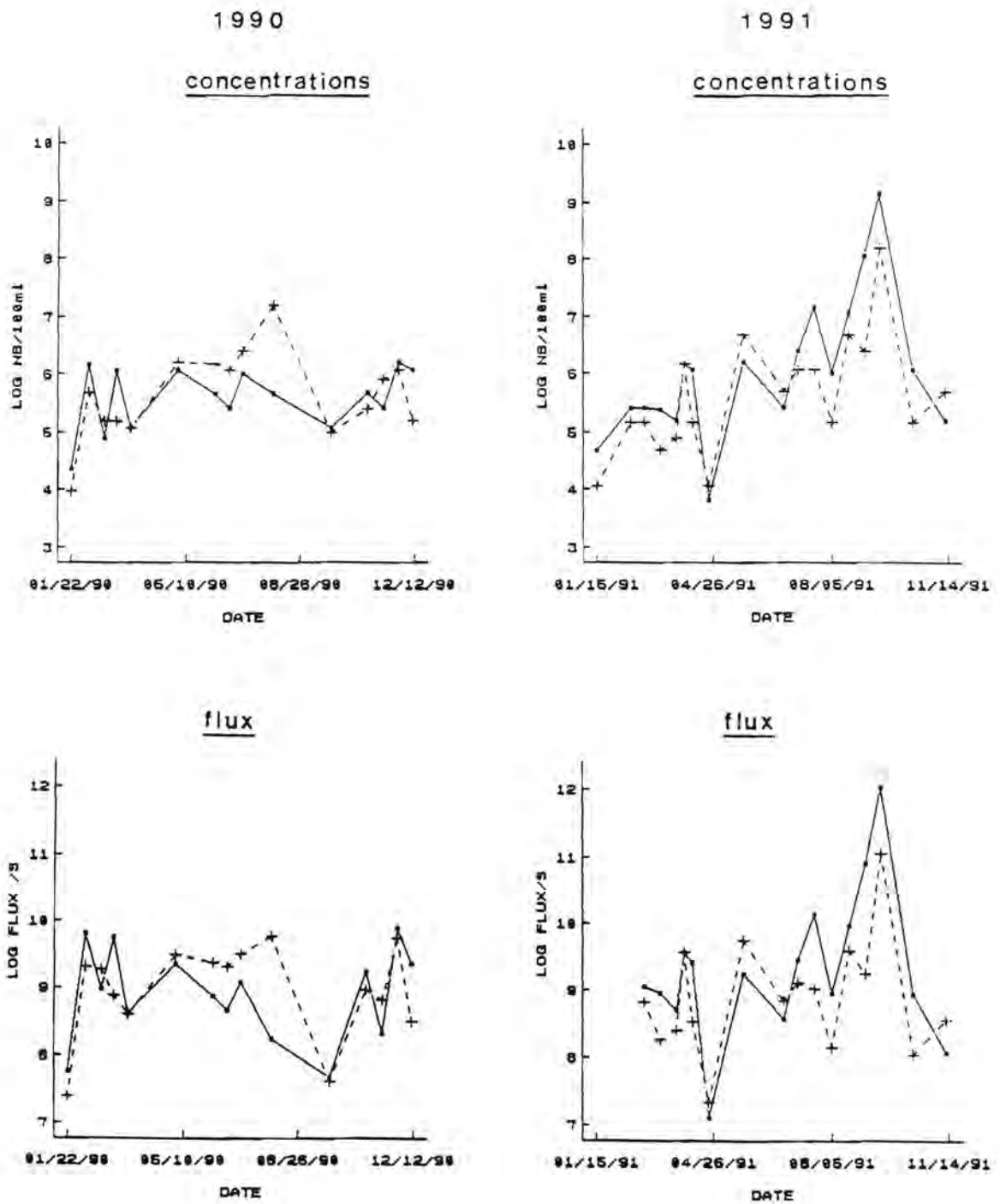
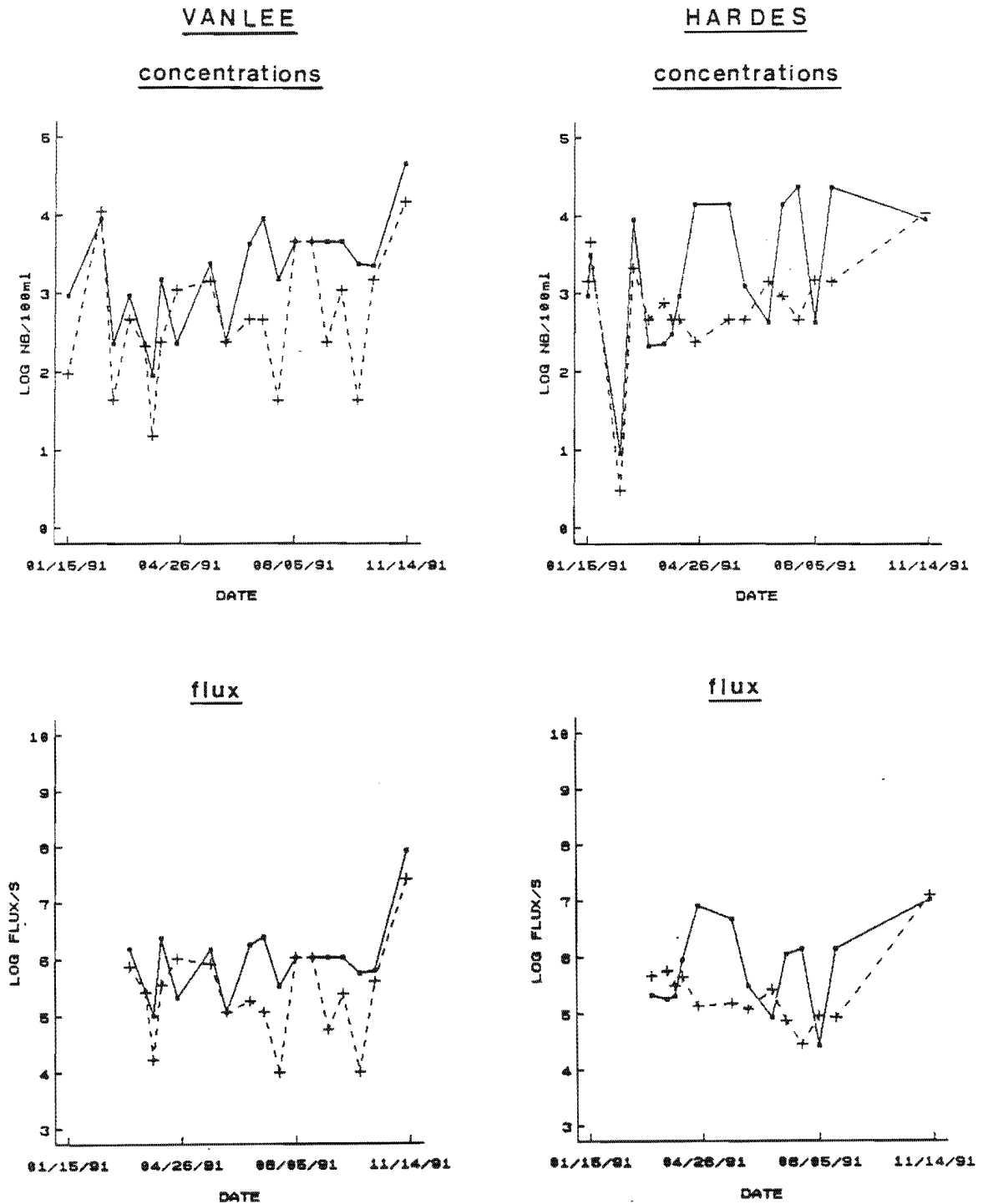


Figure 3 : Concentrations et flux des germes-test de contamination fécale dans le Boscq. - coliformes thermotolérants —■—, Streptocoques fécaux ----+----, (date : mois/jour/an)



**Figure 4 :** Concentrations et flux des germes-test de contamination fécale dans la Vanlée et les Hardes.  
 - coliformes thermotolérants —■—, Streptocoques fécaux ----+----,  
 (date : mois/jour/an)

### Le Boscq (fig. 3)

En raison du rejet des eaux usées de Granville dans le Boscq et malgré des débits très faibles ( $0,31 \text{ m}^3/\text{s}$  en 1990 -  $0,17 \text{ m}^3/\text{s}$  en 1991), ce rejet présente les concentrations en coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux et les flux les plus importants de la côte. Ainsi, en 1990 la moyenne en coliformes thermotolérants est de  $6.10^7$  UFC/100 ml et en 1991 de  $8,5.10^7$  UFC/100 ml, avec des pointes de  $10^8$  UFC/100 ml, voire  $10^9$  UFC/100 ml. Ces valeurs correspondent pratiquement à un rejet d'eaux usées brutes non dilué. Rappelons que les concentrations dans une rivière comme la Sienne (type bassin versant agricole) sont de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  UFC/100 ml avec un maximum de  $4.10^4$  UFC/100 ml lors d'un lessivage.

Le flux bactérien moyen a été, en 1990, de  $1,9.10^9$  CF/s et  $8,35.10^{10}$  CF/s en 1991. La question reste posée sur l'importance de ce flux lors d'un orage qui a pour conséquence d'apporter très rapidement cette eau brute, présente dans les réseaux, à la mer. Malheureusement, les conditions météorologiques de 1990-1991 n'ont pas permis d'étudier ce cas de rejet ; néanmoins on a pu observer un flux maximum de  $10^{12}$  CF/s le 16 septembre 1991, sans augmentation de débit, ce qui donne une idée des dépassements que l'on peut attendre de ce rejet.

### La Vanlée (fig. 4)

Vingt prélèvements ont été réalisés sur la Vanlée en 1991 au niveau du Pont de Fer, généralement aux alentours de la basse mer ; dans ces cas, la salinité était inférieure à 2 ‰ (sauf les 1.4.1991 et 16.9.1991) ; ces mesures permettent donc d'évaluer un flux d'eau douce contaminée. La charge bactérienne est assez constante (moyenne  $5.10^3$  UFC/100 ml), le maximum étant observé lors du dernier prélèvement de décembre 1991 ( $4,6.10^4$  UFC/100 ml) simultanément à une augmentation du débit.

Le flux moyen rejeté par cette rivière est de  $5,6.10^6$  CF/s, le maximum étant atteint le 11 décembre 1991 avec une concentration de  $7,9.10^7$  CF/s.

### Les Hardes (fig. 4)

Comme la Vanlée cette rivière a été échantillonnée en 1991 ; la concentration moyenne en coliformes thermotolérants est de  $6,7.10^3$  UFC/100 ml. Le maximum observé est de  $2,3.10^4$  UFC/100 ml, soit des niveaux de concentrations identiques à ceux mesurés dans la Vanlée et la Sienne.

Le flux moyen en coliformes thermotolérants pour 1991, sur 13 observations, est de  $2.10^6$  CF/s avec un maximum observé égal à  $1.10^7$  CF/s.

## 2. Calcul des flux potentiels

### 2.1. Protocole adopté

Les années 1990-1991 ayant été déficitaires en eau, pour compléter l'information obtenue sur le terrain, une étude bibliographique basée sur les recensements de population a été réalisée. Ce travail à l'avantage de s'appuyer sur des données en principe facilement accessibles ; elle présente cependant de nombreux biais :

- la date des recensements n'est pas toujours aussi récente qu'il le faudrait. Pour la population humaine, seul le recensement de 1982 était disponible. Pour la population animale agricole, nous disposons du recensement 1988 - DRAF ; des informations complémentaires ont été fournies par les rapports : DDASS/IFREMER (1988) et DDASS-IFREMER-ABSN, (1989, 1992), DDASS (1988), IFREMER (1992).

On ne prend pas en compte les phénomènes d'infiltration ou d'auto-épuration dans les ruisseaux.

D'autre part, cette approche globalise l'information : l'essentiel des flux serait, en effet dû aux premiers écoulements liés à de fortes précipitations ou à des crues d'orage. Que ce soit par le calcul ou par la mesure, ces premiers flux sont très difficilement mesurables.

Dans cette étude, le calcul des flux a été fait par commune et globalisé par bassin versant : le Boscq inclut 5 communes, le bassin de la Vanlée 6 communes ; la Sienne et la Soulle 33 communes.

**Protocole d'étude du flux** : le calcul se fait en équivalent/habitant (E.H.) unité de pollution qui correspond, pour l'homme, à un rejet journalier de  $10^{10}$  coliformes thermotolérants par personne (pour 100 litres d'eau), soit un flux de  $1,16 \cdot 10^5$  CF/s.

L'équivalent pour les animaux est présenté ci-dessous (données DDASS) :

1 Bovin ou 1 Equidé	=	15 EH
1 Veau ou 1 Porcin	=	3 EH
1 Ovin ou 1 Caprin	=	1 EH
1 Volaille ou 1 Lapin	=	0,18 EH

## 2.2. Résultats

Les deux années de prélèvements se situent dans une période météorologique particulièrement sèche ; les données de débits fournis par le SRAE le confirment : les débits moyens annuels de la Soulle en 1989-1990-1991 sont inférieurs à ceux mesurés depuis 1979 ; la même observation est valable pour la Sienne dont on possède les débits depuis 1986.

Si l'on compare les débits moyens journaliers mesurés lors de nos prélèvements, au tableau 3, où sont reportés les maxima instantanés et journaliers observés pour les années précédentes, on constate que les débits peuvent être 2 à 3 fois supérieurs aux maxima que nous avons en 1990 ; ceci n'est pas sans conséquences sur les flux. On peut donc estimer que **les flux moyens mesurés en 1990 et 1991 (tab. 4) sur les rivières sont des flux minima** pour des années sèches. Les flux maxima mesurés en 1990 et 1991 peuvent être dépassés lors de pluies d'orage ou de remontées brutales du débit.

SOULLE						
	1986	1987	1988	1989	1990	1991
Moyenne annuelle	3,44	2,69	2,75	1,17	1,51	1,26
I/Max	15,9	17,6	22,7	12,2	ND	21,2
J/Max	14,7	15,8	21,6	11,1	11,7	19,2
SIENNE						
Moyenne annuelle	8,2	8,28	9,87	4,71	6,33	5,41
I/Max	63,0	47,1	95	55,5	80,0	50
J/Max	54,0	46,7	75	52,5	79,0	49,2
BOSCQ						
Moyenne annuelle	ND	ND	ND	0,24	0,324	ND
I/Max	ND	ND	ND	ND	ND	ND
J/Max	ND	ND	ND	2,26	5,90	1,05

**Tableau 3 : Débits moyens annuels, maximum instantané (I/Max) et moyennes journalières maximales (J/Max) de la Sienne à Sey, la Soulle à Saint-Pierre de Coutance et du Boscq (données SRAE)**

Sur le tableau 4 sont reportés les flux mesurés et calculés. Les résultats appellent certains commentaires :

- La surévaluation systématique des flux calculés par rapport aux flux mesurés s'explique par le caractère non conservatif de la pollution bactérienne (surestimation du flux calculé) et par le fait que les prélèvements ont surtout été réalisés en période sèche. Ainsi dans les bassins versants agricoles, les flux calculés peuvent être 100 à 1 000 fois supérieurs aux flux mesurés. Ces chiffres élevés sont toutefois intéressants et peuvent être retenus en cas de pluie brutale : orage ou premiers lessivages où les phénomènes d'auto-épuration n'ont pas le temps de jouer. Il s'agit là d'un calcul de **flux potentiel** pouvant expliquer certaines contaminations observées sur la côte après un orage.

- Les mesures concernant le Boscq sont plus nombreuses, mieux réparties dans l'année. Pour ce rejet, le flux urbain est majoritaire. De plus l'infiltration ne joue pas et l'auto-épuration n'a pas le temps de se réaliser (circuit urbain très court). On peut noter alors que flux mesurés et calculés sont du même ordre de grandeur. Le Boscq, qui reçoit les effluents de la ville de Granville après une épuration des plus sommaires, représente le flux bactérien le plus important de la côte étudiée.

- La situation estivale (juillet-août) ne semble pas jouer un rôle important sur les flux car la pollution principale est issue de l'agriculture : par exemple dans la Vanlée en hiver, 90,7 % du flux bactérien est d'origine animale contre 76,7 % en été (données recensement), la population touristique ne semble donc pas modifier de façon prépondérante les flux.

BASSIN VERSANT	FLUX POTENTIELS CALCULES		FLUX MESURES 1991		
	Période normale	Période estivale	Moyenne	Minimum	Maximum
Sienna aval + Soulle	$8,96.10^{10}$ CF/s	$9,40.10^{10}$ CF/s	$1,7.10^8$ CF/s	$7,4.10^6$ CF/s	$1,5.10^9$ CF/s
Vanlée + Les Hardes	$6,65.10^9$ CF/s	$7,85.10^9$ CF/s	$7,6.10^6$ CF/s	$3,4.10^5$ CF/s	$8.10^7$ CF/s
Boscq	$5,35.10^9$ CF/s	$7,29.10^9$ CF/s	$8,35.10^{10}$ CF/s	$10^7$ CF/s	$10^{12}$ CF/s

**Tableau 4 : Bilan comparatif des flux potentiels calculés (populations recensées) et des flux mesurés en 1991.**

### 3. Conclusion

Les conclusions que l'on retiendra sur ce site sont les suivantes :

#### **Le havre de Regnéville**

Le flux moyen mesuré issu en 1990 et 1991 de la Sienna et de la Soulle est du même ordre de grandeur que celui des mesures antérieures (données DDASS - IFREMER), avec des flux minima et maxima également assez concordants ; par contre les flux calculés restent plus élevés par rapport aux flux mesurés pour les raisons précédemment évoquées (infiltration, auto-épuration...).

Dans le cadre d'une simulation de rejets, on pourrait retenir les flux suivants :

Flux moyen :  $10^8$  CF/s

Flux maximum :  $5.10^9$  CF/s correspondant à une journée de débit maximal observé en 1990.

Flux potentiel de crue :  $\approx 10^{10}$  CF/s, le débit dans ce cas là étant 3 à 4 fois plus élevé que le débit maximum observé en 1990-1991.

#### **Le havre de la Vanlée**

Les flux mesurés en 1990 et 1991 sont nettement plus faibles que ceux calculés, aussi bien pour les flux moyens que pour les flux maxima : en fait les résultats obtenus antérieurement sur la Vanlée correspondent à des analyses réalisées dans des conditions météorologiques différentes : pluie le jour ou les jours précédent le prélèvement (Etude DDASS-IFREMER-ABSN, 1989).

D'après l'ensemble des études, on pourrait retenir les flux suivants pour des simulations :

Flux moyen :	$10^7$ CF/s
Flux maximum :	$4,5 \cdot 10^8$ CF/s
Flux minimum :	$2 \cdot 10^4$ CF/s

Ce flux maximum est très certainement sous-évalué. Les conditions météorologiques régnant en 1990-1991 n'ont pas permis, comme cela devait être prévu, d'étudier les conséquences d'une pluie d'orage ou d'une remontée brutale des eaux. La mesure précise de tels flux reste indispensable pour connaître l'impact sanitaire réel de ce bassin versant sur la zone mytilicole.

### **Le Boscq**

Les flux mesurés en 1990 sont concordants avec ceux estimés (2 à  $5 \cdot 10^9$  CF/s) ; par contre en 1991 le flux moyen,  $8,3 \cdot 10^{10}$  CF/s, dépasse tous les flux déjà mesurés ou même calculés ; ce chiffre moyen très élevé est certainement dû à la mesure de septembre 1991 où le flux, au moment du prélèvement, était de  $10^{12}$  CF/s. La possibilité de vidange par le Boscq de quantités de bactéries fécales aussi importantes certainement sur des temps très courts mérite d'être retenue ; des études plus précises devraient être mises en oeuvre pour connaître l'occurrence d'un tel événement ; pour des simulations, on pourrait retenir les flux suivants :

Flux moyen :	$8 \cdot 10^{10}$ CF/s
Flux maximum :	$10^{12}$ CF/s
Flux minimum :	$10^7$ CF/s



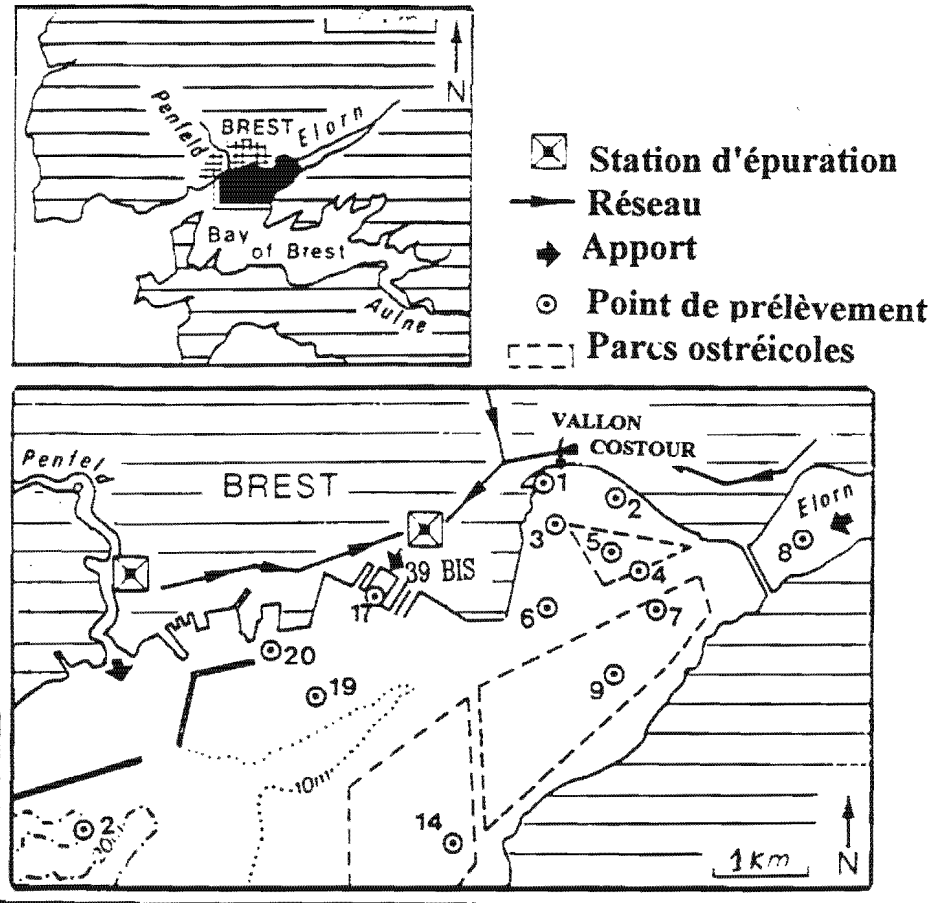


Figure 5 : Rade de Brest - Positionnement des points de rejets, des rivières et des prélèvements

### III - LA RADE DE BREST

#### 1. Généralités

Le site d'étude est la partie Nord de la rade de Brest, caractérisée par la présence d'une rivière l'Elorn et de trois importantes sorties d'eaux d'égout de la ville de Brest (150 000 habitants) : l'émissaire (39bis), la station d'épuration de la zone industrielle et portuaire (ZIP) les deux se déversant dans la forme de Radoub et les ruisseaux du Moulin Blanc (Vallon et Costour) (fig. 5) (CNEXO-COB, 1983 ; Pommepuy, 1987). Les principales caractéristiques de ces rejets sont les suivantes :

#### *Le rejet de la station d'épuration de la zone industrielle et portuaire (ZIP)*

Cette station de type boues activées moyenne charge a au moment de l'étude (1980-1981) une capacité de 85 000 EH avec les caractéristiques moyennes suivantes : débit journalier 12 750 m<sup>3</sup>/j, charge DBO5 : 5 950 kg/j, charge matières en suspension (MES) : 7 650 kg/j.

Les normes de rejets imposés sont : DBO5 (30 mg/l), MES (30 mg/l) et DCO (90 mg/l). En régime normal, cette station traite 17 000 à 20 000 m<sup>3</sup>/j soit 130 à 150 % de sa capacité hydraulique ; le réseau unitaire soumet la station à de très grandes fluctuations du débit. Un traitement par le chlore est rajouté en période estivale ; pendant notre étude les mesures ont été réalisées lors de périodes sans chloration.

#### *Le rejet d'eau mixte n° 39 bis*

Cet émissaire qui évacue les eaux pluviales reçoit également des eaux usées. De débit généralement faible (180 m<sup>3</sup>/j en juin 1980), il a cependant des pointes en période de pluie (1 800 m<sup>3</sup>/j). Son flux de pollution n'est pas négligeable et peut représenter jusqu'à 1 300 équivalents-habitants.

#### *Les ruisseaux du Moulin Blanc*

Les ruisseaux du Vallon et du Costour drainant chacun un bassin versant de 4 km<sup>2</sup>, se déversent au niveau de la baie du Moulin Blanc ; leur débit moyen, de l'ordre de 5 000 m<sup>3</sup>/j, peut subir de très fortes fluctuations lors des pluies.

Au niveau de l'émissaire des deux ruisseaux, venaient s'ajouter à l'époque de l'étude, en cas de panne des stations de relevage ou de pluies importantes, des eaux brutes représentant parfois jusqu'à 25 % du débit reçu à la station d'épuration (ZIP).

#### *L'Elorn*

Son bassin versant de 402 km<sup>2</sup> fait de l'Elorn le second apport dans la rade de Brest après l'Aulne. Le débit moyen est de 4 m<sup>3</sup>/s. Cette rivière joue un rôle important sur la qualité des eaux de la partie nord-est de la Rade de Brest car elle draine une région où les activités urbaines, industrielles et agricoles sont importantes ; elle reçoit également les rejets de la station d'épuration de Landerneau.

Pendant la période d'étude le débit de la rivière a été de  $4 \text{ m}^3/\text{s}$  en juin 1980 (lié à de fortes pluies). L'Elorn répond en été avec un retard de 2-3 jours aux chutes d'eaux tombant sur son bassin versant (en hiver 1 jour) ; en novembre-décembre le débit était plus soutenu :  $10 \text{ m}^3/\text{j}$ .

## 2. Concentrations et flux bactériens

### *Les principaux rejets ponctuels*

Pendant la période d'étude des prélèvements ont été réalisés sur les principaux apports ; le tableau n° 5 donne une indication des moyennes en coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux sur 3 des rejets ; on constate, d'une manière générale que, comme dans le cas du Cotentin, en été les concentrations dans les rejets d'eaux usées sont 100 fois plus importantes que dans les ruisseaux. Les valeurs sont moins élevées que dans le cas du Boscq et moins fluctuantes. La station d'épuration biologique "tamponne" les apports, ce qui est un sérieux avantage par rapport au cas du rejet de Granville.

	Juin 1980		Nov. Déc. 1980		Fév. 1981	
	UFC/100 ml	SF/100 ml	UFC/100 ml	SF/100 ml	UFC/100 ml	SF/100 ml
ZIP	$6.10^5$	$10^5$	$7.10^4$	$5.10^4$	$7.10^4$	$4.10^4$
Vallon	$6.6.10^3$	$1.2.10^3$	$9.6.10^3$	$1.2.10^4$	$4.10^3$	$5.10^3$
Costour	$1.4.10^3$	$6.10^2$	$9.10^3$	$2.10^3$	$7.10^2$	$4.5.10^2$

**Tableau 5 :** moyennes des concentrations en coliformes thermotolérants (CF) et streptocoques fécaux (SF) pendant la période d'étude.

En ce qui concerne les flux (tableau 6), ils ont été calculés avec beaucoup moins de données que ceux du site du Cotentin. Cependant on constate que là aussi, la station d'épuration représente près de 90 % des apports bactériens parmi les autres rejets ; le flux moyen est estimé à  $5,4.10^8 \text{ CF/s}$ . Le ruisseau du Costour, drainant une zone moins urbaine, est le plus faible apport de la zone ( $6,2.10^6 \text{ CF/s}$ ). Les flux d'autres paramètres physico-chimiques sont reportés sur le même tableau.

Paramètres	Station ZIP	39 bis	Vallon	Costour
Débit ( $\text{m}^3/\text{j}$ )	17 437	848	9 810	6 556
MES (kg/j)	471	173	367	207
NH4 (kg/j)	545	13	7	2
PO4 (kg/j)	285	5	7	1,3
Coliformes fécaux CF/s	$5.4.10^8$	$4.5.10^7$	$3.2.10^7$	$6.2.10^6$
Streptocoques fécaux SF/s	$2.2.10^8$	$1.1.10^7$	$9.3.10^6$	$4.5.10^6$

**Tableau 6 :** Débit et flux des quatre émissaires - Moyenne des mesures effectuées de février 1980 à mai 1991 (DDE Finistère).

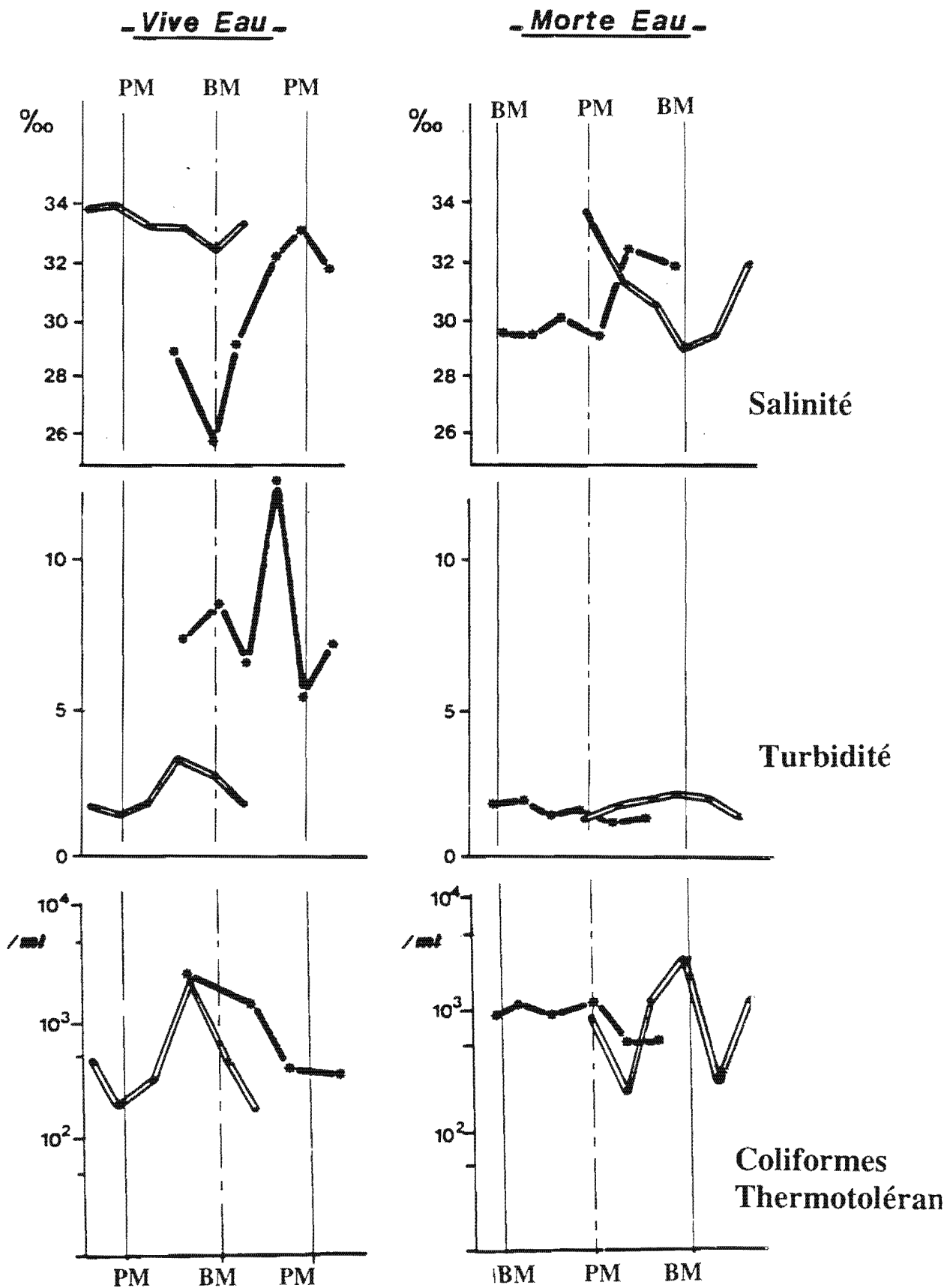


Figure 6 : Elorn (point 8) : Evolution des salinités (‰), de la turbidité (mg/l) et des coliformes thermotolérants (UFC/10<sup>6</sup> ml) en mortes eaux et vives eaux (surface) (■ Nov.-Déc. ; ○ Juin).

### *L'Elorn*

Du fait de l'activité du bassin versant (urbanisation et élevage en amont et en aval dans la partie estuarienne) il est difficile de limiter le calcul de l'apport de l'Elorn à sa partie non maritime (amont de Landerneau) ; de ce fait des mesures sont réalisées juste à son débouché dans la rade (figure 6: point 8).

A ce point, on note de grandes fluctuations des salinités dues au mélange de l'eau douce avec l'eau marine de la rade de Brest. Le mélange varie selon l'heure et le coefficient de marée ; la figure 6 rapporte ces variations : la salinité la plus basse a été observée en vives eaux et à basse mer (nov. 1980 - 26 ‰) alors que le débit de la rivière à Landerneau était d'environ de 10-15 m<sup>3</sup>/s). Le caractère marin de ce point est particulièrement marqué en été (débit de l'Elorn ≈ 4 m<sup>3</sup>/s), la salinité étant alors toujours supérieure à 29 ‰.

Sur la même figure, nous avons reporté les teneurs en matières en suspension. Lors des vives eaux, les remises en suspension, augmentent très nettement les concentrations. En période d'étiage (juin), la turbidité reste faible à ce point, le bouchon vaseux se trouvant plus en amont dans l'estuaire. En hiver, l'expulsion du bouchon vaseux et les lessivages dus à la pluie augmentent les turbidités. Ces résultats au point 8 sont en accord avec ceux trouvés dans l'estuaire (Pommepuy *et al.*, 1987).

La contamination fécale reflète les fluctuations dues aux variations de salinité. La figure 7 montre cependant que la corrélation entre ces deux paramètres existe, ce qui va dans le sens des travaux réalisés sur l'estuaire : la contamination suit une loi assez voisine de celle de la dilution de l'eau douce (courbe de dilution théorique). Les temps de mortalité sont vraisemblablement très longs puisque les points d'observations restent très proches de la courbe de dilution théorique ; en extrapolant à la salinité zéro la concentration initiale en coliformes totaux est de 5.10<sup>3</sup> UFC/100 ml. Ces résultats sont en accord avec nos résultats (Pommepuy *et al.*, 1987).

Dans le cas de l'Elorn, un calcul de flux incluant tous les apports du bassin versant, estuaire compris, s'avère très difficile ; cependant, l'évaluation du flux à une valeur voisine de 5.10<sup>7</sup> UFC/s s'est avéré assez réaliste dans le cadre des travaux de modélisation (Pommepuy et Salomon, 1991).

### **3. Conclusion**

Une étude récente a été réalisée par Saunier Environnement (1994) pour la Communauté Urbaine de Brest et a refait le bilan des rejets de la rade. Ce rapport indique que le rejet de la station d'épuration de la ZIP est actuellement plus élevé en ammoniacque (NH<sub>4</sub>) (734 k/j) et en coliformes thermotolérants (2.9.10<sup>9</sup> CF/s). En ce qui concerne le Vallon et le Costour, le flux est estimé à 7.10<sup>5</sup> CF/s ; cette sensible amélioration serait due aux travaux sur les réseaux. La station d'épuration de la ZIP traite maintenant une partie des eaux urbaines du Vallon et du Costour, d'où l'augmentation de son flux. Cependant, des déversements dus aux trop pleins, viennent parfois détériorer la qualité de ce rejet par temps de pluie ou de dérèglement des pompes de relevage.

Pour ce qui est de l'Elorn, ce même rapport (Saunier Environnement, 1994) en totalisant les différents flux du bassin versant jusqu'à son embouchure dans la rade (communes de Camfrout, Guipavas, La Forest Landerneau, bassin de l'Elorn, Landerneau et apports de la rive gauche), donne un flux moyen en coliformes thermotolérants de  $2,7 \cdot 10^8$  par seconde.

Cette étude montre par ailleurs que ce flux peut varier entre des minima de  $10^7$  CF/s et des maxima de  $10^9$  CF/s, ce qui place notre estimation du flux de l'Elorn (Pommepuy et Salomon, 1991) dans les valeurs minimales.

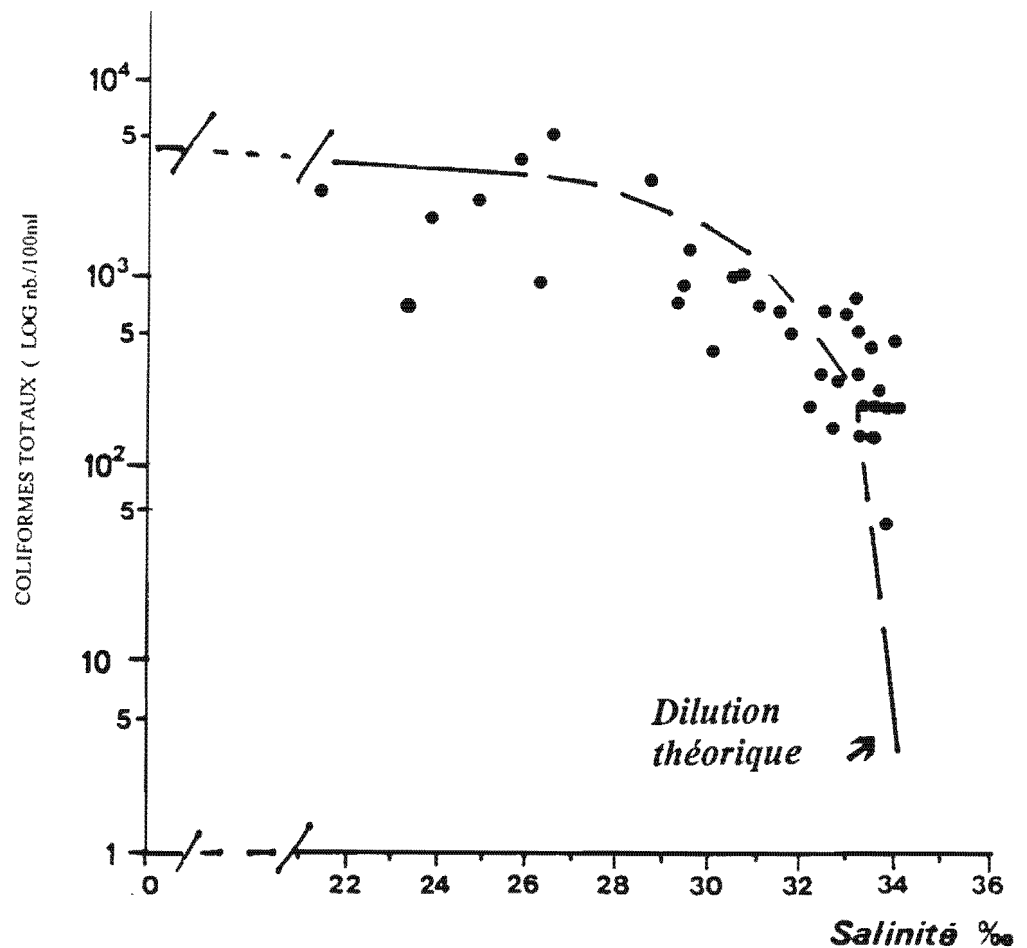


Figure 7 : Elorn (point 8). Relation entre la salinité et les coliformes totaux.

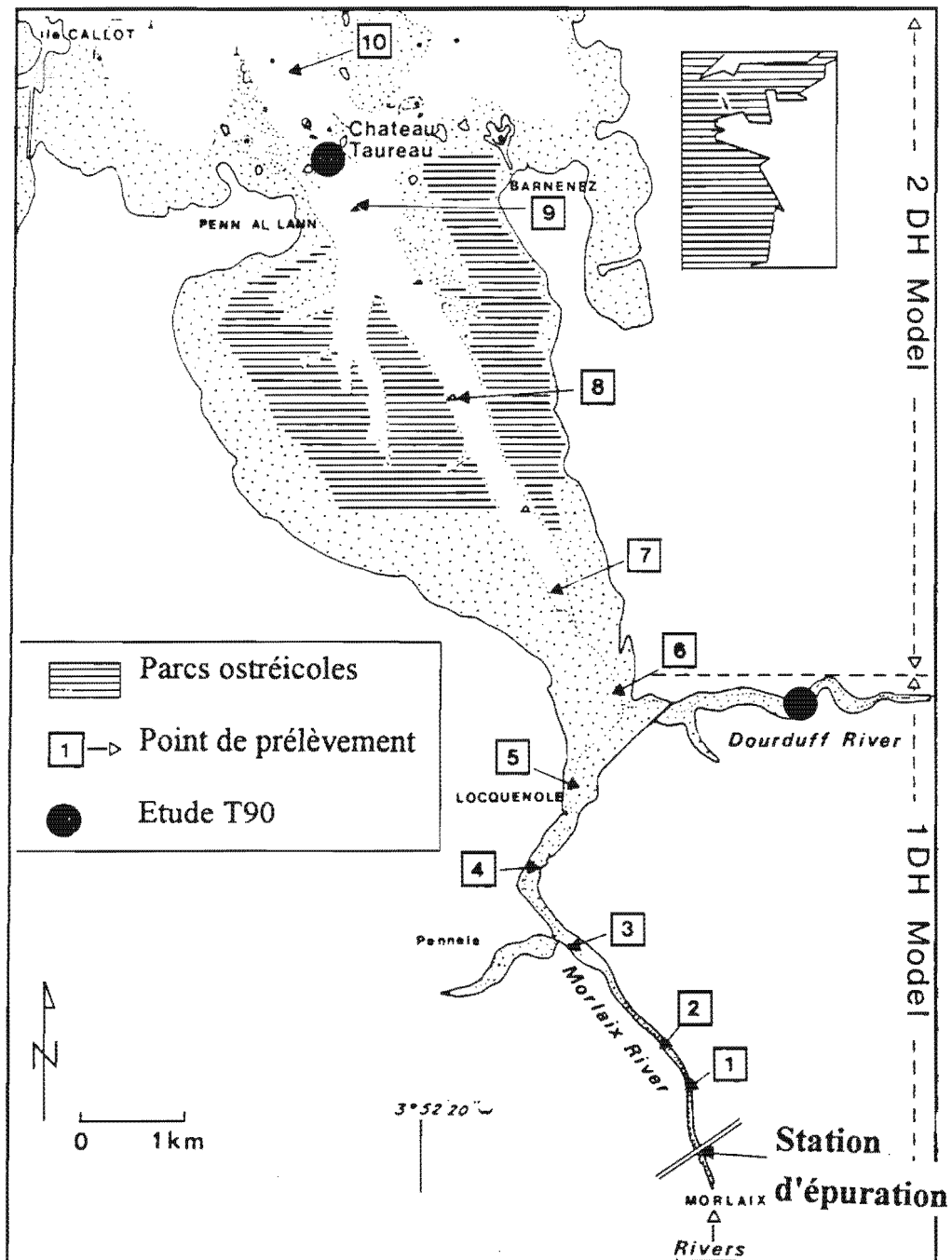


Figure 8 : Estuaire de Morlaix - Situation des points de rejet, des rivières et des points de prélèvements.

## IV - L'ESTUAIRE DE MORLAIX

### 1. Généralités

L'estuaire de Morlaix draine un bassin versant d'environ 300 km<sup>2</sup> ; deux rivières principales, le Jarlot et le Queffleuth se rejoignent au niveau de la ville en une seule rivière dite rivière de Morlaix qui présente un débit moyen de 3 m<sup>3</sup>/s (10 m<sup>3</sup>/s débit moyen de crue). Cette rivière se déverse en tête d'estuaire. D'autres apports plus modestes, la Pennelé et le Dourduff (1 m<sup>3</sup>/s débit moyen, 3 m<sup>3</sup>/s débit de crue) rejoignent l'estuaire dans sa partie médiane (figure 8). Les apports d'eaux usées urbaines sont essentiellement ceux de la ville de Morlaix : une station d'épuration (S.E.), type boue activée (44 000 EH), ne traitait pendant notre étude (1987-1989) qu'une partie des eaux usées, le reste des eaux brutes étaient déversées directement dans l'estuaire. La rivière du Frou et la ville de Locquéolé (780 habitants) rejettent elles aussi des eaux de plus ou moins bonne qualité dans la partie médiane de l'estuaire.

### 2. Concentrations et flux bactériens

Des études sur ce site permettent de préciser les concentrations moyennes en coliformes thermotolérants ainsi que les flux apportés à l'estuaire (Guillaud, 1991).

	M	Mini	Max
S.E. Morlaix Brut	$1,4 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^6$	$3,7 \cdot 10^7$
Epuré	$1,1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^6$
Rivière de Morlaix	$7 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^3$	$2,4 \cdot 10^4$
Dourduff	$6,5 \cdot 10^2$	-	-
Pennelé	$9 \cdot 10^2$	-	-
Frou	$1,6 \cdot 10^3$	-	-
Locquenolé	$6 \cdot 10^4$	-	-

Tableau 7 : Concentrations en coliformes thermotolérants dans les apports (exprimés en UFC/100 ml)

Les variations journalières de la station d'épuration de Morlaix en coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux sont reportés ci-dessous :

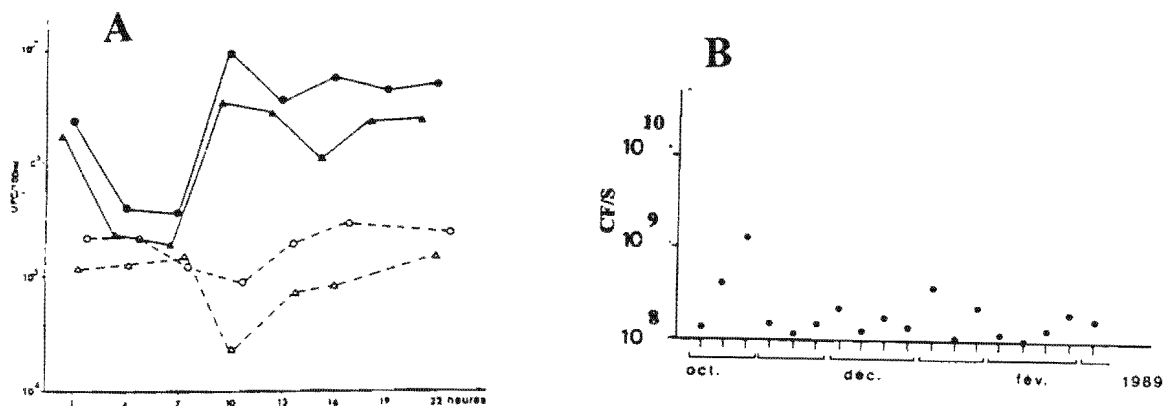


Figure 9 : Concentration et flux en germes tests de contamination fécale.

(A) : Coliformes thermotolérants : Brut ●—● épuré ○—○ ,  
streptocoques fécaux Brut :▲--▲ épuré Δ--Δ  
(B) : flux en coliformes thermotolérants (CF/j et CF/s) Dupray *et al.* (1991).



Les calculs de flux de coliformes thermotolérants réalisés sur cet estuaire donne une idée des valeurs moyennes et maximales attendues.

Points	Moyenne	Max
Station d'épuration	$\approx 10^9$	$4.10^9$
Rivière de Morlaix	$1.7.10^8$	$4.10^8$
Dourduff	$3.10^6$	$5.10^7$
Pennelé	$\approx 2.10^6$	$5,8.10^6$
Froust	$1,7.10^6$	$7,6.10^6$
Locquenolé	$5,5.10^6$	$1,5.10^7$

**Tableau 8 :** Flux de coliformes thermotolérants (CF/s) dans l'estuaire de Morlaix (Guillaud, 1991)  
(Le rejet brut représente 70 % du flux total de la station)

### 3. Conclusion

Ces résultats mettent en évidence l'importance du rejet de la station d'épuration de Morlaix qui représente 84 % du flux total en période moyenne (89 % en période de flux maximum), tandis que la rivière de Morlaix reste le second apport de cette région. On peut souligner également que bien que les flux de Locquenolé, du Froust et du Dourduff soient plus modestes leurs impacts sur les parcs ostréicoles peuvent être localement importants étant donné la proximité des rejets de la zone exploitée.

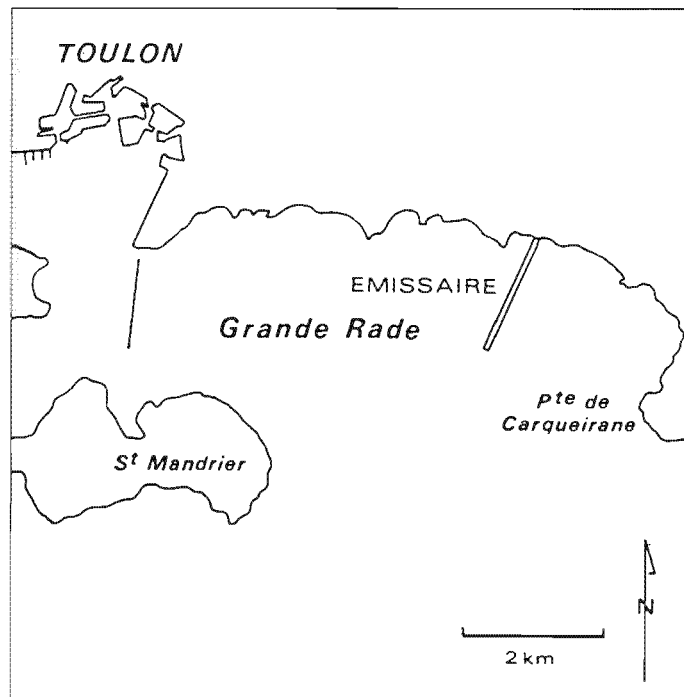
## V - SITE DE TOULON

### 1. Généralités

La ville de Toulon est équipée d'une station d'épuration (90 000 EH, traitement physico-chimique par floculation) qui rejette ses eaux usées par un émissaire (43 m de profondeur à 1,8 km de la côte - débit moyen  $650 \text{ m}^3/\text{h}$ ) situé dans la baie de Toulon (Figure 10). L'étude des flux a été réalisée par différents laboratoires (Baleux *et al.*, 1986). Nous reportons ces résultats de façon à évoquer les flux d'un traitement physico-chimique (IFREMER *et al.*, 1987).

### 2. Concentrations et flux bactériens

L'étude comparative avec la station d'épuration de Morlaix met en évidence un rendement d'élimination en coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux plus faible, ce qui est cohérent puisque le traitement physico-chimique élimine de façon plus limitée les contaminants. La figure 11 reporte les variations observées dans cette station avec des concentrations moyennes en entrée de  $2.10^7$  CF/100 ml et en sortie de  $5.10^6$  CF/100 ml. Le flux mesuré sur une période de 6 mois est également reporté. Pendant cette période le flux moyen obtenu est de  $5.10^9$  CF/s, les maxima enregistrés étant de l'ordre de  $10^{10}$  CF/s.



**Figure 10 : Baie de Toulon : point de rejet de l'émissaire de la station d'épuration.**

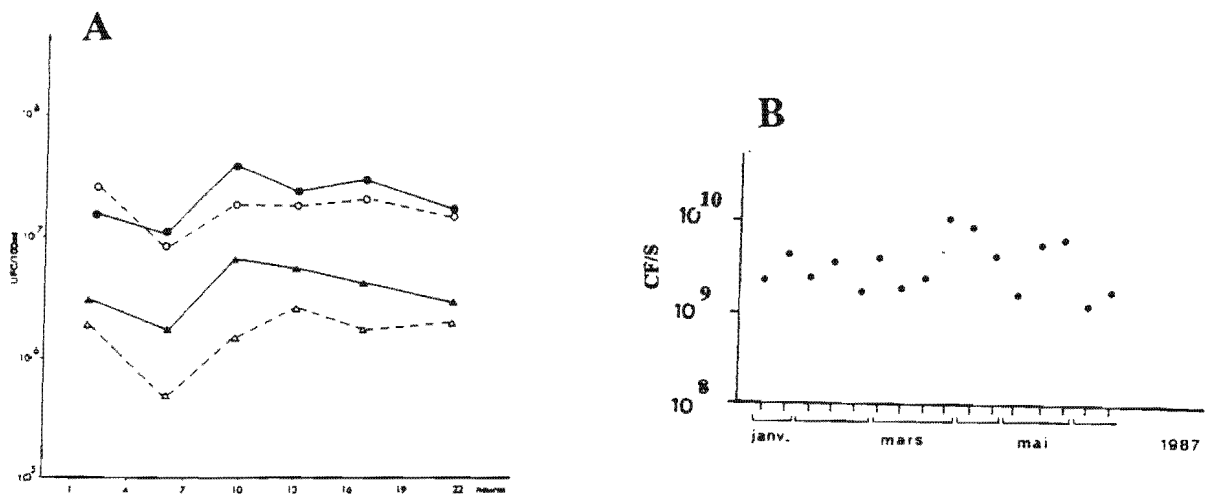


Figure 11 : (A) Concentration en germes tests de contamination fécale :  
 - coliformes thermotolérants : brut ●—● épuré ○—○,  
 - streptocoques fécaux brut : ▲—▲ , épuré △—△.  
 (B) Flux en coliformes thermotolérants.

### 3. Conclusion

Le traitement physico-chimique ne donne qu'un faible rendement : 20 à 50 % pour les coliformes thermotolérants et les streptocoques fécaux, alors que 80 % des matières en suspension sont éliminées. Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus sur Morlaix, on constate une meilleure efficacité du traitement biologique puisque 90 % des bactéries fécales sont éliminées. Néanmoins ces rendements restent faibles.

## VI - LA BAIE DE FORT DE FRANCE

### 1. Généralités

La baie de Fort de France, située dans les îles Caraïbes (Martinique) a une forte vocation touristique, industrielle et urbaine. Dans l'île la densité moyenne de la population est très forte ( $300 \text{ h/km}^2$ ) ; autour de la baie, la densité de population est encore plus élevée surtout dans la partie nord avec Fort de France (100 000 habitants), Schoelcher (20 000 habitants) et Le Lamentin (30 000 habitants) - (données INSEE 1990). Fort de France présente de nombreux rejets d'eaux plus ou moins épurées, ainsi le centre ville rejette des eaux brutes (dilacérées) par un émissaire de 1,3 km de long et immergé à - 60 m (rejet au sud de la pointe Simon). Cette pointe est située à 100 m au sud ouest du point 3 (fig. 12). Le reste des eaux usées est rejeté dans les rivières avec ou sans traitement.

Vingt deux points de rejets ont été identifiés autour de la baie de Fort de France (fig.12) et comprennent pour la moitié des rejets de stations d'épuration avec un traitement biologique et pour l'autre moitié des rejets de rivières. Certaines de ces rivières situées au nord (rivière Monsieur (7), rivière Madame (5), ravine Bouillée (6)) reçoivent des eaux usées sans traitement préalable.

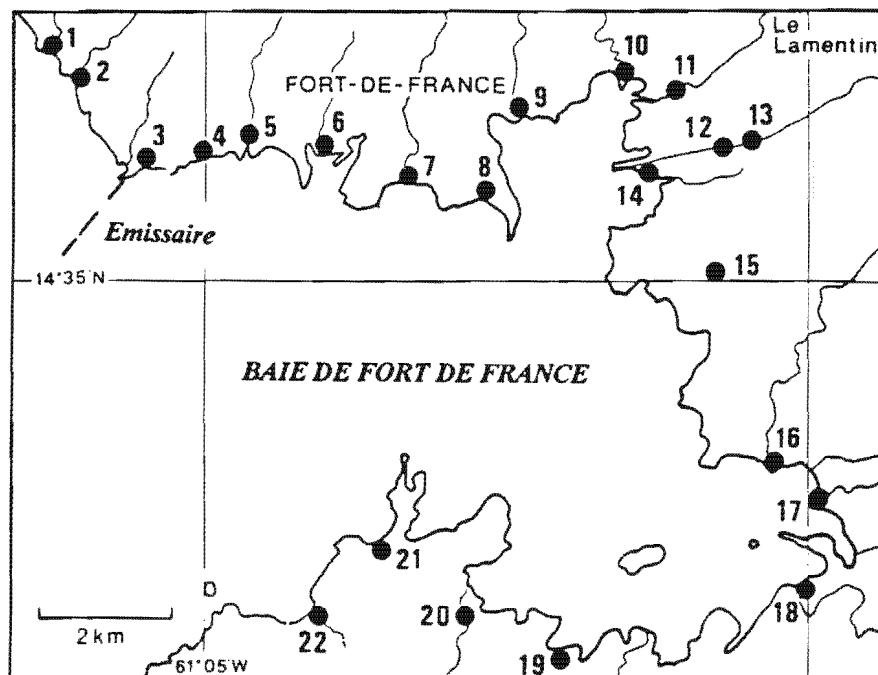


Figure 12 : localisation des points de prélèvements

Un échantillonnage a été réalisé bi-mensuellement pendant la période d'étude de novembre 1991 à mai 1993 (points 5, 6, 7, 8 et 9) et de juin 1991 à mai 1993 pour les autres points.

## 2. Concentrations et flux bactériens

La figure 13 illustre certains des résultats obtenus. Des données plus complètes ont fait l'objet d'un rapport IFREMER (1994) et d'une publication (Pompey *et al*, 1995).

On peut classer la qualité des eaux de rivières de la baie en trois catégories sur le critère des coliformes thermotolérants (CF) :

**Rivières peu contaminées** :  $< 10^3$  CF/100 ml : quatre rejets ou rivières appartiennent à cette catégorie : le rejet de la Pointe des Nègres (point 4), la rivière Carrère (point 14), la rivière Les Coulisses (point 17) et la rivière Pagerie (point 20).

**Rivières moyennement contaminées** entre  $1,5 \cdot 10^3$  CF/100 ml et  $5 \cdot 10^4$  CF/100 ml, soit 7 rivières ou rejets (les valeurs entre parenthèses sont des moyennes mesurées) :

- Point 1 : Schoelcher ( $1,5 \cdot 10^3$  CF/100 ml)
- Point 2 : Pont de la Ravine ( $9,3 \cdot 10^3$  CF/100 ml)
- Point 5 : Pont de l'Hermitage (Rivière Madame :  $3,9 \cdot 10^4$  CF/100 ml)
- Point 10 : Rejet station d'épuration Acajou ( $9,4 \cdot 10^4$  CF/100 ml)
- Point 11 : Pont d'entrée du Lamentin ( $1,5 \cdot 10^4$  CF/100 ml)
- Point 12 : La Lézarde ( $1,07 \cdot 10^4$  CF/100 ml)
- Point 18 : Rivière des Coulisses (en aval de la station d'épuration) ( $2,5 \cdot 10^4$  CF/100 ml).

### **Rivières ou rejet fortement contaminés ( $> 5 \cdot 10^4$ CF/100 ml)**

Ce sont essentiellement les points situés au nord de la baie et qui reçoivent les eaux usées non épurées (Ravine Bouillé (point 6), rivière Monsieur (point 7)) et les rejets des stations d'épuration : Chateauboeuf (point 9), Acajou (point 10), Le Lamentin (point 11) et rejet de la station du Lamentin (point 13), et dans le sud, le canal Ducos (point 15) et les stations d'épuration du sud de la baie. Dans cette catégorie de très fortes charges peuvent être mesurées ( $> 10^6$  CF/100 ml).

La connaissance des flux serait nécessaire pour estimer l'impact réel de ces contaminants dans la baie. Malheureusement pendant notre étude nous n'avons pu obtenir de résultats sur les débits des rivières soit par manque d'équipements et de moyens des administrations compétentes (Service Régional d'Aménagement des Eaux) soit du fait de la restructuration de cette compétence dans le contexte local (ORSTOM - DDA - SRAE). De plus les conditions locales (multiples rejets) et climatiques (impossibilité de mesurer les débits pendant les périodes les plus critiques, c'est-à-dire les périodes de fortes pluies) font que ces mesures auraient été en tout état de cause très difficiles à obtenir.

Les seules informations permettant une estimation - très partielle - des flux ont été recueillies auprès de la Direction Départementale de l'Agriculture.

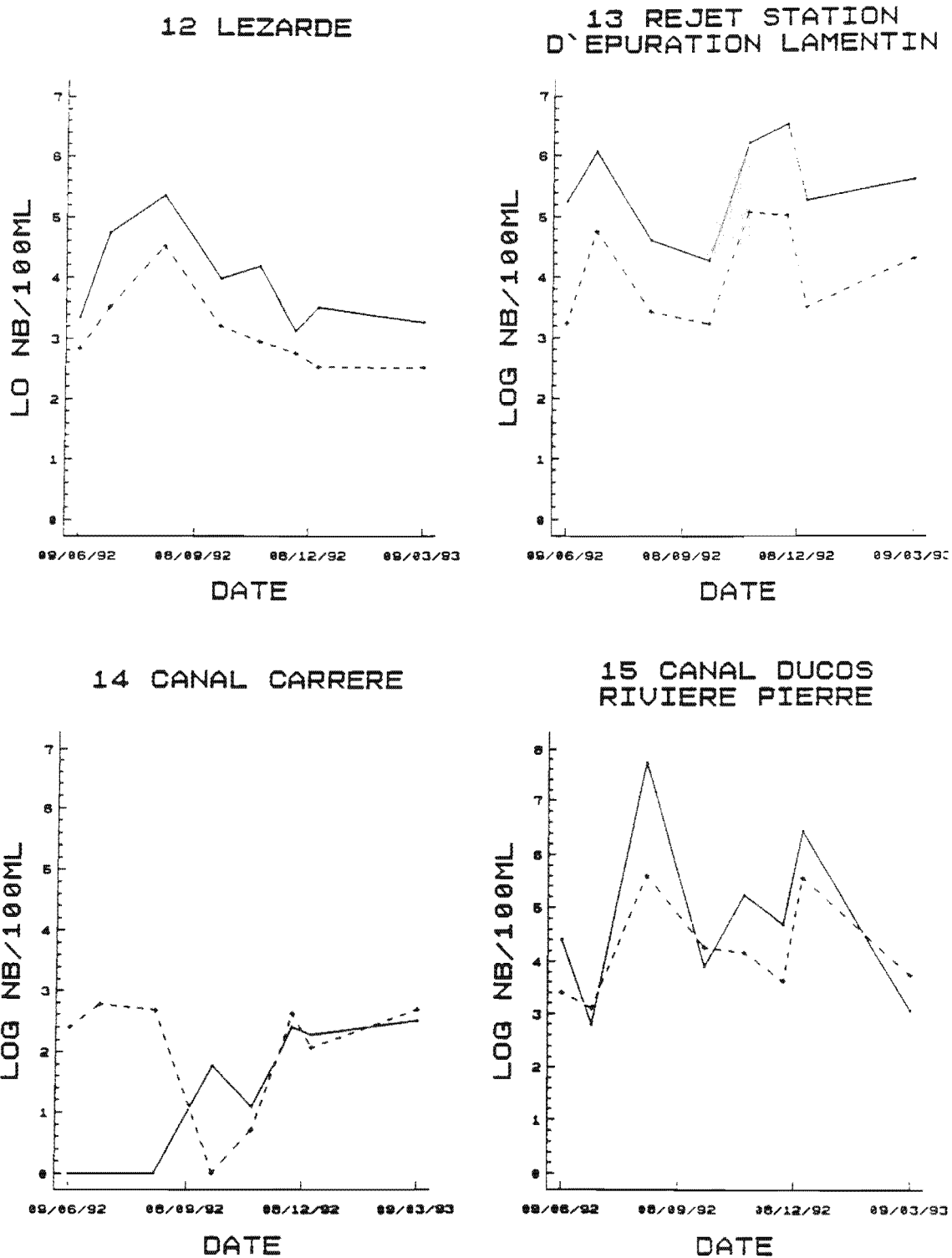


Figure 13 : Variations annuelles des coliformes thermotolérants (---●---) et streptocoques fécaux (---+---) - Exemple de quatre rivières et rejets de la baie de Fort de France.

La liste des équipements en station d'épuration ainsi que leur capacité en équivalent/habitants (EH) est présentée ci-dessous : le nombre d'équivalent habitants peut être converti en flux bactérien. En effet on considère, pour l'homme, un rejet journalier de  $10^{10}$  CF d'eau soit un flux de  $1,15 \cdot 10^5$  CF/s ; les informations présentées sur le tableau 9 datent de juin 1990.

N°	SE	Equiv/hab.	Flux CF/s	Lieu du rejet
5	Godissard	13 000	$1,5 \cdot 10^9$	Rivière Madame
9	Chateauboeuf	14 500	$1,6 \cdot 10^9$	Rivière Monsieur
8	Dillon	22 000	$2,5 \cdot 10^9$	Ravine
10	Acajou	5 000	$5,7 \cdot 10^8$	Pluvial (Maugnone)
12	Petit Manoir	18 000	$2,1 \cdot 10^9$	Rivière La Lézarde
16	Bourg Ducos	10 000	$1,1 \cdot 10^9$	Rivière
17	Les Coulisses	7 000	$8,1 \cdot 10^8$	Rivière
19	Trois Ilets	2 000	$2,3 \cdot 10^8$	Rivière citron
21	Anse Mitan	3 500	$4,5 \cdot 10^8$	Bord de mer
22	Anse à l'Ane	2 500	$2,9 \cdot 10^8$	Marigot bord de mer

**Tableau 9 : principaux rejets des stations d'épuration (boues activées) de la baie de Fort de France (DDA - juin 1990)**

Un projet actuellement à l'étude prévoit l'extension de la station de l'anse Mitan (avec le raccordement du rejet de l'anse de l'Ane) et rejet en mer. La station d'épuration aurait une capacité de 15 000 EH, soit un flux  $\approx 1,7 \cdot 10^9$  CF/s environ.

### 3. Conclusion

Les informations sur les flux sont très partielles ; aucune donnée n'existe soit sur les rivières soit sur les zones non raccordées (Rivière Bouillé et d'une manière générale, une grande partie des quartiers de Fort de France). La Lézarde, principale rivière de l'île, draine un bassin versant qui représente environ 1/3 de la superficie de l'île. Cette rivière a fait l'objet il y a trois à quatre ans, de mesures de débits. Cependant, une crue, emportant le matériel de mesure a rendu impossible l'acquisition de données [Communication personnelle, ORSTOM]. De plus, nous n'avons pu obtenir les quelques mesures disponibles qui, par ailleurs étaient relativement anciennes.

## VII - RECHERCHE DES SALMONELLES

La recherche de salmonelles a été réalisée sur trois sites : Ouest Cotentin, Morlaix, Rade de Toulon.

### 1. Ouest Cotentin

Durant l'année 1991, la recherche de salmonelles a été réalisée de façon semi-quantitative sur les mêmes prélèvements que ceux utilisés pour la numération des coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux, afin d'évaluer les apports à la zone littorale.

Vingt prélèvements ont été analysés sur chaque rivière, de janvier à décembre 1991. La fréquence de positivité en salmonelles est la suivante :

. Boscq :	89 % des prélèvements,
. Soulle :	82 % des prélèvements,
. Sienne :	57 % des prélèvements,
. Vanlée :	33 % des prélèvements,
. Les Hardes :	9 % des prélèvements.

**Les rivières telles que le Boscq et la Soulle drainant des zones urbaines apparaissent plus fréquemment contaminées :**

Les plus fortes concentrations ( $\geq 25$  salmonelles/litre) sont observées dans le Boscq et la Soulle. Ainsi, 58 % des prélèvements du Boscq et 12 % des prélèvements de la Soulle rentrent dans cette classe. Arrive ensuite la Sienne avec 5 % des prélèvements dans cette classe. La Vanlée et les Hardes ne dépassent pas la classe 2,5 à 25 salmonelles/litre (10 % des prélèvements de la Vanlée).

Pour conclure, le Boscq est très souvent fortement contaminé par les salmonelles, la Soulle présente une contamination variable (toutes les classes de concentration s'y retrouvent à une fréquence égale). La Sienne et la Vanlée sont le plus souvent faiblement contaminées (absence dans 4 litres pour 45 % des prélèvements de la Sienne et pour 75 % des prélèvements de la Vanlée).

Les sérotypes les plus fréquemment isolés sont :

- . *S. enteritidis* (10 % des souches),
- . *S. meleagridis* (8 %),
- . *S. bovis-morbificans* (8 %).

### 2. Sites de Morlaix et de Toulon

Les salmonelles ont été recherchées simultanément sur le site de Toulon et Morlaix. Le tableau 10 reporte les résultats obtenus ainsi que, pour comparaison, des valeurs observées sur le rejet de Saint-Malo et de Montpellier.



STATION	EFFLUENTS BRUTS		EFFLUENTS EPURES	
	% de positifs	/100 ml	% de positifs	/100 ml
Morlaix	87	100 à 1 000	75	10 à 100
Toulon *	100	10 à 100	100	10 à 100
Montpellier *	100	10 à 100	100	1 à 10
St. Malo **	100	1 000 à 10 000	-	-
Lagunage de Mèze *	100	1 à 10	74	0,1 à 1

\* D'après Alibou J., 1987.

\*\* D'après Desmonts C. *et al.*, 1990.

Tableau 10 : Fréquence et concentrations moyennes de *Salmonella* dans différents effluents (Dupray *et al.*, 1990).

On constate qu'à Toulon 100 % des échantillons s'avèrent positifs, le traitement physico-chimique n'entraîne aucune diminution du nombre de salmonelles, alors qu'à Morlaix et à Montpellier un abattement apparent semble être obtenu dans les eaux épurées. D'un site à l'autre, les concentrations dans les eaux brutes peuvent varier, vraisemblablement dû aux variations locales de la population. Ainsi des concentrations très élevées sont observées sur le rejet d'eaux brutes de Saint-Malo.

Par ailleurs, Baleux *et al.* (1986), constatent sur l'effluent de Toulon que la notion de "faible" ou "forte charge" n'est pas une réalité en référence aux bactéries pathogènes (*Salmonella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Staphylococcus aureus*) dont les abondances maximales ne correspondent pas aux périodes de fortes charges. Ces mêmes auteurs soulignent la faible performance de la station vis-à-vis de l'abattement de ces bactéries pathogènes : l'abattement observé étant au mieux d'un logarithme de concentration et souvent beaucoup moins.

## VIII - CONCLUSIONS

Les études réalisées sur cinq sites français malgré la disparité des informations (temporelles, l'échantillonnage, les méthodes analytiques), permettent néanmoins d'avoir des ordres de grandeur des concentrations - éventuellement des flux de coliformes thermotolérants - dans les eaux déversées en mer.

En ce qui concerne les conclusions, on retiendra les points principaux :

On rappellera tout d'abord que la **disparité des techniques employées** d'un site à l'autre doit entraîner une certaine prudence quand à la comparaison des résultats. Une étude en cours, menée par le Bureau Communautaire de Référence et pilotée par l'Institut Pasteur de Lille tente de faire le point sur la meilleure technique de détermination des coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux dans les eaux littorales. Ainsi 34 laboratoires de 10 pays de la communauté y participent et comparent leurs techniques sur différents types d'eau (bactéries stressées ou non, avec ou sans compétition de flore...). Les techniques utilisées et testées sont très disparates d'un laboratoire, ou d'un pays à l'autre, aussi bien au niveau des techniques par filtration sur membrane que les techniques en milieu liquide (disparité des protocoles, des milieux...). Les premiers résultats de plusieurs séries d'intercalibration réalisées par les laboratoires réunis à Lille semblent indiquer que la technique NPP ( 3 tubes ou 5 tubes)

est la moins fiable. Par contre les techniques par filtration sur membrane et celles par microplaques (Institut Pasteur) seraient les plus performantes pour rechercher les coliformes thermotolérants et les streptocoques fécaux. Ces résultats d'intercalibrations nous confortent dans l'extrême prudence qu'il faut avoir lors de l'interprétation des résultats et dans la nécessité à homogénéiser les techniques.

**Au niveau des stations d'épuration** les concentrations en coliformes thermotolérants mesurées dans les eaux brutes (Boscq, Brest, Morlaix, Toulon et Station de Fort de France) sont très élevées :  $10^6$  à  $10^7$  CF/100 ml ; d'autre part, des maxima ont été mesurés à  $8.10^7$  et  $10^9$  CF/100 ml ; la plupart du temps les abattements obtenus par le traitement sont assez faibles. En traitement physico-chimique l'abattement est inférieur à 1 log, le traitement biologique donne souvent de meilleurs résultats supérieurs à 1 log parfois jusqu'à 3 log des concentrations. Néanmoins les déversements soit accidentels, soit parfois presque continus d'eaux brutes (Morlaix) contribuent à apporter à la mer des eaux très chargées ; la qualité du réseau, souvent unitaire sur des quartiers de ville, est pour une grande part responsable de ces déversements. Dans ces eaux, on note d'autre part, lorsqu'elles ont été recherchées, la présence presque toujours de salmonelles ; ces bactéries sont en concentration beaucoup moins importantes que les coliformes ou les streptocoques fécaux. Dans des cas extrêmes (Saint-Malo) leur quantité a été évaluée à  $10^3$  ou  $10^4$  UFC/100 ml. La plupart du temps les concentrations restent faibles (10-100 UFC/100 ml). La présence d'autres microorganismes pathogènes (entérovirus, virus de l'hépatite A, Rotavirus) a également été mise en évidence (IFREMER, 1994).

**Les rivières contaminées par des apports urbains ou agricoles** voient leur concentration moyenne en coliformes thermotolérants fluctuer de  $10^3$  UFC/100 ml à  $10^4$  UFC/100 ml et parfois plus ( $> 10^5$  UFC/100 ml). Dans ces eaux, l'effet des pluies contribue à dégrader très sérieusement leur qualité. Ainsi la Soule (apport de Coutances) passe par des minima très faibles ( $< 10$  UFC/100 ml) et des maxima proches d'eaux d'effluents ( $10^5$  UFC/100 ml). On pourrait retrouver des exemples sur tous les sites étudiés (les ruisseaux du Vallon, du Costour, rivière Madame, la Lézarde...). Dans ces rivières, lorsqu'elles ont été recherchées (Ouest Cotentin) la présence de salmonelles a été quelquefois détectée. Des études plus approfondies seraient nécessaires pour identifier leur présence lors de premiers ruissellements.

**Les rivières faiblement contaminées** présentent en général des concentrations de l'ordre de  $10^2$  à  $5.10^2$  UFC/100 ml en coliformes fécaux (Sienne, Vanlée, Pennelé, rivière Carrère).

**Les flux** - excepté sur le site du Cotentin et sur les stations d'épuration de Morlaix et de Toulon - n'ont fait l'objet que d'évaluations très sommaires. Le manque de systèmes de prélèvements automatiques, la difficulté du calibrage de débitmètres et leur nombre limité, la difficulté de mesurer les flux lors des périodes critiques (crues) font que les chiffres apportés ici ne sont que très partiels. Cependant, ils permettent de montrer que, du fait de leurs niveaux très élevés, ce sont les stations d'épuration, et surtout leurs systèmes de déversements ("bypass") qui sont responsables des flux contaminants les plus importants sur tous les sites d'étude. Des études plus approfondies et comparatives (mesures/calcul) devraient être réalisées pour permettre des aménagements rationnels et déterminer les priorités en matière de désinfection.

Les coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux, s'avèrent au niveau des rejets des **indicateurs de contamination** relativement acceptables : en effet aux fortes

concentrations trouvées correspondent la présence de salmonelles dans plus de 80 % des prélèvements et ceci à des concentrations parfois très élevés (rivières très contaminées et rejets de stations) ; à l'opposé lorsque les concentrations en indicateur sont faibles (rivières faiblement contaminées) la présence de salmonelle est très peu souvent détectée (et toujours en concentration plus faible).

Il est cependant reconnu que dans le milieu naturel ou au cours des traitements de désinfection, les salmonelles sont plus résistantes que les coliformes thermotolérants et voir même que les streptocoques fécaux (Saylor *et al.*, 1976 ; Ashbot *et al.*, 1993) ce qui justifie une prudence vis-à-vis des germes test de contamination fécale.

## **CHAPITRE 11**

# **QUALITE DU MILIEU**

## INTRODUCTION

Les nombreuses études réalisées sur sites montrent la diversité des situations et de la qualité microbiologique des eaux que l'on peut rencontrer sur le littoral. Les pathogènes, lorsqu'on les recherche sont souvent présents : ainsi Saylor *et al.* (1976) mettent en évidence, dans la partie amont de l'estuaire de la Chesapeake bay la présence de *Salmonella* dans 3 % des prélèvements, de *Clostridium* dans 12 % des prélèvements de sédiments, et de *Vibrio parahaemolyticus* dans 10 % des prélèvements d'eau et de sédiment ; les auteurs soulignent qu'il n'existe pas de corrélations entre germes tests de contamination fécale et bactéries pathogènes.

En Nouvelle Ecosse, Robertson et Tobin (1983) ont constaté que la présence de coliformes thermotolérants est liée à celle de *Candida albicans*, de *Vibrio parahaemolyticus* et de *Pseudomonas aeruginosa*. Bien que *V. parahaemolyticus* soit considéré comme une bactérie indigène de l'environnement côtier, son abondance est liée notamment à la présence de matière organique apportée par les eaux usées.

Sur un site ouvert, la baie de Sydney, Ashbolt *et al.* (1993) ont étudié l'impact d'un rejet en eau profonde après traitement primaire et d'un rejet dans la baie d'une station d'épuration biologique avec chloration : *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Aeromonas spp*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Campylobacter* ont été recherchés pendant deux ans dans les eaux et les sédiments. Le rejet au large est fortement dilué et les concentrations bactériennes dans l'eau, sont très réduites ; seul subsiste *Clostridium perfringens*, qui par ailleurs résiste très bien à la chloration. Les sédiments par contre sont très contaminés ainsi que la partie de la baie en aval du rejet biologique chloré. Dans cette zone, des salmonelles ont été détectées. Enfin, ces auteurs montrent que *Aeromonas spp.* peut croître en eau douce sous l'influence des apports organiques. *Campylobacter* est associé aux rejets agricoles et n'est retrouvé ni dans l'eau de mer ni dans les eaux usées urbaines.

En zone ouverte soumise à la marée, de très fortes fluctuations de concentrations en bactéries fécales peuvent être observées (Gameson., 1980). Mais ce sont les zones fermées qui paraissent les plus sensibles à la contamination : baie de Naples (Izzo *et al.*, 1982), estuaire de la Chesapeake bay (Carney *et al.*, 1975), baie de Thermaikos (Ganoulis, 1991), baie de Cochon (Pradeep *et al.*, 1986), étang de Thau (Alibou J., 1987 ; Troussellier *et al.*, 1993). Dans ces zones fermées, du fait de l'apport continu des rejets et de la stagnation des eaux, les niveaux de contamination des eaux sont élevés et peuvent dépasser les normes réglementaires de baignade (directive CEE 70/923 - Décret 91-980 - JORF 26-9-1991) et de conchyliculture (directive CEE 79/923 - Décret 91-1283 - 19.12.1991). Les *Clostridium* s'avèrent souvent présents et sont très significatifs de la pollution fécale ; les coliformes thermotolérants et les salmonelles, dans ces écosystèmes fermés, subissent des fluctuations saisonnières dues aux variations locales biologiques et physico-chimiques : pH, ensoleillement, phytoplancton (Alibou J., 1987 ; Troussellier et Legendre, 1989).

La diversité des sites sur la côte française nous a incité à exposer les études réalisées dans des zones différentes : **Ouest Cotentin, rade de Brest, estuaire de Morlaix, baie de Toulon et baie de Fort de France**. Dans un premier temps, nous décrirons leur caractéristiques et le taux de contamination lié aux apports, puis nous tenterons d'expliquer les mécanismes et les facteurs (physiques ou biologiques) responsables de la qualité des eaux rencontrée.

Dans ces études nous avons tout particulièrement recherché la contamination en coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux. Quelques recherches complémentaires ont parfois été réalisées (flore totale, salmonelles...). Ces travaux ont donné lieu à des rapports collectifs et à des publications (cf. bibliographie).

## I - MATERIEL ET METHODES

La recherche des coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux et *Salmonella* ont été réalisées selon les techniques précédemment exposées (chapitre I).

Dans certains cas, l'étude a été complétée par d'autres analyses dont les méthodes sont exposées ci-dessous.

### 1. Coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux

Dans la baie de Fort de France, les contaminations recherchées étant a priori très faibles, les méthodes par microplaque ont été complétées par des méthodes de filtration sur membrane qui permettent de concentrer l'échantillon.

- Coliformes thermotolérants : filtration (10 - 100 ml) et incubation sur milieu TTC-Tergitol 7 24 h à 44°C et confirmation sur milieu de Schubert.

- Streptocoques fécaux : filtration (10 - 100 ml) et incubation sur milieu Slanetz 48 h à 37 °C.

### 2. Coliformes totaux

*Filtration sur membrane* : filtration de 50 ml, 10 ml et 1 ml d'eau de mer et rinçage avec de l'eau distillée stérile. La membrane est déposée sur le milieu - gélose lactosée au TTC et Tergitol 7, et incubée de 16 à 24 heures à 37 °C. Le dénombrement concerne des colonies jaunes, claires ou foncées, orangées à halos jaunes.

#### *Milieus de Drigalski (Institut Pasteur Production)*

Deux milieux de Drigalski préparés à l'eau distillée sontensemencés ; l'un est incubé à 37 °C (DD), l'autre à 42 °C (D42) pendant 24 heures. Ces milieux permettent de détecter les coliformes fécaux stressés.

Un milieu de Drigalski préparé à l'eau de mer filtrée (0,22 µ), d'une teneur en NaCl voisine de 34 ‰, est incubé à 25 °C (DS) pendant 4 jours.

Le milieu de Drigalski est sélectif des bacilles à gram négatif. Il permet de différencier les bactéries fermentant le lactose (L<sup>+</sup>), colonies jaunes, des bactéries ne fermentant pas le lactose (L), colonies vertes ou bleues. Les bactéries L<sup>+</sup> se développant à 37 °C, et surtout à 42 °C sont représentatives de la flore de contamination (entérobactéries), tandis que les bactéries L<sup>-</sup> se développant à 25 °C sont représentatives d'une partie de la flore

autochtone (*Pseudomonadaceae*, *Vibrionaceae*, etc.), comme cela a été vérifié lors de nos identifications (données non publiées).

### 3. Flore hétérotrophe

#### *Gélose trypticase salée*

Ce milieu trypticase caséine soja (*Institut Pasteur Production*), est préparé avec de l'eau de mer filtrée (0,22 µm) à une teneur en NaCl de 34 ‰ (TS). L'incubation se fait à 20 °C pendant 4 jours, ce qui permet la croissance des espèces hétérotrophes halotolérantes.

#### *Gélose trypticase douce*

Le même milieu est préparé avec de l'eau distillée stérile et incubé à 20 °C pendant 4 jours (TD). Il permet la croissance des bactéries hétérotrophes.

### 4. Autres paramètres

Certains paramètres physico-chimiques (salinité, MES) ont été également mesurés : ces méthodes sont détaillées par Aminot et Chaussepied (1983) et au chapitre 1, (matériel et méthodes). **La salinité** a été mesurée avec un salinomètre Beckman RS9 ou directement sur le terrain avec une sonde température-salinité (Kent Instrumental Measurement - EIL 5050 - précision 1 ‰).



Figure 14a : côte de l'ouest Cotentin



## II - L'OUEST COTENTIN

La côte ouest du Cotentin est une côte ouverte (fig. 14a), soumise à des marées de forte amplitude : 8,5 m d'amplitude pour un coefficient de 75. Le maximum de marnage est obtenu pour un coefficient de 119 : 13,9 m d'amplitude. De vastes estrans de sable grossier ou des platiers rocheux sont occupés sur des hectares par des activités conchylicoles - principalement la mytiliculture. L'amplitude de marée provoque le découverture de larges zones à basse mer de vives eaux d'où émergent les bouchots à moules. Seuls abris sur cette côte, "les havres" de Regnéville et de la Vanlée sont accessibles quelques heures à pleine mer ; à marée basse, un filet d'eau douce ou saumâtre de faible épaisseur (< 1 m) permet l'écoulement des rivières des Hardes et de la Vanlée au sud, de la Soulle et de la Sienne au nord. Ces havres, en raison d'un fort hydrodynamisme (courant de marée, houle d'ouest...), présentent au niveau de leur embouchure, des migrations de bancs de sable qui font osciller l'écoulement des rivières et peuvent modifier ainsi localement la qualité des coquillages d'une année à l'autre (IFREMER-DDASS, 1989a, 1989b). De plus le brassage continu des eaux confère à cette zone une turbidité assez élevée (8-17 mg/l) par rapport aux eaux de la Manche et de faibles différences de température entre surface et fond. La salinité est généralement de 35 ‰ en période sèche et les températures varient entre 7 à 8 °C en hiver et 16,5 °C - 17 °C en été (CNEOX, 1981).

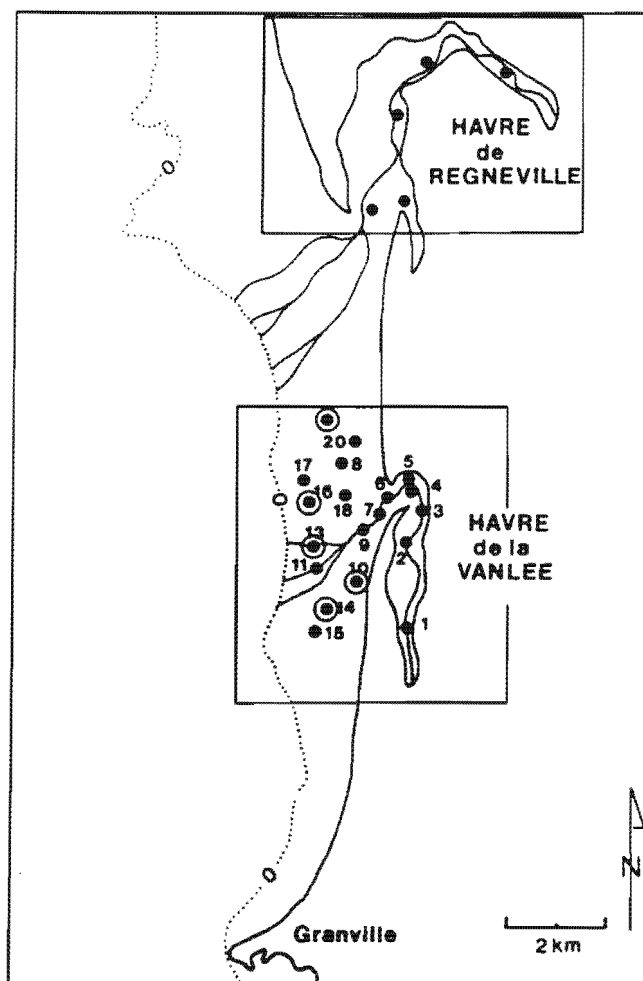


Figure 14bis : Localisation des points de prélèvements.

Deux campagnes d'étude des eaux littorales ont été menées en janvier et avril 1991 (figure 14b), de façon à évaluer leur qualité microbiologique (IFREMER, 1992). Nous nous sommes intéressés, d'une part à la qualité de l'eau des deux havres, puis à celle de l'eau baignant les parcs à moules durant le jusant ; d'autre part des radiales nord/sud, du havre de Regnéville à Granville ont été effectuées pour déterminer d'éventuelles zones de contamination.

### 1. Distribution des concentrations bactériennes au débouché des havres de Regnéville et de la Vanlée (fig. 15a, 15b)

Les niveaux de contamination en coliformes thermotolérants à basse mer, peuvent atteindre  $1,5 \cdot 10^3$  CF/100 ml, en sortie du havre de la Vanlée et  $4,6 \cdot 10^3$  CF/100 ml en sortie du havre de Regnéville (tab. 11).

Date	Regnéville			Vanelée		
	CF	SF	salmonelles	CTT	SF	salmonelles
1/4/1991	230	9	+ *	< 3	< 3	-
2/4/1991	460	3	ND *	< 3	4	ND
3/4/1991	430	7	- *	< 30	15	-
4/4/1991	1 100	< 30	ND	ND	460	ND
5/4/1991	1 200	9	ND	91	15	ND
7/4/1991	4 600	1 100	ND	1 500	1 100	ND
8/4/1991	2 400	240	-	430	43	-
9/4/1991	ND	43	+	ND	240	-

+ Positive      - Négative      D : Non déterminé

**Tableau 11 : qualité des eaux en sortie des havres de Regnéville et de la Vanlée.**

Les concentrations de coliformes thermotolérants (CF) et streptocoques fécaux (SF) sont exprimées pour 100 ml d'eau.

Regnéville : Prélèvement dans le chenal au niveau de l'épi de Regnéville-sur-Mer.

Vanelée : Prélèvement dans le chenal.

A basse mer, les concentrations en bactéries sont constantes dans les chenaux de l'amont jusqu'en aval des havres, dans les deux sites. La salinité mesurée sur ces points étant généralement inférieure à 12 ‰, c'est donc de l'eau douce peu diluée, directement issue des rivières qui s'écoule jusqu'au pied des bouchots.

Pendant le jusant, l'eau douce s'écoule en suivant les chenaux de marée, jusqu'au niveau des parcs ; dans le cas de fortes contaminations des rivières et de mauvais mélange eau douce - eau de mer (conditions hydrodynamiques défavorables), le risque de contamination des bouchots peut être élevé.

La recherche de salmonelles, lors de la campagne de prélèvements du 17 janvier 1991, a été négative pour tous les points échantillonnés dans la Vanlée, aussi bien en amont qu'en aval du havre.

Cette recherche a été de nouveau réalisée les 1<sup>er</sup>, 3, 8 et 9 avril dans l'eau à la sortie des deux havres. Elle s'est révélée positive le 1<sup>er</sup> et 9 avril (fig. 14) pour le havre de Regnéville. Les concentrations étaient de l'ordre de 1 à 10 UFC/litre. Les prélèvements d'eaux étaient réalisés au niveau de l'épi de Regnéville-sur-Mer (havre de Regnéville). Aucune salmonelle n'a été trouvée dans le havre de la Vanlée.

## 2. Etude de la contamination des eaux côtières (entre Granville et l'embouchure du havre de Regnéville)

Une cinquantaine de mesures ont été réalisées les 1<sup>er</sup> et 8 avril 1991 dans les eaux côtières entre Granville et le havre de Regnéville (fig. 16). La localisation des points s'est faite avec un système radioélectrique (Motorola) installé à bord de l'embarcation.

### . Radiale du 1<sup>er</sup> avril 1991 - Vives eaux

Les prélèvements ont eu lieu entre la pleine mer (8 h 18) et la basse mer (15 h 19). Le débit des rivières était faible : le Boscq : 0,23 m<sup>3</sup>/s ; la Vanlée : 0,113 m<sup>3</sup>/s ; les Hardes : 0,07 m<sup>3</sup>/s ; la Soulle : 0,7 m<sup>3</sup>/s ; la Sienne : 3,95 m<sup>3</sup>/s.

Les mesures à **pleine mer** (fig. 16) montrent une grande homogénéité de la masse d'eau dans toute la zone étudiée avec des salinités de l'ordre de 35,25 ‰ aux alentours de Granville, diminuant très légèrement à l'approche du havre de Regnéville (34,60 ‰) ; les teneurs en matières en suspension suivent le même schéma : leur concentration est faible (4 à 9 mg/l) dans les eaux les plus salées et s'élève près du havre (20 à 25 mg/l) sous l'influence des eaux douces.

A **basse mer** une très légère influence de l'apport du havre de Regnéville se fait sentir dans la zone de son embouchure sans modification notable des salinités dans l'ensemble de la côte ; les eaux légèrement dessalées restent confinées à l'ouverture de ce havre et une très légère stratification verticale des eaux est alors observée : 33,80 ‰ en surface, 34,45 ‰ à deux mètres sous la surface, le fond étant à 35 ‰ ; les teneurs en matières en suspension restent du même ordre de grandeur que celles observées à pleine mer ; seules les dessalures locales s'accompagnent d'une légère remontée des turbidités.

En ce qui concerne les résultats **bactériologiques**, on ne distingue pas de tache de pollution que ce soit à pleine mer ou à basse mer en face des havres (fig. 16). De plus, le rejet du Boscq est circonscrit à la côte sud de la pointe du Roc et ne s'étend pas vers le large.

### . Radiale du 8 avril 1991 - Mortes eaux (coefficient de marée : 29)

Les prélèvements se sont fait entre la pleine mer (plus ou moins 2 heures) et la basse mer (plus ou moins 3 heures). Les débits des rivières étaient sensiblement les mêmes que le 1<sup>er</sup> avril. Débits : le Boscq : 0,21 m<sup>3</sup>/s ; la Vanlée : 0,15 m<sup>3</sup>/s ; les Hardes : 0,09 m<sup>3</sup>/s ; la Soulle : 0,68 m<sup>3</sup>/s ; la Sienne : 3,67 m<sup>3</sup>/s.

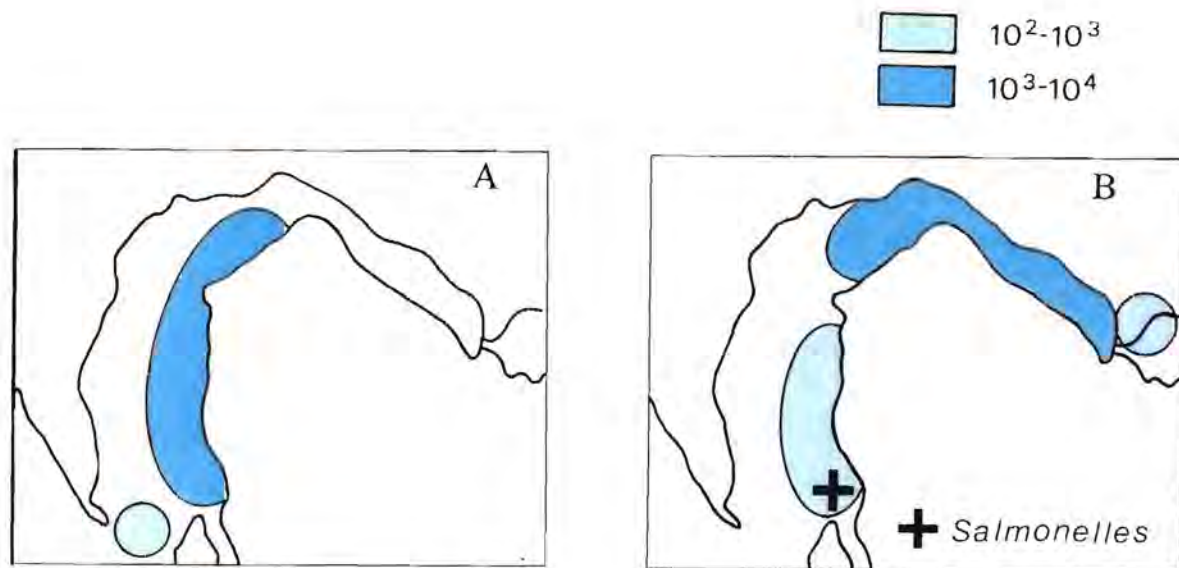


Figure 15a : Qualité bactériologique des eaux du havre de Regnéville, à basse mer -  
2 avril 1991 (A) et 9 avril 1991 (B).  
Coliformes thermotolérants. Exprimés pour 100 ml.  
+ présence de Salmonelles

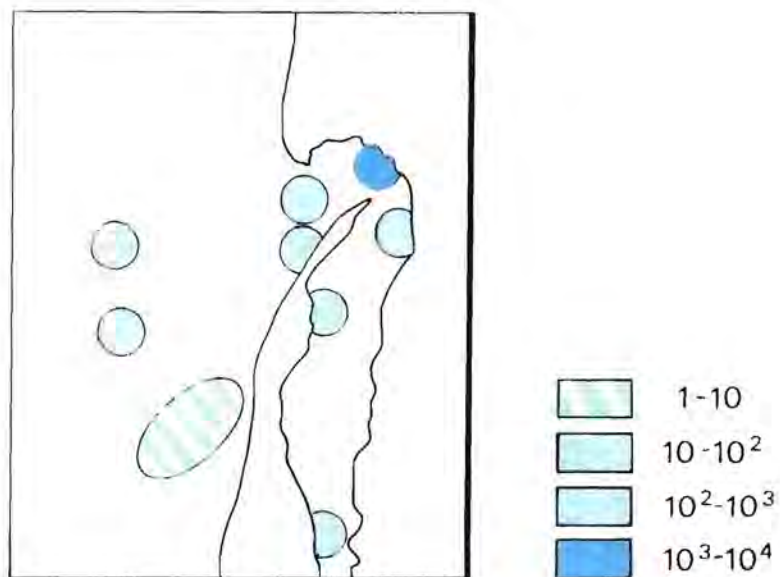


Figure 15b : Qualité bactériologique des eaux du havre de la Vanlée, basse mer -  
17 janvier 1991. Coliformes thermotolérants. Exprimés pour 100 ml.

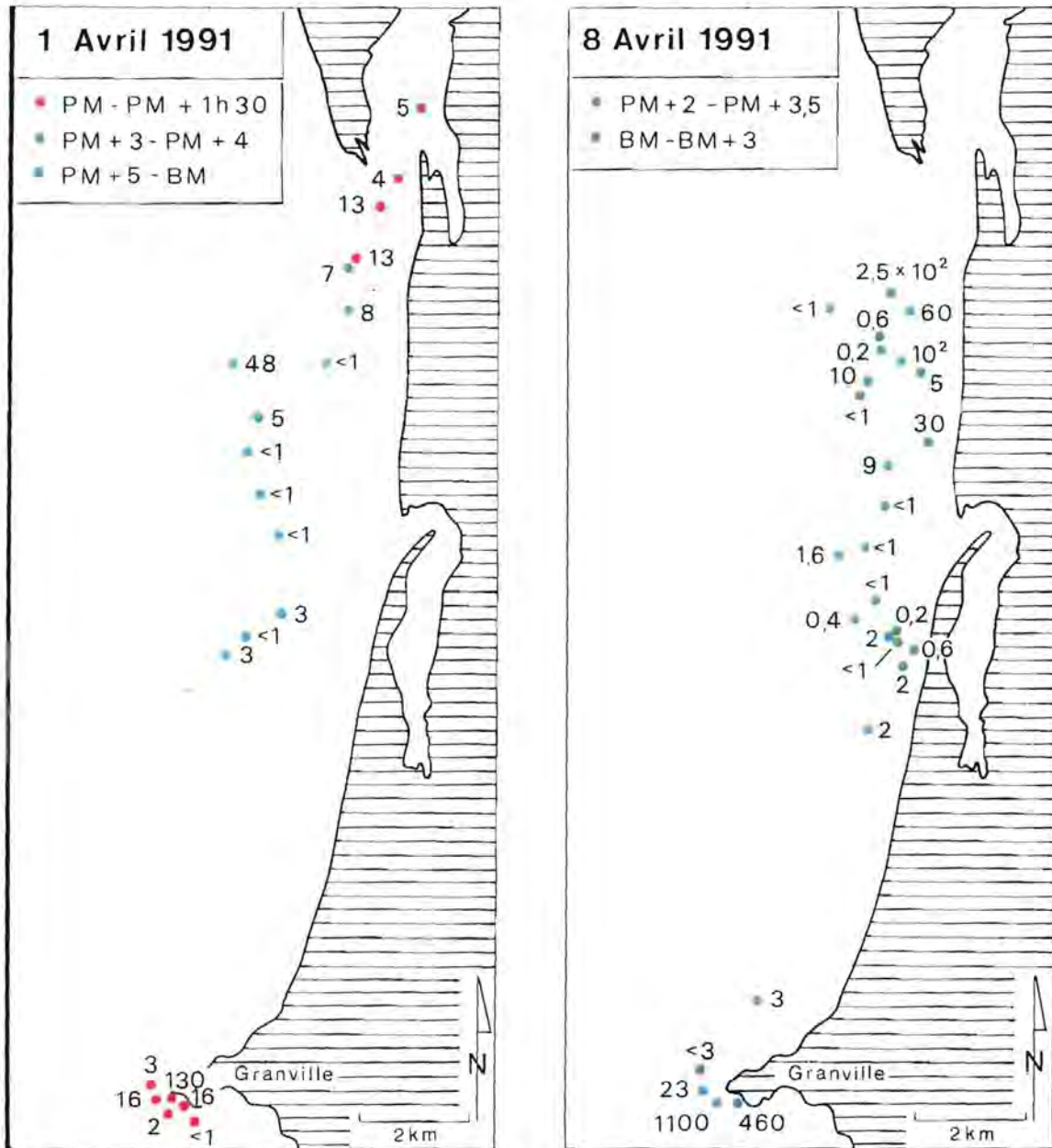


Figure 16 : Qualité bactériologique des eaux côtières. Radiales des 1er et 8 avril 1991. Coliformes (D 42°). Exprimés pour 100 ml.

Les mêmes observations générales que lors des vives eaux peuvent être faites : la salinité est en moyenne homogène (34,50 ‰ à 34,90 ‰) dans la zone d'étude ; les dessalures sont limitées à l'embouchure du havre de Regnéville et sont légèrement plus marquées que le 1<sup>er</sup> avril (30 à 31 ‰ valeurs minimales, contre 33,80 ‰ en vives eaux) ; les conditions de mélanges différentes entre les vives eaux et mortes eaux ou une légère augmentation des débits le 5 avril pourraient expliquer ces différences. Cependant, les variations de salinité restent très limitées. Il en est de même aux alentours du rejet du Boscq où la salinité a légèrement baissé ; l'impact géographique n'est pas mesurable par nos techniques d'analyses.

Par contre, entre les vives eaux et les mortes eaux, il s'est produit une légère remontée des turbidités dans toute la zone étudiée (celles-ci variant de 10 à 42 mg/l dans les zones les plus turbides).

En ce qui concerne les **résultats bactériologiques**, on observe une contamination restreinte s'étendant entre les deux havres, notamment en bactéries fermentant le lactose sur milieu de Drigalski incubé à 42 °C (fig. 16). Ces concentrations sont plus élevées que celles des coliformes thermotolérants certainement stressés et plus difficilement cultivables à une température de 44 °C (données non figurées sur la carte). Cette zone de contamination limitée, est visible aussi bien au jusant qu'au flot.

Les niveaux de contamination étant très faibles (< 10 UFC/100 ml) sauf à proximité du rejet du Boscq et de l'embouchure du havre de Regnéville, il est difficile de trouver une relation entre la légère remontée de la turbidité et les niveaux de coliformes D42 (la corrélation entre les deux paramètres n'est pas significative).

### 3. Conclusion

Pendant l'étude, l'absence d'apport d'eau douce se traduit pour les eaux côtières par une qualité d'eau acceptable sur le plan bactériologique, néanmoins à basse mer les havres apportent jusque dans les chenaux des eaux douces à peine diluées, parfois très contaminées, qui peuvent baigner les zones de bouchots. La carte bathymétrique, dressée sur ce secteur (L'Yavanc, 1992) indique les principaux chenaux empruntés par ces écoulements ; ces chenaux oscillent d'une année à l'autre en fonction des conditions hydrodynamiques et des houles. Enfin, comme dans certains prélèvements d'eau douce, la présence de salmonelles dans l'eau a été mise en évidence au débouché du havre de Regnéville alors que les recherches se sont avérées négatives sur la Vanlée. Cette présence si elle était confirmée pourrait être très pénalisante pour les parcs conchylicoles situés à proximité.



INSTITUT GÉOGRAPHIQUE NATIONAL – 136bis Rue de Grenelle – Paris (VII<sup>e</sup>)

Figure 17 : La rade de Brest

### III - RADE DE BREST

La rade de Brest située à l'extrême pointe de la Bretagne a une superficie d'environ 180 km<sup>2</sup> : cette baie fermée à l'ouest par un goulet de 1,8 km de large, est soumise à une marée de type semi-diurne dont l'amplitude moyenne est de 4,6 m en coefficient 75 et de 7,40 m en coefficient 119. Les principales caractéristiques de la rade ont été décrites dans les rapports IFREMER (1989), Pommepeuy (1987), CNEXO (1978). Les minima de températures (7-8 °C) sont observés en fin février et les maxima (19 °C) en juillet. La salinité y est très variable et dépend du débit des rivières et du coefficient de marée qui régule les mélanges. Ainsi une salinité maximale de 35 ‰ est observée en été, tandis qu'en hiver dans la partie nord des dessalures dues à l'Elorn peuvent être mesurées : salinités inférieures à 30 ‰ (L'Yavanc, 1984) ; les teneurs en matières en suspension peuvent être supérieures à 15 mg/l lors des crues. Les temps de renouvellement des eaux dans la rade de Brest ont été estimés à 10-15 jours en hiver et à 30-35 jours en été (CNEXO-DDE, 1980).

#### 1. Distribution des concentrations bactériennes

##### 1.1. Variations spatiales

La répartition horizontale étudiée lors des campagnes (février et mars 1981) met en évidence le rôle des différents apports, en particulier ceux des rejets de la station d'épuration de la ville de Brest, de l'Elorn et, dans une moindre mesure, des ruisseaux du Vallon et du Costour.

Les cartes jointes (fig. 18a) illustrent deux situations extrêmes, mesurées à une semaine d'intervalle. Après une crue de l'Elorn et une période de clapot (du 1 au 7 mars 1981) on note une forte contamination des eaux et l'impact des rejets des trois émissaires.

##### 1.2. Variations temporelles

Les variations temporelles des coliformes thermotolérants ont été mesurées à quatre points du site pendant un cycle de marée ; les résultats (fig. 18b) montrent :

- l'extrême variabilité de la qualité des eaux sur des périodes assez courtes (points 1 et 17) : le maximum de contamination est observé en début de journée (entre 6 et 9 heures du matin) ;

- le niveau plus faible des concentrations issues de l'Elorn qui varient en fonction de la marée (point 8) et qui influencent la partie aval de l'estuaire, notamment à basse mer.

- la contamination, aux alentours de la pleine mer, dans la rade (point 19) due aux rejets de la station d'épuration.

#### 2. Etude des relations entre les bactéries et les paramètres physico-chimiques

L'étude des relations entre les germes-tests de contamination fécale et les paramètres physico-chimiques montre une différence entre les campagnes estivales et les campagnes hivernales.



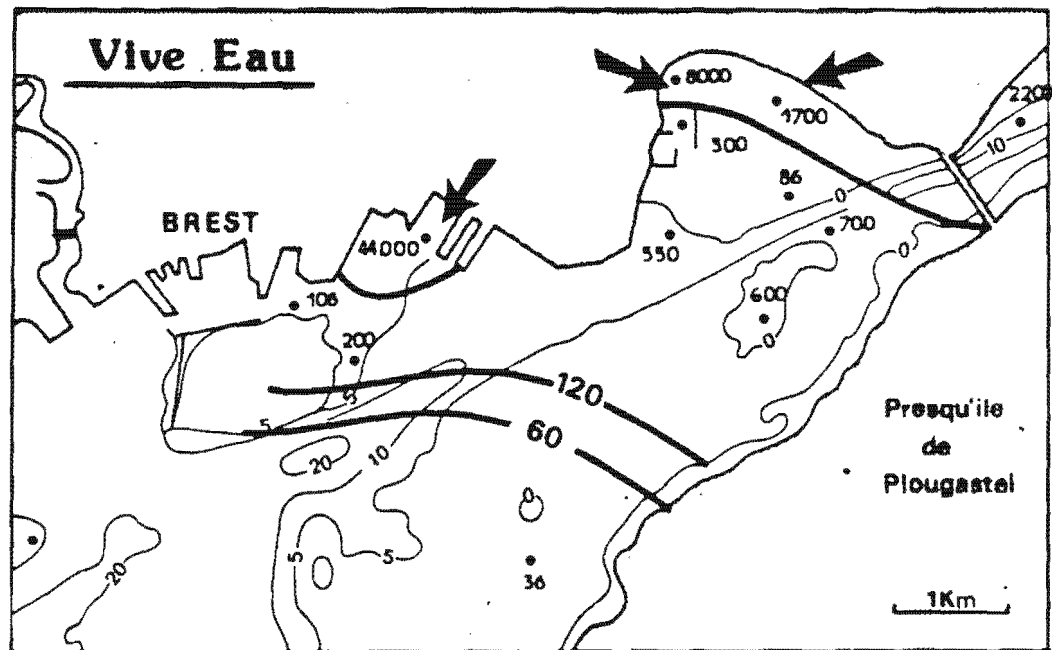
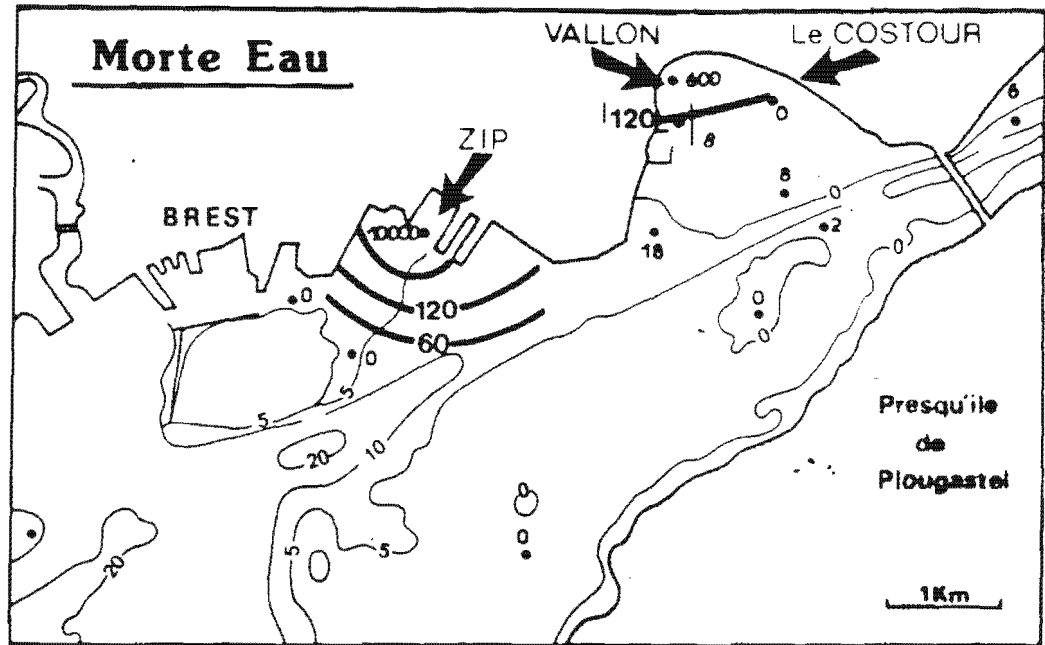


Figure 18a : répartition des coliformes thermotolérants (CF/100 ml) à basse mer en mortes eaux (26-28 février 1981) et vives eaux (7-9 mars 1981)

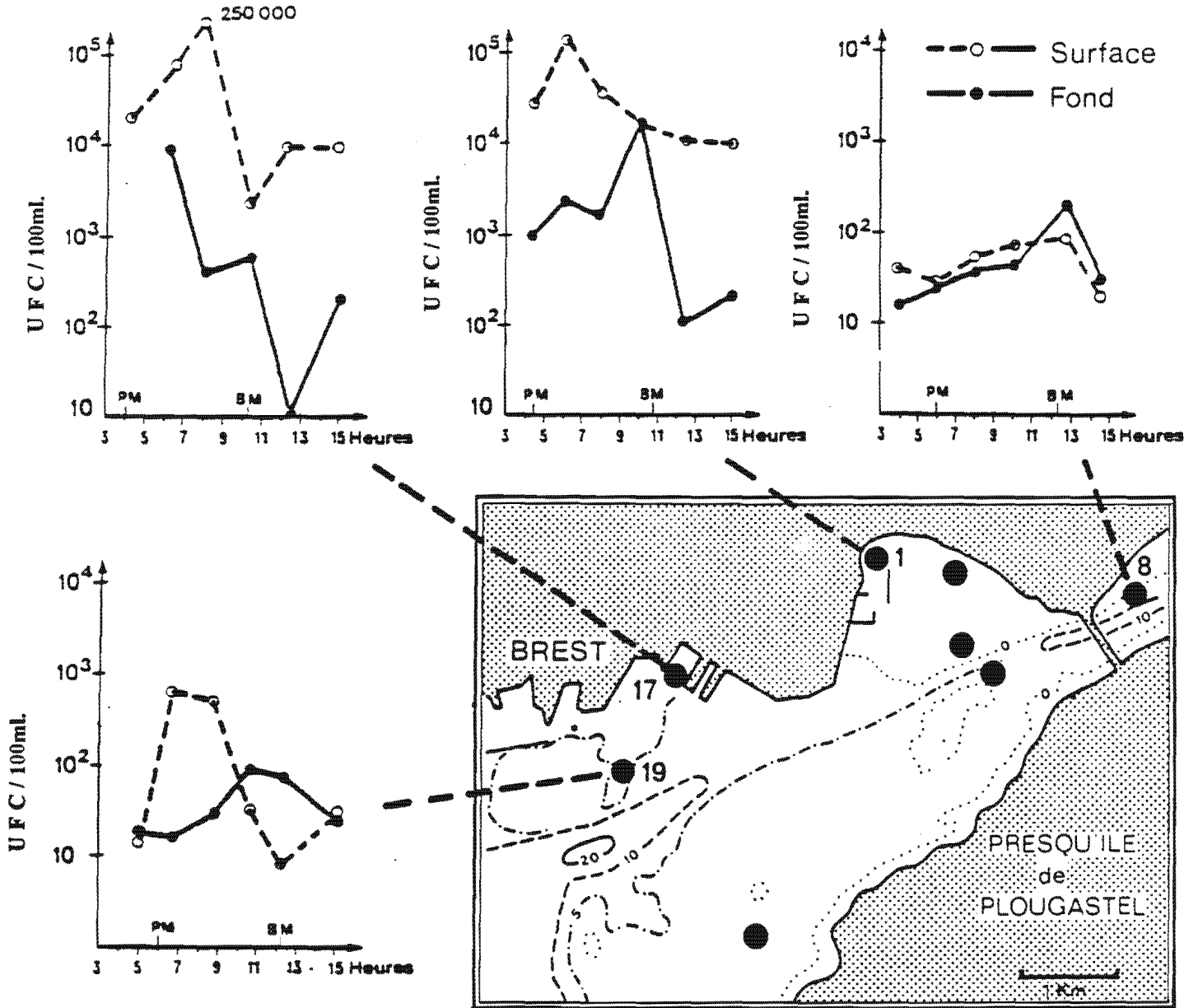


Figure 18b : Variations des coliformes thermotolérants (CF) au cours de la marée en quatre points caractéristiques (juin 1980 - Vive eau).

a) *En été* : il n'existe aucune relation satisfaisante entre ces paramètres : les sels nutritifs sont largement consommés par le phytoplancton. D'autre part, le débit des rivières étant faible, il est difficile de mettre en évidence des relations avec la salinité. Enfin, les matières en suspension (organiques ou non) ne sont pas explicatives des valeurs trouvées pour les germes-tests.

b) *En hiver* : les relations avec les **éléments dissous** (chlorures, sels nutritifs) sont, d'une manière générale, meilleures, en particulier lorsque le milieu est bien mélangé (en vives eaux).

- **Les relations avec la salinité** mettent en évidence l'existence de deux sources distinctes de germes-tests : d'une part les apports des rivières (points 8, 1 et 2) et, d'autre part, le rejet nettement plus important de la station d'épuration (point 17) (fig. 19).

- **Les relations avec l'ammonium** ( $\text{NH}_4$ ) sont également significatives en vives eaux l'hiver (fig. 19). On note une anomalie en coliformes thermotolérants au fond, à la station 17, correspondant à des valeurs également élevées en carbone organique particulaire (fig. 20), ce qui traduit l'augmentation des teneurs en matière organique des particules dans le champ proche du rejet.

Les corrélations entre la **turbidité et les coliformes thermotolérants** ne sont généralement pas significatives, sauf pour la campagne de mars 1981, où l'augmentation générale de la turbidité dans la zone d'étude, due aux remises en suspension par le clapot, aux courants de vives eaux et aux apports de l'Elorn correspond à une augmentation des valeurs en germes-tests de contamination fécale (fig. 21).

### 3. Etude des corrélations entre les germes-tests

L'étude des corrélations entre les germes-tests a été réalisée systématiquement pour toutes les campagnes. L'intérêt des coliformes totaux comme témoins de contamination fécale étant parfois remis en question, il était intéressant d'analyser les corrélations obtenues avec les autres germes tests. Cette étude a été faite en utilisant le logarithme des valeurs, car les numérations présentent des variations très importantes. D'une manière générale, les germes-tests sont très bien corrélés entre eux.

a) *Relations entre les coliformes thermotolérants (CF) et les coliformes totaux (CT)*

Les corrélations sont de la forme :  $\log \{CT\} = a \log \{CF\} + b$   
avec r : coefficient de corrélation

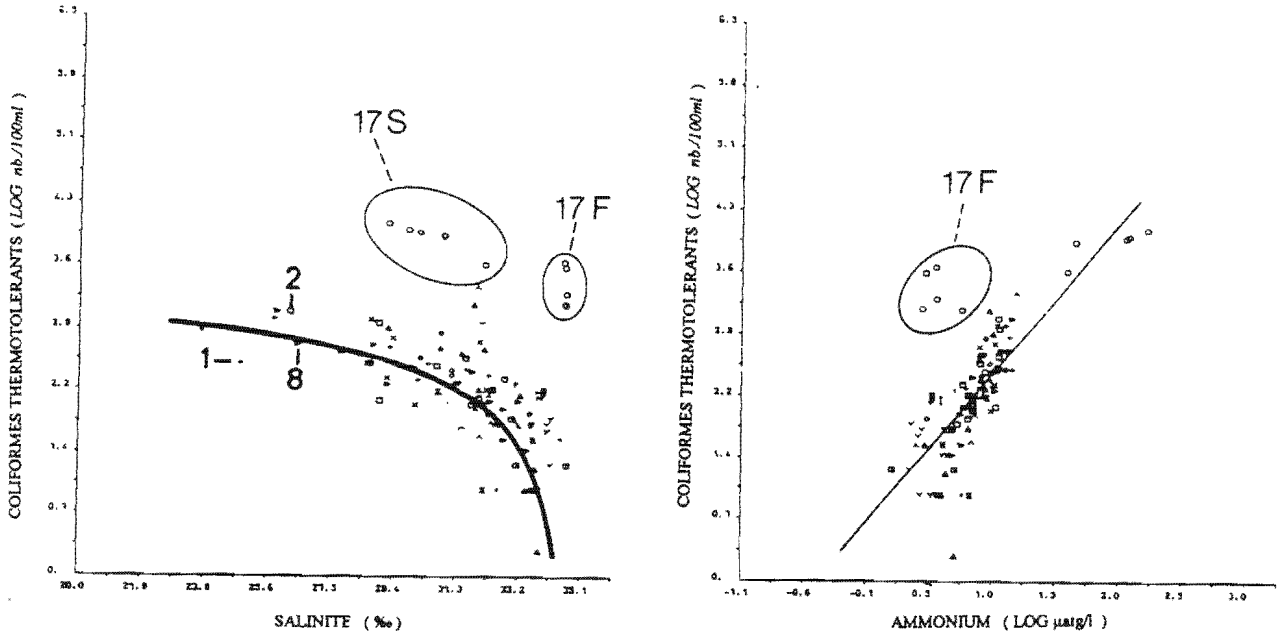


Figure 19 : relations entre les coliformes thermotolérants, la salinité et l'ammonium (novembre 1980 - vives eaux).

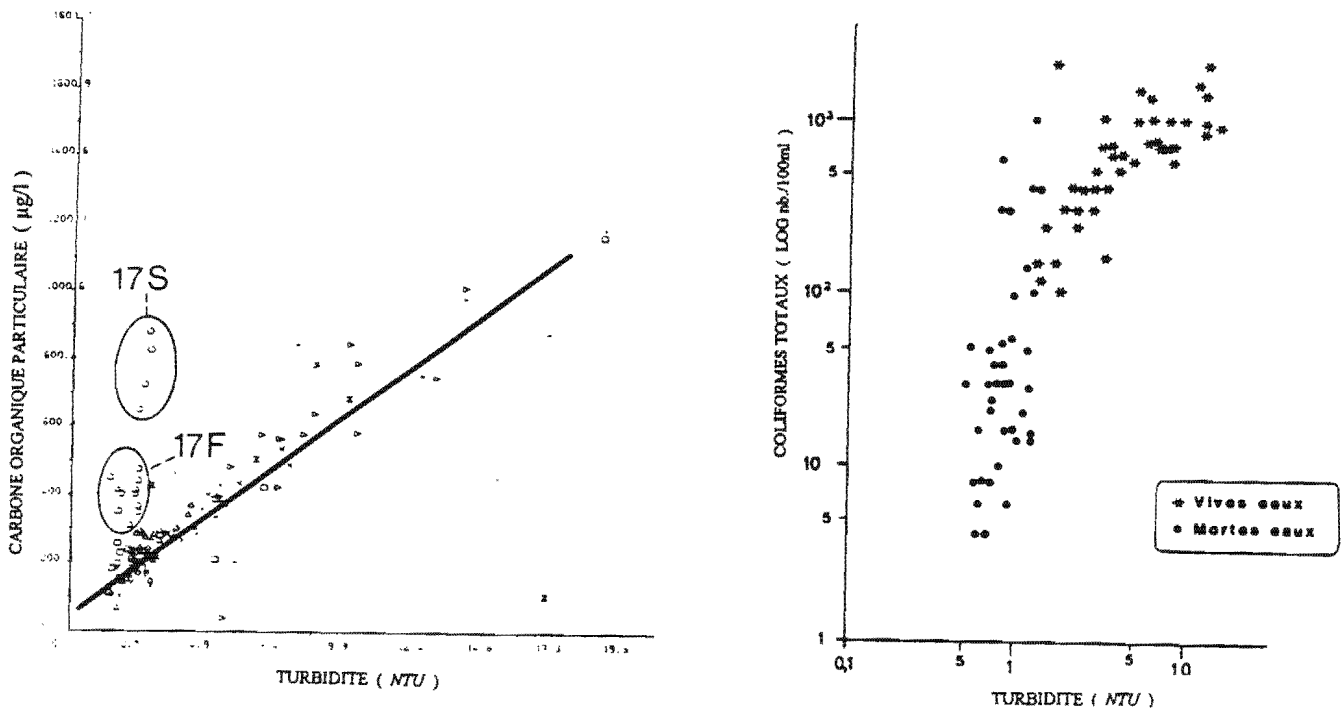


Figure 20 : Relation entre la turbidité et le carbone organique particulaire (novembre 1980 - Vives eaux)

Figure 21 : Relation entre la turbidité et les coliformes thermotolérants (février - mortes eaux - mars - vive eau - 1981)

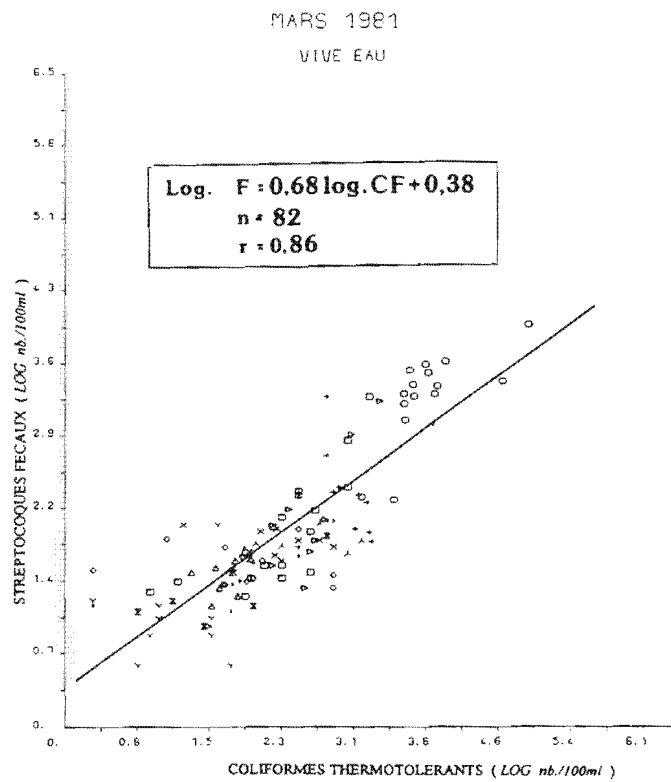


Figure 22 : Relation entre coliformes thermotolérants et coliformes streptocoques fécaux.

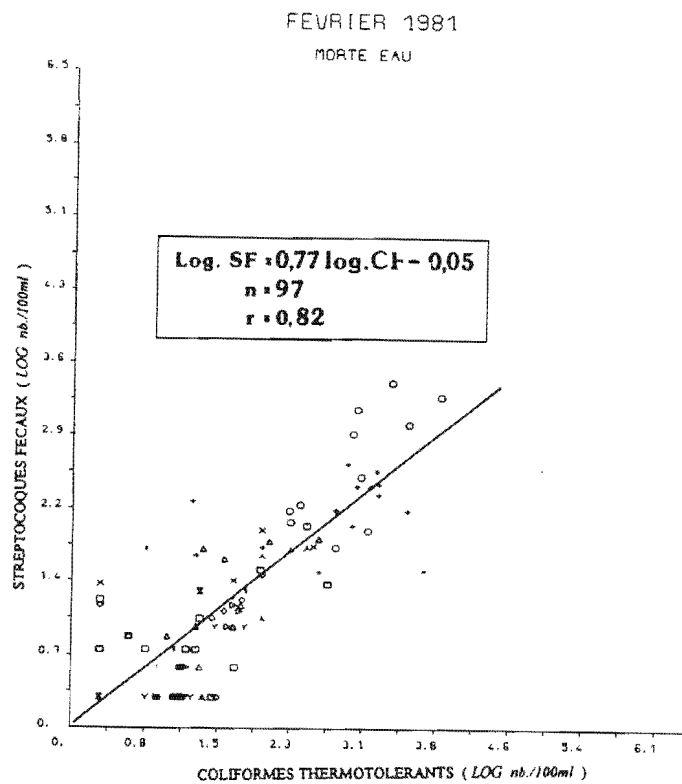


Figure 23 : relation entre coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux.

Les corrélations obtenues sont hautement significatives à chaque campagne, puisque le coefficient de corrélation varie de 0,83 à 0,93 pour un nombre de couples minimal de 82 (154 au maximum).

D'autre part, la pente varie peu d'une campagne à l'autre :  $a$  est compris entre 0,90 et 1,25.

*b) Relations entre coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux (fig. 22, 23)*

Ces deux germes-tests sont également corrélés entre eux de façon significative. Le coefficient de corrélation varie de 0,64 à 0,87 pour un nombre de couples minimal de 82 (158 au maximum).

Les équations sont de la forme :  $\log \{SF\} = a \log \{CF\} + b$   
 $r$  est le coefficient de corrélation

Le tableau 12 récapitule la valeur trouvée pour  $a$ ,  $b$  et  $r$  pour chaque campagne :

Campagne	$a$	$b$	$r$
Juin 1980 - ME	0,75	- 0,32	0,87
Juin 1980 - VE	0,74	- 0,08	0,76
Nov. 1980 - ME	0,70	0,16	0,73
Déc. 1980 - VE	0,67	0,30	0,64
Fév. 1981 - ME	0,77	- 0,05	0,82
Mars 1981 - VE	0,68	0,38	0,86

**Tableau 12 : Corrélations entre coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux - Rade de Brest**

La dispersion des points est plus importante en été (en juin mortes eaux) et, pour les faibles valeurs de streptocoques fécaux, on peut observer de très fortes variations des coliformes thermotolérants.

En hiver, la majorité des points est regroupée sauf quelques prélèvements venant des rejets de la ZIP et du Moulin Blanc qui présentent un rapport SF/CF très élevé (d'où la diminution du coefficient de corrélation en décembre).

L'augmentation du nombre de streptocoques fécaux peut être expliquée par des lessivages du réseau urbain lors des pluies.

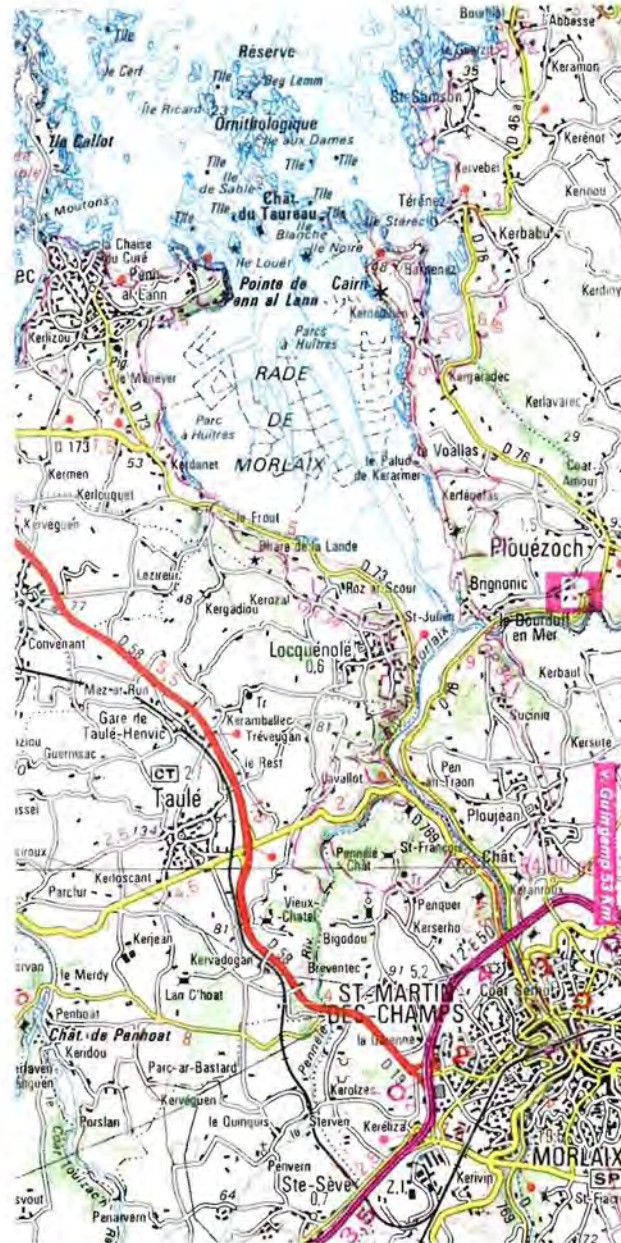
#### 4. Conclusions

La partie nord de la rade de Brest est dominée par deux sources principales de contamination fécale : l'Elorn et le rejet de la station d'épuration de la ville de Brest.

**Les apports de l'Elorn** prédominent surtout à basse mer de vives eaux et pendant les périodes pluvieuses où des concentrations élevées associées à des déssalures sont alors mesurées jusque dans la partie sud ouest du site. Ces apports et la dynamique du site provoquent de grandes fluctuations journalières de la qualité des eaux sur les zones de concessions ostréicoles situées au nord de la presqu'île de Plougastel.

**Le rejet de la station d'épuration** a un impact plus limité dans l'espace que celui de l'Elorn. Des contaminations non négligeables sont observées sur environ 2 km autour du rejet. A cet endroit les concentrations en bactéries fécales restent très élevées.

**L'étude de corrélations entre les coliformes thermotolérants, coliformes totaux et streptocoques fécaux** montre que ces paramètres sont très liés et donc qu'il n'est pas nécessaire de les analyser ensemble systématiquement. La variation du rapport coliformes thermotolérants/streptocoques fécaux pourrait être intéressantes à approfondir.



Echelle 1 / 100 000



INSTITUT GÉOGRAPHIQUE NATIONAL - 136bis Rue de Grenelle - Paris (VII<sup>e</sup>)

Figure 24 : L'estuaire de Morlaix



#### IV - ESTUAIRE DE MORLAIX

Situé sur la côte nord de la Bretagne, l'estuaire de Morlaix est soumis à des marées de forte amplitude (5,9 m en coefficient moyen (75) et 7,2 m en vives eaux (119)). L'hydrodynamique est très influencée par la marée et la morphologie de la baie, et régit les mélanges eau douce - eau de mer qui conditionnent la dispersion des contaminants bactériens dans la baie. L'estuaire a deux parties distinctes (L'Yavanc, 1987) :

**La partie amont**, de 5,5 km de long ou rivière maritime, très peu profonde (3 m au dessus du zéro en amont) très étroite, est bordée de larges vasières qui découvrent à marée basse ; le chenal est alors très étroit (une dizaine de mètres environ de large) avec des profondeurs très faibles (inférieures au mètre). A pleine mer, la partie inondée forme un chenal d'une centaine de mètres de large. En amont, les eaux du Jarlot et du Queffleuth se rejoignent et forment la rivière de Morlaix. Un bassin à flot retient les eaux douces et le débit moyen annuel de la rivière est de 3 m<sup>3</sup>/s.

**La partie aval**, longue de 5 km, large au maximum de 3 km et resserrée à son embouchure (2 km) est en contact avec la mer. Au milieu de la baie, un étroit chenal de plus de 10 m de profondeur sépare les bancs sablo-vaseux sur lesquels l'ostréiculture s'est implantée. Les parcs peuvent découvrir totalement lors des marées basses de vives eaux.

Des campagnes de prélèvements ont été réalisées de 1986 à 1988, couvrant diverses conditions saisonnières et hydrodynamiques ; **en été** : mortes eaux (1<sup>er</sup> juin 1986 - 3 juin 1987), vives eaux (23 juin 1986 - 12 juin 1987) ; **en hiver** : mortes eaux (15 octobre 1987, 23 mars 1988), vives eaux (23 octobre 1987 - 17 mars 1988). Les points de prélèvements sont reportés sur la figure 24. Les eaux ont été échantillonnées autour de la basse mer et de la pleine mer ( $\pm 1$  heure), en surface (20 cm sous la surface) et au fond (1 m au dessus du fond). Les résultats concernant la salinité et les coliformes (isolés sur D42) sont reportés sur la figure 24.

##### 1. Contamination des eaux en mortes eaux

On constate jusqu'au point 3, une contamination très élevée ( $> 5.10^4$  UFC/100 ml) correspondant à de faibles salinités ( $< 10$  ‰). A **pleine mer** de fortes variations de salinité (environ 20 ‰) sont observées entre la surface et le fond dans cette partie amont, tandis que des variations significatives en coliformes sont également mesurées sur la verticale. Il s'agit d'une situation typiquement estuarienne, où, à pleine mer, une masse d'eau marine salée et peu contaminée, pénètre par le fond, tandis que les eaux douces ou faiblement salées, plus légères s'écoulent en surface. En aval du point 3, du fait de l'élargissement du chenal, les eaux deviennent très marines (point 4  $\approx 30$  ‰), les concentrations bactériennes diminuent ; il n'existe plus de stratification surface-fond. Au point 7, situé en aval, à l'embouchure de la baie, les numérations sont inférieures à 14 UFC/100 ml.

La situation à **basse mer** est moins tranchée, et l'augmentation de la salinité est progressive de l'amont vers l'aval. Les coliformes évoluent en sens inverse : diminution progressive des numérations due à l'effet de la dilution ; la différence surface-fond n'est pas significative.

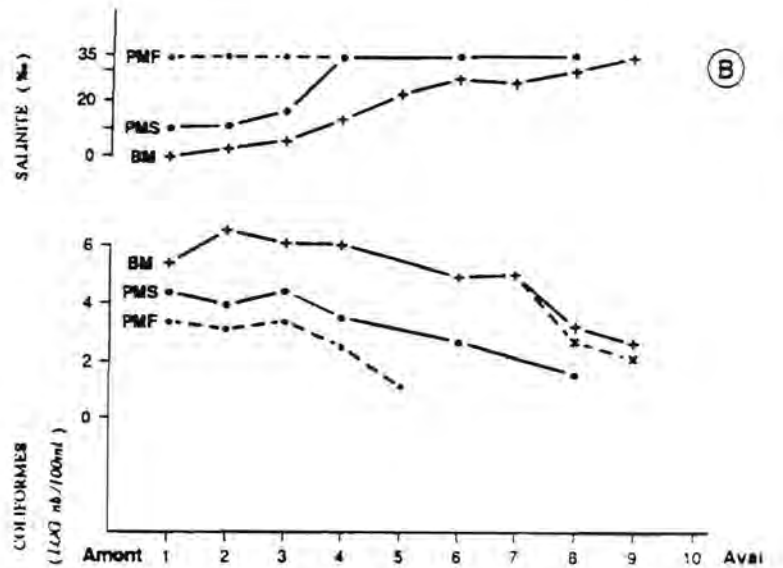
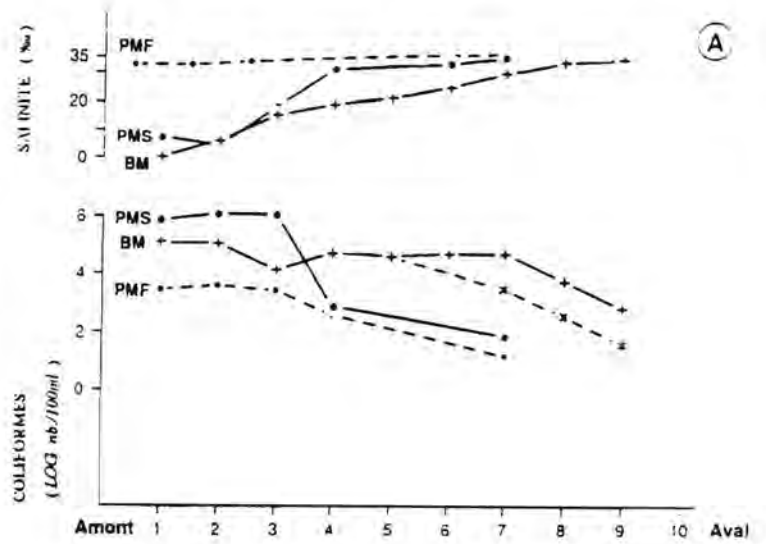
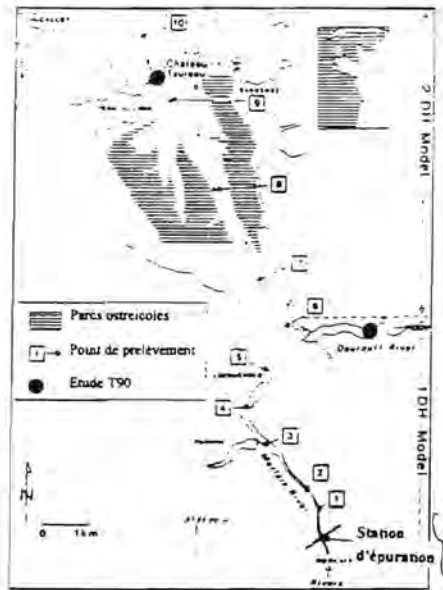


Figure 24 : estuaire de Morlaix : évolution des salinités et des coliformes (D42) en mortes eaux (A) et vives eaux (B) surface - fond.

COLIFORMES THERMOTOLERANTS (LOG nb./100ml)

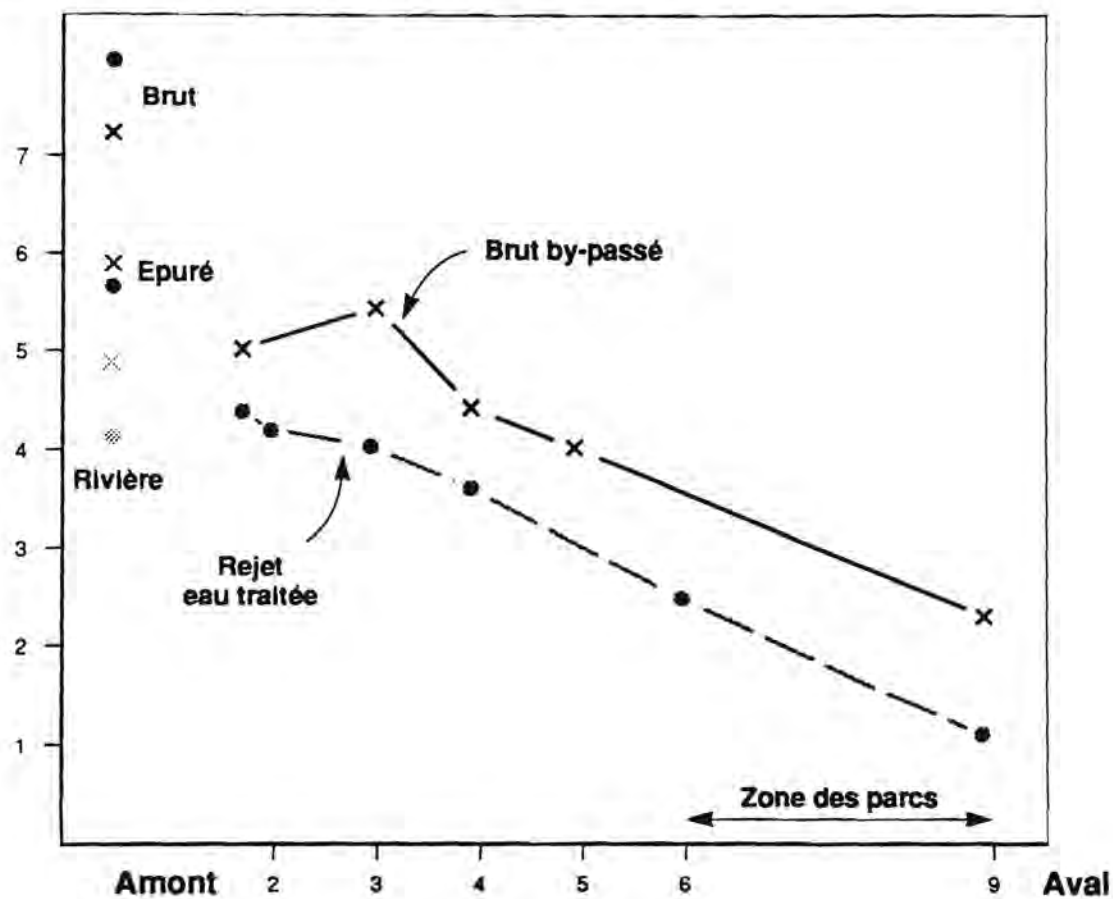


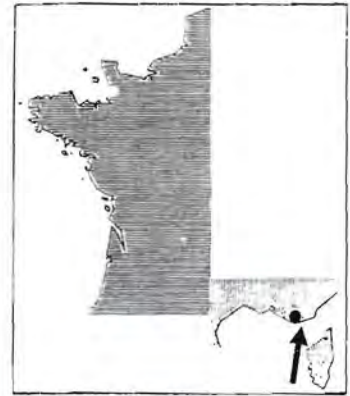
Figure 25 : Estuaire de Morlaix : situation de vives eaux influence de la qualité des apports sur la qualité des eaux au niveau des parcs à huîtres. x 11 janvier 1993 (rejet brut) ; ● 2 novembre 1993 (rejet traité sans by-pass de brut).

## 2. Contamination des eaux en vives eaux

On retrouve un schéma très voisin : à **pleine mer**, en amont du point 4, les eaux sont très contaminées, très dessalées et très fortement stratifiées sur la verticale. A l'aval les eaux sont plus marines et nettement moins contaminées. A **basse mer**, par contre, des concentrations bactériennes très élevées ( $10^4$  UFC/100 ml) sont observées jusque très en aval (point 7). Lors de l'évacuation des eaux douces à basse mer, les contaminants peuvent alors atteindre les zones ostréicoles. Les mêmes résultats sont obtenus avec les numérations en coliformes thermotolérants : le niveau requis pour la qualité des eaux ostréicoles (300 CF/100 ml) est alors largement dépassé lors des basses mers de vives eaux. Ces contaminations sont très voisines de celles observées en vives eaux.

## 3. Conclusion

L'effet du rejet d'eaux usées brutes sur la qualité des eaux de la baie de Morlaix est important. Sur la figure 25 deux situations de vives eaux sont reportées (nov. 1983 - Janv. 1983). En novembre, la station d'épuration traite tout le volume d'eaux usées avec un rendement supérieur à 95 % puisque les eaux épurées présentent une numération en coliformes thermotolérants de l'ordre de  $10^6$  UFC/100 ml (alors que l'eau brute était à des valeurs très supérieures à  $10^7$  UFC/100 ml). Dans ce cas, le rejet d'eau traité, mélangé à l'eau de mer, permet d'obtenir en aval du point 6 (limite des parcs) des valeurs inférieures à  $10^2$  UFC/100 ml. En janvier du fait des fortes pluies, une partie des eaux brutes est by-passée. Ces eaux de contamination très élevée ( $\approx 10^7$  UFC/100 ml) provoquent dans l'estuaire, pour la même situation de jusant, une remontée de la contamination fécale d'au moins 1 logarithme décimal ; dans ce cas les eaux au niveau des parcs ne respectent plus les critères de qualité requise ; on note sur ce schéma que l'eau de la rivière de Morlaix varie entre  $10^4$  UFC/100 ml et  $10^5$  UFC/100 ml de coliformes thermotolérants, le maximum étant atteint lors de pluies de janvier. La contamination de la rivière de Morlaix est trop faible pour être rendue responsable de fortes contaminations observées en aval (Salomon et Pommepuy, 1991).



Echelle 1/100 000



INSTITUT GÉOGRAPHIQUE NATIONAL — 136bis Rue de Crevelle — Paris (VII<sup>e</sup>)

Figure 27 : la rade de Toulon

## V - LA BAIE DE TOULON

Le travail réalisé sur la baie de Toulon a donné lieu à différents rapports (Fondation Océanographique Ricard, 1990 ; Thouvenin, 1991) dont nous reportons ici les principaux résultats à titre comparatif des sites présentés précédemment. Cette baie est située dans une région caractérisée par de très faibles marnages (10 cm en moyenne, le maximum étant de 30 cm) et un régime de courants faibles généralement dominé par le vent : les courants dans la baie sont de 18 cm/s en moyenne avec des maxima enregistrés de 55 cm/s (Thouvenin, 1991). Les salinités sont élevées (37,7 à 38,4 ‰) et les températures en été peuvent atteindre en surface 20 °C.

Cette région est caractérisée par la présence, l'été d'une stratification verticale des eaux qui n'est pas sans conséquence sur la diffusion des rejets ; l'hiver, les eaux sont homogènes de la surface au fond aussi bien en température qu'en salinité.

Sur la côte méditerranéenne, pour pallier au manque de courant et pour augmenter la dilution des rejets, l'option est souvent prise de rejeter les eaux usées par des émissaires assez longs immergés à des profondeurs importantes ; par ailleurs, des diffuseurs situés à l'extrémité des émissaires permettent d'augmenter la dilution des eaux usées.

Ainsi, le rejet principal de la ville de Toulon se déverse par un émissaire long de 1,8 km situé dans la baie à 43 m de fond ; le débit moyen est de l'ordre de 650 m<sup>3</sup>/h avec des pointes lors des orages de 2 000 m<sup>3</sup>/h alors qu'en été le débit est limité à 450 m<sup>3</sup>/h.

### 1. Dilution des eaux usées

Plusieurs campagnes réalisées dans le cadre du programme "Rejet Urbain en Mer" (Fondation Océanographique Ricard, 1990) ont permis d'apprécier, puis de modéliser (Thouvenin, 1991) la dispersion des eaux usées dans la baie de Toulon lors des différentes conditions de mélange (simulation de "cas types" de rejet). B. Thouvenin considère deux étapes principales au cours du rejet :

- **la remontée du jet en surface** : elle se fait lorsque les eaux sont homogènes : soit 60 % du temps où l'on constate des différences de température entre la surface et le fond inférieures à 1,5 °C ; l'estimation de la dilution au cours de cette phase est de l'ordre de 1/100, les temps de remontée étant très courts (2-3 mn), seule la dilution physique interviendrait pour diminuer le nombre de bactéries fécales. En été (plus généralement à partir d'avril jusqu'en septembre), lorsque la stratification des eaux est bien établie, les eaux usées restent bloquées à 10 ou 20 m sous la surface. Les conditions de ce blocage et le positionnement de la tache dépendent des conditions locales au moment de l'émission (profondeur et épaisseur de la thermocline) ; le vent, en particulier le mistral, peut détruire cette stratification. On observe alors des remontées d'eaux plus froides ainsi que des bouffées de pollution.

- **L'étalement de la tache** - en surface pendant la période homogène, sous la surface pendant les périodes de thermocline - est principalement conditionnée par le vent ; durant cette phase, dilution physique et mortalité interviennent et déterminent l'étendue du nuage contaminé.

## 2. Résultats du modèle (Thouvenin, 1991)

Les figures résument les conditions de mélange que l'on peut rencontrer et leur effet sur la qualité des eaux :

- lorsque les eaux sont homogènes et le courant faible (fig. 27a), la dilution se fait autour du point d'émission en surface ; les simulations ont été réalisées pour des concentrations initiales en coliformes thermotolérants de  $10^6$  et  $10^7$  UFC/100 ml. La limite maximale de 2 000 CF/100 ml - norme de baignade - atteinte à 8 h du matin, est reportée sur la figure. Lorsque le vent est tournant, la tache est située au sud du point d'émission. Lorsque le courant est dû au mistral, la tache est déportée au sud-est. La cinétique de disparition bactérienne est simulée pour une concentration initiale de  $10^7$  UFC/100 ml et une intensité lumineuse qui varie pendant la journée : en fonction de l'heure le nuage dans l'eau s'étale sur 1 ou 2 km, à midi il est limité à 500 m d'extension. Lorsque la concentration initiale n'est que de  $10^6$  UFC/100 ml, l'étendue du nuage est nettement plus restreinte.

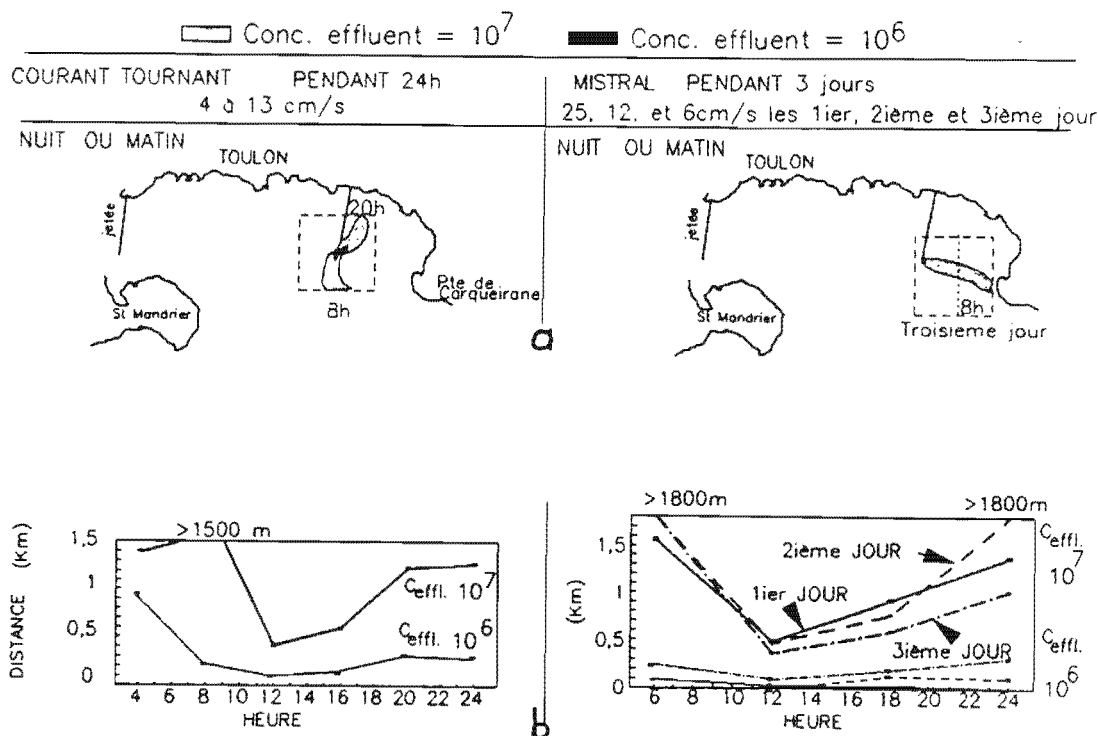


Figure 27a : a) limites du nuage de surface pour les coliformes thermotolérants. Période homogène pour deux types de situations courantologiques (la limite est donnée par la norme de baignade de 2 000 CF/100 ml). L'intensité lumineuse est variable avec un maximum à 12 h de  $2\,500 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$ .  
b) Distances maximales atteintes par le nuage pour les deux concentrations initiales dans l'effluent (Thouvenin, 1991)

- lorsque les eaux sont stratifiées, le panache est retenu en profondeur ; la figure 27b illustre les résultats obtenus par le modèle pour une simulation avec courants faibles alternatifs ; les concentrations bactériennes restent alors très élevées dans le nuage bloqué sous la surface.

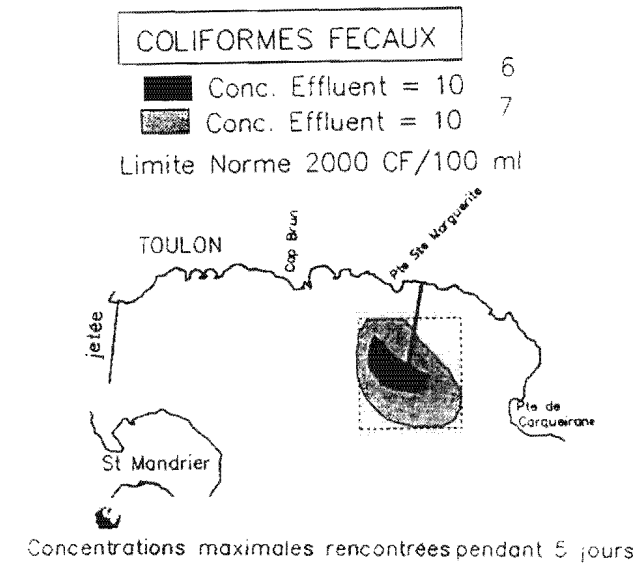
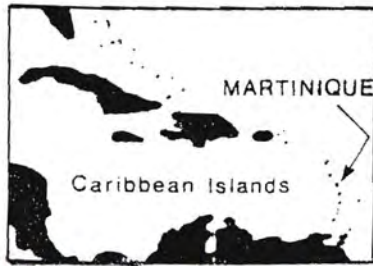


Figure 27b : Limite du nuage pour les coliformes thermotolérants dans la couche de 15 à 20 m de profondeur (milieu stratifié - panache capté en profondeur - courants alternatifs faibles de 1 à 5 cm/s - Intensité lumineuse maximum à 12 h, égale à  $2\,500\ \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}^{-1}$  (Thouvenin, 1991)

### 3. Conclusions

Cet exemple a été rapporté car il montre combien les conditions locales de rejet - présence ou non de thermocline, la position du point de rejet, ici en profondeur - peuvent conditionner la qualité de la zone étudiée. Si les courants de marée en Atlantique jouent un rôle important sur la dispersion du rejet, dans le cas de la Méditerranée, le vent peut modifier la forme du panache et le niveau de contamination de façon très importante. Les conditions climatiques contribuent très largement ensuite au maintien ou à la diminution de la contamination des eaux par leur effet sur la survie des bactéries fécales en mer.





Echelle 1/100 000



INSTITUT GÉOGRAPHIQUE NATIONAL - 136bis Rue de Grenelle - Paris (VII<sup>e</sup>)

Figure 28a : La baie de fort de france.

## VI - LA BAIE DE FORT DE FRANCE

Cette baie (fig. 28a) d'une superficie d'environ 40 km<sup>2</sup>, longue de 7 à 8 km dans le sens est-ouest, large de 3 à 7 km du nord au sud est soumise à une marée mixte - alternance d'une marée diurne (1 pleine mer par jour) et d'une marée semi-diurne (2 pleines mers par jour).

L'amplitude de la marée y est très faible puisqu'elle ne dépasse pas 30 cm ; les courants dus à la marée et aux vents dominants (86 % de secteur nord-est à est) sont très faibles à l'intérieur de la baie (Castaing *et al.*, 1986 ; Lazure *et al.*, 1995).

Les températures des eaux sont généralement de 20 à 25 °C en surface et les salinités élevées (40 ‰). Des déssalures sont observées pendant la saison des pluies (juin-octobre). En effet, la rivière principale de l'île, la Lézarde se jette dans la partie nord-ouest de la baie. Cette rivière draine 20 % de la superficie de l'île ; elle est très turbide et pendant la saison humide les concentrations en matières en suspension atteignent 200 à 500 mg/l. Des augmentations de turbidité peuvent être observées dans la partie nord et ouest du site.

### 1. Contamination fécale de la baie

Des prélèvements d'eau de surface ont été réalisés dans la baie (9 juin 1992 - fig. 28b) pendant une période de 2 heures, de façon à avoir une vue synoptique de la contamination. Cette étude a été réalisée en fin de période sèche.

Les résultats des analyses sont reportés sur le tableau 13 : pour les deux techniques utilisées (culture et microplaques).

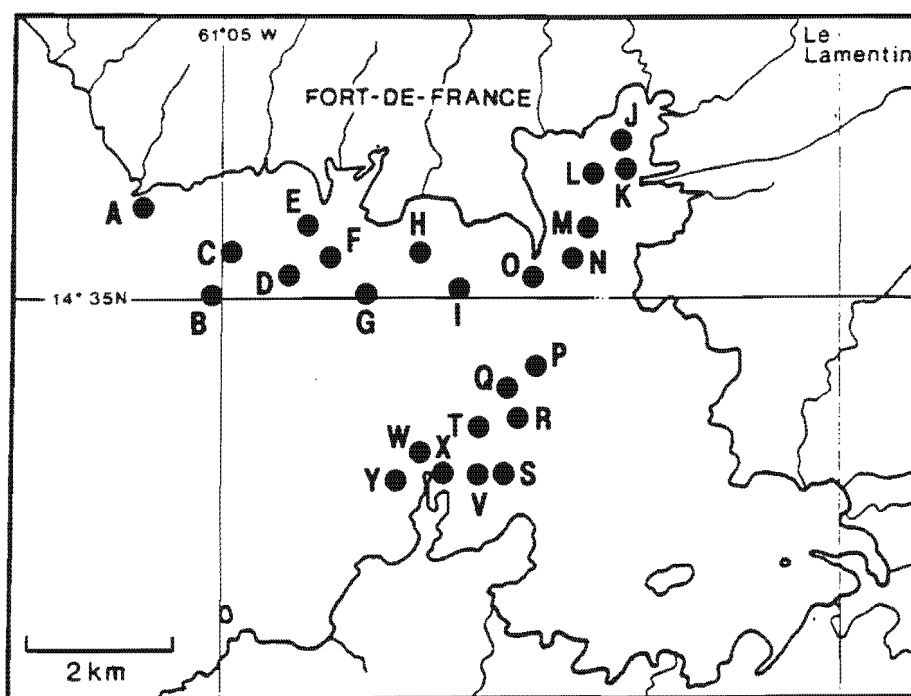


Figure 28b : Prélèvements d'eau de surface - Baie de Fort de France (9 juin 1992)

	CF (1)	CF (2)	SF (3)	SF (4)	MES mg/l
A	8	< 15	21	< 15	ND
B	4	< 15	1	< 15	6
C	< 1	15	4	< 15	ND
D	< 1	< 15	< 1	< 15	13
E	60	15	17	< 15	6
F	77	15	23	< 15	ND
G	210	< 15	9	< 15	6
H	20	< 15	30	< 15	ND
I	200	< 15	50	< 15	2
J	15	< 15	30	< 15	6
K	> 300	< 15	57	< 15	ND
L	ND	30	150	< 15	18
M	12	< 15	4	< 15	ND
N	300	< 15	21	< 15	17
O	50	< 15	< 1	< 15	ND
P	150	< 15	28	< 15	23
Q	< 1	< 15	< 1	< 15	ND
R	17	< 15	< 1	< 15	39
S	22	< 15	< 1	< 15	ND
T	< 1	< 15	< 1	< 15	ND
V	150	< 15	< 1	< 15	ND
W	26	< 15	< 1	< 15	ND
X	250	15	5	< 15	ND
Y	3	< 15	4	< 15	ND
Z	< 1	< 15	4	< 15	ND

**Tableau 13 : Qualité bactériologique des eaux de la baie de Fort de France : coliformes thermotolérants (CF) et Streptocoques Fecaux (SF)/ 100 ml, matières en suspension (MES mg/l) - (1) Filtration TTC Tergitol/Schubert. (2) Méthode M.U.G. microplaque. (3) Filtration (Slanetz) (4) Méthode microplaque (Slanetz)**

D'une manière générale, on note une faible contamination des eaux. La technique microplaque (CF et SF) donnant la plupart du temps des résultats très faibles, inférieurs à la limite de détection de la technique. Les méthodes par filtration (100 ml d'eau filtrée) qui, dans le cas d'eaux peu contaminées sont plus performantes, donnent sur certains points des valeurs également faibles. On notera cependant que ces deux techniques ont des résultats assez discordants (35 % des cas pour les CF, 25 % pour les SF). Plusieurs raisons peuvent être invoquées : la méthode microplaque est utilisée en limite de détection, les volumes utilisés ne sont pas comparables : détection sur 0,1 ml en microplaque, et sur 100 ml par la méthode TTC tergitol, le type de culture est différent (milieu liquide, milieu solide). Ceci nous amène à utiliser les résultats obtenus lors de cette campagne avec prudence.

Les contaminations observées sont inférieures aux normes de baignades (< 500 UFC/100 ml). Les prélèvements ont été réalisés pendant une période de faible

pluviosité (juin 1992). Des valeurs supérieures à 50 CF/100 ml sont observées près de la zone portuaire, au débouché de la Lézarde et près de la zone touristique de la pointe du Bout.

## 2. Conclusion

La pollution de la baie au vu de notre étude est donc limitée localement en période sèche ; ces résultats sont en accord avec ceux d'une étude réalisée antérieurement par l'Université Antilles-Guyane (P. Assor, communication orale). A cette saison, les teneurs en matières en suspension restent assez faibles dans la baie (< 6 mg/l) excepté dans les zones impactées par le rejet de la Lézarde (partie ouest) et le centre de la baie.

## VII - CONCLUSIONS

Les travaux réalisés en France et à l'étranger dans les zones littorales mettent en évidence la grande variation de contamination bactériologique des eaux. Ainsi dans le cadre du Réseau Microbiologique (Miossec (1990) ; Grouhel et Raffin (1993)), des études particulières montrent la diversité des situations rencontrées sur les côtes françaises, que ce soit en Loire-Atlantique (Catherine *et al.*, 1994), en Vendée (Noury *et al.*, 1994), en Languedoc-Roussillon (Comps *et al.*, 1993), sur le golfe de Fos (Console et Zeitoun, 1992), dans le Morbihan (Camus *et al.*, 1990) ou en baie des Veys (Godefroy et Etourneau, 1994). Sur tous ces sites, l'influence des apports sur la mauvaise qualité de l'eau a été mise en évidence.

La nature des rejets (rivière ou eaux de station d'épuration), la géométrie du secteur (côte ouverte, estuaire ou baie), l'hydrodynamique (mer à marée ou sans marée), la présence de vase, les conditions climatiques, tous ces facteurs jouent un rôle déterminant sur la qualité de l'eau, des sédiments et, lorsqu'ils sont présents, des coquillages.

Les caractéristiques des sites sélectionnés dans notre étude et de ce fait leur rôle sur la qualité des eaux, peuvent être résumés à grands traits :

**L'ouest Cotentin, côte ouverte de la Manche** est soumise à un fort marnage et à de forts courants, la contamination fécale due aux apports des rivières et des rejets urbains est limitée aux débouchés des havres ; les conditions de mélange sont telles que la contamination est peu étendue. Cependant lors des basses mers de vives eaux - du fait de la morphologie de la zone et de l'écoulement des eaux de rivière dans les chenaux, les zones conchyliques peuvent être fortement contaminées. Ceci doit être particulièrement marqué en période de crue, où ces zones conchyliques peuvent être fortement contaminées (observation REMI).

**Baie fermée, la rade de Brest** est une zone de mélange : les temps de renouvellement sont élevés, surtout en été. Les apports permanents de la ville de Brest et des rivières principales, en font une zone où une contamination rémanente est observée assez loin. L'impact des rejets et de l'Elorn se fait sentir à basse mer de vives eaux jusque dans la baie.

**L'estuaire de Morlaix** subit de très fortes variations de contamination dues à l'importance de l'hydrodynamique de la Manche (forts courants et marnages élevés), des flux rejetés en tête d'estuaire (by-pass de la station d'épuration). Dans ces conditions peuvent

alterner au niveau des zones ostréicoles et sur des temps très courts (6 heures) des conditions très opposées : eaux marines faiblement contaminées - eaux douces très chargées.

**La baie de Toulon en Méditerranée**, a sa qualité d'eau régie par le système vent-thermocline contrairement aux sites précédents. Les marnages très faibles induisent des courants très limités, seul le vent peut induire des vitesses plus fortes (50 cm/s). La spécificité du rejet sur ces sites (par émissaire et au fond) la présence ou non de thermocline, font que le nuage de contamination dérive soit à mi-profondeur, soit en surface. Son étalement dépend du vent. Les conditions climatiques, eaux chaudes ensoleillées, font intervenir les phénomènes biologiques pour expliquer la diminution de la contamination.

**La baie de Fort de France**, baie fermée en zone tropicale, présente un autre type de situation : bien que de très importants rejets aient été localisés sur le pourtour de la baie et principalement au nord (agglomération de 150 000 habitants), on constate que le niveau de pollution est inférieur à 500 CF/100 ml ; l'hydrodynamisme faible, dominé par les vents, ne permet pas d'expliquer les niveaux rencontrés, l'effet du climat, particulièrement la température et les forts ensoleillements, nous le verrons dans le chapitre suivant, explique en grande partie ces résultats.

Ces études de sites montrent que le devenir des apports bactériens est lié à différents facteurs, tels que les courants assurant la dilution des masses d'eaux rejetées et les conditions locales du milieu conditionnant la survie des bactéries en mer ; dans le chapitre suivant nous tenterons de hiérarchiser les différents facteurs responsables du devenir des bactéries entériques dans les zones littorales.

## **CHAPITRE III**

# **DEVENIR EN MER DES BACTERIES ENTERIQUES**

## DEVENIR EN MER DES BACTERIES ENTERIQUES

### INTRODUCTION

On a longtemps considéré que la mer avait un pouvoir auto-épuration élevé ; le bilan des études réalisées par Gunnerson (1974), Mitchel et Chamberlin (1974) ou Gameson et Gould (1974) et reporté sur les tableaux ci-joints 14 et 15, montre que la plupart des temps de survie des entérobactéries en mer sont très courts. Ainsi les T90 - temps nécessaire pour que 90 % des bactéries perdent leur pouvoir de cultiver - sont évalués à 2 h 00 en moyenne.

L'observation des tableaux (14 et 15) des temps de survie suggèrent plusieurs remarques : tout d'abord l'une des raisons de l'obtention de temps très courts est liée aux méthodes utilisées : les coliformes thermotolérants - ou *Escherichia coli* lorsque cette bactérie est utilisée - sont recherchés sur des milieux très sélectifs et à 44,5 °C, les milieux sont peu performants pour mettre en évidence les bactéries stressées (Mc Feters *et al.*, 1982 ; Singh et Mc Feters, 1992). D'autre part, il est intéressant de noter que nombre d'observations ont été réalisées dans des régions aux climats très ensoleillés (Israël, Californie, Brésil...) ou ... l'été en Angleterre (Gameson et Gould, 1974). Lorsque des temps de survie longs étaient trouvés, les auteurs les ont écartés (tableau 15) comme étant des valeurs erronées (effluent ancien) ou extrêmes (La Hague) et ne les ont pas pris en compte dans les moyennes. Cependant Irving T.E. (1977) indique, en accord avec les études de l'équipe Gameson, qu'à l'obscurité les T90 sont très longs (quelques centaines d'heures et plus).

Depuis plus de dix ans maintenant, la notion d'auto-épuration de la mer a été largement battue en brèche du fait de l'amélioration des techniques de mise en évidence des bactéries et des résultats des études sur la physiologie des bactéries en état de stress. Ainsi ce sont les premières applications des techniques par microscopie (Kogure *et al.*, 1979 ; Zimmerman *et al.*, 1978) qui ont permis d'observer que les bactéries stressées pouvaient, avant de mourir, passer par des états dits viables mais non cultivables (Rozack et Colwell, 1987a, 1987b ; Xu *et al.*, 1992).

Le dernier élément qui a fait basculer la notion d'auto-épuration c'est, avec la multiplication et la concentration des rejets liés à la construction des structures d'épuration (années 1970-1980 en France), l'observation de plus en plus fréquente de zones côtières chroniquement contaminées.

Les revues bibliographiques de travaux effectués sur le devenir en mer des microorganismes (Solic et Krstulovic, 1992 ; Pommepuy *et al.*, 1992 ; Mesplé *et al.*, 1994 ; Gourmelon, 1995) listent les principaux facteurs intervenant dans le devenir des bactéries fécales en mer (fig. 29) :

- *les phénomènes physiques* : dilution, sédimentation régissant la dispersion physique des bactéries, remises en suspension,
- *les facteurs physico-chimiques* intervenant sur le métabolisme bactérien : température, salinité, oligotrophie, lumière...,
- *les facteurs biologiques* : compétition, prédation, perte de cultivabilité, mortalité,
- *les facteurs du patrimoine génétique* de la bactérie.

Location	Date	71		
		Previous sewage treatment	$T_{90}$ (h)	$k_e$ ( $h^{-1}$ )
Santa Monica, California <sup>14</sup>	1954-56	Secondary	6.5	0.354
		Primary + chlorine	3.8	0.606
		Primary	4.0	0.576
		Primary	3.4	0.677
		Primary	1.5	1.53
Titahi Bay, New Zealand <sup>83</sup>	1959-60	None	0.65	3.54
Rio de Janeiro, Brazil <sup>84</sup>	1963	None	< 1.0	> 2.3
Tema, Ghana <sup>85</sup>	Aug. 1964	None	1.33	1.73
Dawlish, England <sup>86</sup>	1965	None	0.78	2.95
			3.5	0.66
Nice, France <sup>87</sup>	—	—	1.50	1.54
Denmark <sup>88</sup>	1968	—	2.00	1.15
Gentofte, Denmark <sup>89</sup>	—	None	1.16	1.98
Manila Bay, Philippines <sup>89</sup>	May 1969	—	2.16	1.06
			2.84	0.81
Santa Barbara, California <sup>36</sup>	1966-67	Primary	$\mu = 2.35$ $\sigma = 1.1$ $n = 37$	0.98
Sidmouth and Bridport, England <sup>28</sup>	1969-73	None	$\mu = 3.7$	0.62
			$\sigma = 2.5$ $n = 18$	

$\mu$  valeur moyenne pour n détermination,  $\sigma$  standard déviation.

Tableau n° 14 : Quelques exemples de mesures *in situ* (Mitchell et Chamberlin, 1974)

$$k_e = \ln 10/T_{90}$$

Location	Date	$T_{90}$ (h)	$k_e$ ( $h^{-1}$ )	Remarks
<i>Raw sewage</i>				
Honolulu <sup>5</sup>	1970	ca 0.2	11	$T_{90}$ too low to account for high pollution levels
Titahi Bay, New Zealand <sup>6</sup>	1959-60	0.65	3.5	
Rio de Janeiro <sup>7</sup>	1963	0.95	2.4	
Israel <sup>8</sup>	—	< 1.0	> 2.3	Poliovirus $T_{90} > 24$ h
Istanbul <sup>9</sup>	1968	0.8-1.7	1.4-2.9	Mean value 1.1 h
Genofte, Denmark <sup>10</sup>	—	1.2	2.0	
Tema, Ghana <sup>11</sup>	1964	1.3	1.7	
Nice <sup>12</sup>	—	1.5	1.5	
England <sup>13</sup>	1965	0.78-3.5	0.66-2.9	
Manila <sup>14</sup>	1968-69	1.8-3.4	0.67-1.3	Higher $T_{90}$ value may represent mixing with old effluent
England <sup>15</sup>	1969-73	1.4-5.3	0.43-1.6	Median of 11 results 3.2 h. Extreme values of ca 0.6 and 9.0 h rejected
<i>Primary effluent</i>				
Ventura, California <sup>16, 17</sup>	1966	1.7	1.4	
Seaside, New Jersey <sup>18</sup>	1966	1.8	1.3	
Orange Co., California <sup>19</sup>	1954-56	1.8-2.1	1.1-1.3	
Santa Barbara, California <sup>17</sup>	1967	2.4	0.96	
Los Angeles, California <sup>19</sup>	1954-56	4.1 <sup>a</sup>	0.56	
<i>Secondary effluent</i>				
Los Angeles, California <sup>19</sup>	1954-56	9.6 <sup>b</sup>	0.24	
<i>Combined</i>				
The Hague <sup>20</sup>	1968-69	5-175	0.01-0.5	Higher $T_{90}$ values may represent mixing with old effluent, resuspended sediments, or other sources

<sup>a</sup> $T_{90}$  due to mortality 17.8 h, and to sedimentation 5.3 h; higher  $T_{90}$  after chlorination

<sup>b</sup> $T_{90}$  due to mortality 17.8 h, and to sedimentation 21.0 h

Tableau n° 15 : Taux de réduction bactérienne des coliformes fécaux dus à la mortalité et à la sédimentation dans les océans (Gunnerson, 1974).



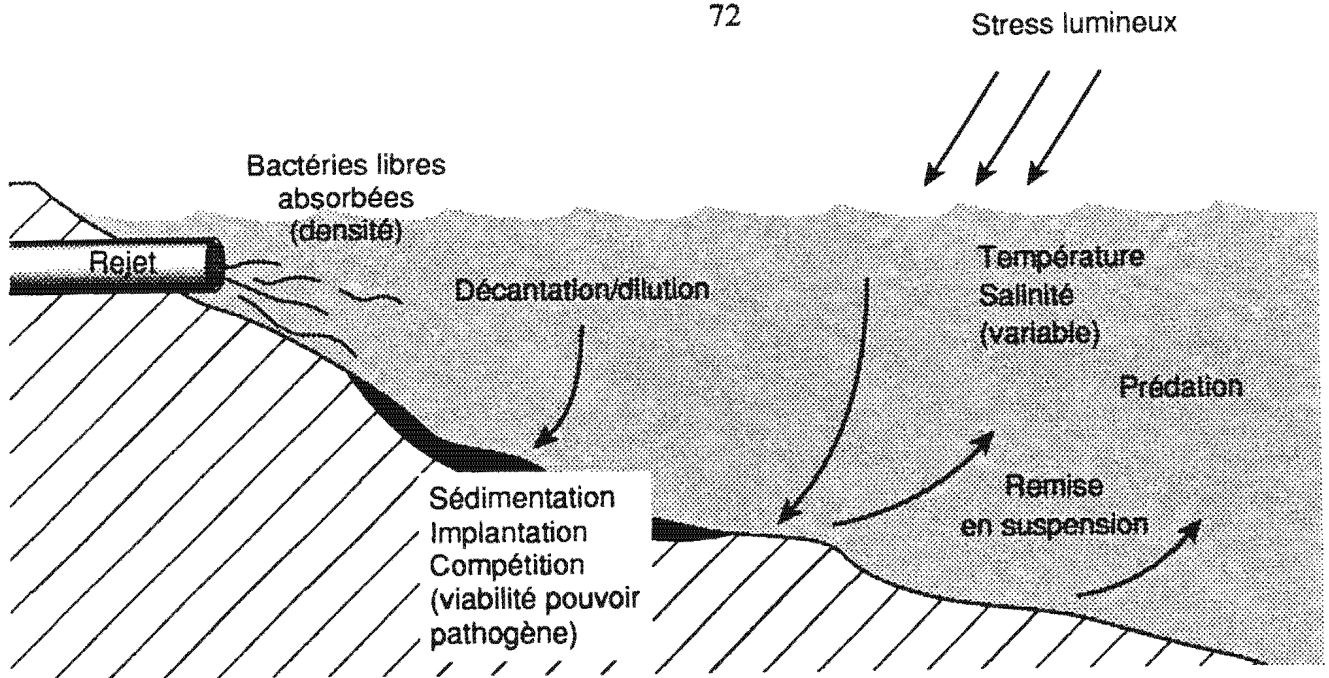


Figure 29 : Vue théorique des différents facteurs intervenant dans le devenir des bactéries entériques en mer.

Les questions posées par la persistance des bactéries fécales sont multiples :

- sous quelle forme, et dans quel état physiologique sont rejetées les bactéries ? Y a-t-il décantation et quelle en est la vitesse ? Est-ce que les mécanismes de floculation interviennent ?

- Comment se fait l'implantation des bactéries entériques dans le sédiment ? Y a-t-il compétition avec la flore autochtone ? Quel est l'état physiologique des bactéries entériques dans les sédiments naturels ? Y a-t-il maintien du pouvoir pathogène durant le stress et échange de matériel génétique avec les bactéries allochtones ?

- Quel est l'effet des remises en suspension sur la qualité de l'eau ?

- Quels sont les facteurs responsables de la diminution observée du nombre de bactéries fécales dans l'eau et surtout quels sont les facteurs les plus efficaces ?

- Quels sont les mécanismes d'action des différents stress : lumière, salinité, présence ou non de matière organique assimilable ?

S'il est illusoire, dans l'état actuel des connaissances de pouvoir répondre à toutes ces questions, les techniques utilisées dans ce travail, permettent d'approcher certaines réponses et de comprendre sur un site donné les facteurs principaux responsables du constat observé (fig. 30).

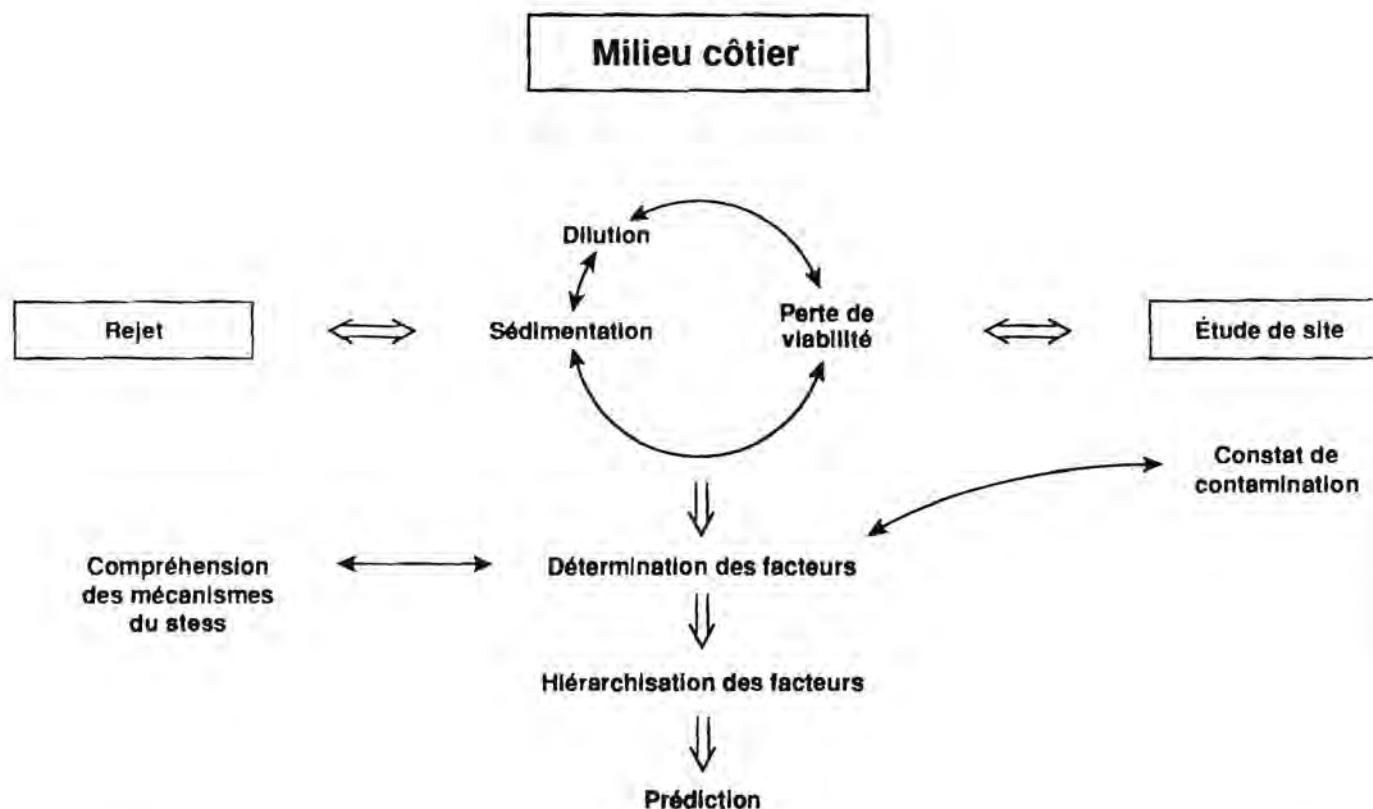


Figure 30 : Etude sur site côtier : Etude de la hiérarchisation des facteurs intervenant sur la contamination d'un site.

Les résultats présentés ici ont pour but de répondre à quelques points soulevés et en particulier sur :

- **Les relations bactéries-particules.** Ce travail a été effectué sur la rade de Brest à partir d'eaux recueillies près des rejets et dans la rade. Des études par filtration différentielle des eaux et examen au microscope à balayage ont été réalisées afin de déterminer le mode de rejet et de transport des bactéries sur ce site. Les résultats sont présentés dans le *paragraphe II* de ce chapitre.

- **La contamination d'un sédiment côtier non vaseux :** l'impact de la contamination fécale des eaux des havres sur le sédiment a été évalué sur le site de l'Ouest-Cotentin. Sur cette côte, il s'agit d'un sédiment sableux ou sablo-vaseux. Sur ces vastes estrans, découvrant à marée basse, des exploitations conchylicoles importantes se sont développées. La contamination fécale par les deux sources principales - les eaux des havres et le sédiment - est envisagée. Les résultats sont reportés au *paragraphe III*.

- **Le rôle d'un estuaire sur le devenir des bactéries issues d'un rejet urbain :** cet écosystème est caractérisé par un dynamisme important où période de courants et d'eaux étales se succèdent. La salinité et la turbidité y sont très fluctuantes et modifient ainsi les conditions réceptrices du milieu vis-à-vis des bactéries fécales. Ainsi les questions qui se posent sont les suivantes : y-a-t-il décantation des bactéries à leur arrivée en mer ? Quelle est

la contamination du sédiment vaseux de l'estuaire ? Quel est le rôle des matières en suspension sur la décroissance bactérienne ? *L'article 2 (paragraphe IV)* tente de répondre à ces questions.

- **L'implantation d'*E. coli* dans le sédiment** a donné lieu à des études en laboratoire. On a pu ainsi, hors des contraintes existantes *in situ*, étudier le mode d'implantation de cette souche en présence ou absence de flore autochtone. L'effet des remises en suspension des sédiments contaminés sur la qualité de l'eau surnageante a fait également l'objet d'observations. *L'article 3 (paragraphe V)* reporte les résultats de cette étude.

- **L'étude de la hiérarchisation des facteurs** influençant la contamination d'un site littoral. Le rôle des différents facteurs peut être évalué par modèles mathématiques. L'application de ces modèles à l'estuaire de Morlaix est présentée dans *l'article 4 (paragraphe VI)* et *l'article 5 (paragraphe VII)* et à la rade de Brest dans *l'article 6 (paragraphe VIII)*.

## I - MATERIEL ET METHODES

Certaines méthodes sont détaillées dans les articles de ce chapitre. Ce paragraphe présente rapidement quelques unes des techniques utilisées.

### 1. L'étude des relations bactéries-particules

Ce travail a été réalisé sur la rade de Brest et comporte des analyses par filtrations différentielles et des observations au microscope à balayage (Géode). Il a donné lieu à un rapport UER-Rennes - CNEXO (1981).

L'eau a été prélevée lors des campagnes de vives eaux en juin 1980 et mars 1981, près des rejets (points 1 et 17), dans l'Elorn (point 8) et dans la rade (points 7, 9, 19 - Fig. 7).

#### - *Filtrations différentielles*

Dans un premier temps l'eau est filtrée sur 3  $\mu\text{m}$  (filtre Millipore) ; le filtre est ensuite rincé à l'eau distillée stérile et placé sur milieu de culture. Le filtrat recueilli dans un Erlen stérile est refiltré sur 0,22  $\mu\text{m}$  (filtre Millipore) ; le filtre est traité de la même façon que précédemment. Les milieux de culture utilisés sont : un milieu de Drigalski (AES Laboratoire) préparé à l'eau distillée stérile et incubé 24 h à 42 °C, un milieu de Drigalski préparé à l'eau de mer stérile incubé 24 h à 25 °C, un milieu trypticase soja (AES Laboratoire) incubé 48 h à 25 °C.

Les résultats sont présentés sous forme de rapport UFC 0,22  $\mu\text{m}$ /UFC 3  $\mu\text{m}$  exprimé en pourcentage.

#### - *Examen en microscopie à balayage*

Un volume de 10 ml ou 100 ml est filtré sur filtre nucléopore polycarbonate (0,22  $\mu\text{m}$ ). Les filtres sont ensuite déposés dans des boîtes stériles pendant 24 heures puis séchés sous air ventilé 1 à 2 minutes.

La technique de préparation pour la microscopie est celle proposée par Paerl et Shimp (1973) : après fixation au glutaraldehyde en tampon cacodylate, les filtres sont colorés à l'acide osmique, passés au point critique puis métallisés à l'or.

Le microscope à balayage du centre IFREMER de Brest a été utilisé. Quelques analyses ont été faites à la microsonde électronique Camebox pour déterminer la composition des substrats ou des minéraux.

## 2. Etude de la décantation des bactéries

Ce travail a été réalisé sur les eaux de l'estuaire de Morlaix prélevées à marée basse à 100 m en aval du rejet de la station d'épuration (mélange eaux usées et eaux d'estuaire). Dans l'ouest Cotentin, les prélèvements d'eaux ont eu lieu à basse mer dans le havre de la Vanlée.

L'eau, stockée à 4 °C est utilisée dans un délai de 12 h à 24 h après son prélèvement (transport des sites au laboratoire) : 12 h pour Morlaix, 24 h pour les eaux de l'Ouest Cotentin.

L'expérience est réalisée dans une colonne de verre de 2,20 m de hauteur et de 25 cm de diamètre. Un équipement permet d'homogénéiser les eaux avant l'expérience. La colonne est équipée de systèmes de prélèvements (Prolabo) situés tous les 50 cm. La température de la pièce est de 20 °C. Les prélèvements ont lieu sur quelques heures selon une échelle logarithmique de temps.

Les matières en suspension sont analysées (Laboratoire de Sédimentologie IFREMER DEL) par filtration (0,45 µm Millipore), le filtre est rincé à l'eau distillée puis séché à 37 °C pendant 2 heures et pesé. La matière organique est obtenue par pesée après séchage à 500 °C. Les numérations bactériennes sont réalisées sur milieu de Drigalski (AES Laboratoire) incubé 24 heures à 42 °C.

## 3. Etudes de la contamination du sédiment (Ouest-Cotentin)

Des prélèvements de sédiment ont eu lieu les 4 et 5 décembre 1990 (havre de la Vanlée et zone mytilicole) et le 9 avril 1991 (havre de la Vanlée et havre de Regnéville).

Une étude **granulométrique** a été réalisée par le laboratoire de Géomorphologie (EPHE - Pr. Lafond) en collaboration avec l'IFREMER (J. L'Yavanc) ; elle a donné lieu à un rapport (Lafond, 1992). La technique de séparation sable-vase par tamisage permet de connaître le pourcentage d'éléments inférieurs à 40 µm, ainsi que la médiane du sédiment total (résultats exprimés en micromètre).

Le **carbone organique** est dosé par la méthode de Walkley et Black fondée sur l'oxydation de la matière organique par un mélange sulfo-chromique. L'oxydant en excès est dosé en retour par une solution réductrice de fer ferreux (Aminot et Chaussepied, 1983). Le pourcentage de matière organique est déduit de la teneur en carbone organique en appliquant le coefficient moyen de 1,724, classique en pédologie.

Un ensemble de bactéries a été recherché sur le sédiment : coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux (méthode décrites au chapitre 1 - Laboratoire de Saint-Lô), flore fécale sur milieu de Drigalski, flore hétérotrophe (trypticase doux). Ces techniques ont été décrites précédemment. Pour ce qui concerne l'étude du sédiment, le protocole est le suivant : 1 g de sédiment est dilué dans 9 ml d'eau distillée stérile ; l'homogénéisation se fait par vortex (5 mn), puis des dilutions sont pratiquées sur cet échantillon. Les résultats sont exprimés pour 100 g.

#### 4. Etude de l'implantation d'une souche d'*Escherichia coli* dans le sédiment

Ce travail a été réalisé en aquarium ; le système de prélèvement mis au point a l'intérêt de prélever directement sur le site - avec une perturbation minimale - un échantillon de 60 x 40 x 30 cm. La souche choisie pour cette expérimentation est un *Escherichia coli* isolé d'un prélèvement urinaire, résistante à l'acide nalidixique et à la rifampicine, ce qui permet de la différencier des bactéries présentes dans le milieu.

Le détail du matériel et des méthodes utilisés est développé dans l'article 3.

#### 5. Etude de la survie d'*E. coli* en mer (T90)

**Préparation de la souche** (*E. coli* H10407) : cultivées dans un bouillon trypticase soja, les bactéries sont récupérées en fin de phase exponentielle de croissance, elles sont ensuite centrifugées et lavées trois fois par centrifugation, afin d'éliminer le bouillon.

La suspension est ensuite inoculée dans des chambres à diffusion (volume 300-400 ml) obstruées à chaque extrémité par des filtres Millipore de 14 cm de diamètre (porosité 0,45  $\mu\text{m}$ ) ; ces chambres, remplies par de l'eau de mer du site (filtrée à 0,45  $\mu\text{m}$ ) retiennent les coliformes et limitent aux éléments dissous, les échanges avec l'extérieur. Les chambres construites en quartz (pour laisser passer la lumière visible et les rayons ultraviolets) et en Plexiglas (ne laissant passer que la lumière visible), sont immergées à différentes profondeurs sous la surface de l'eau à l'aide d'un mouillage réalisé à cet effet. Une chambre noire (utilisée comme contrôle à l'abri de la lumière) est également installée sous le mouillage. La figure 31 illustre un des mouillages utilisés à Morlaix (extérieur de la baie, au Taureau).

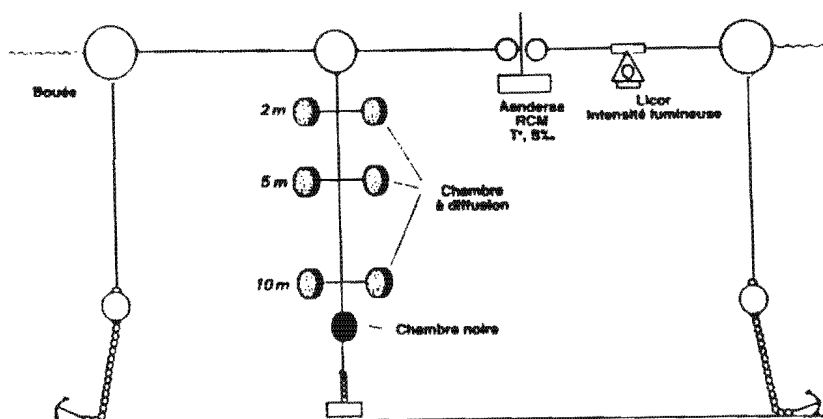


Figure 31 : expérience de survie d'*E. coli* en chambre à diffusion - Juin 1989 - Baie de Morlaix.

Un appareil (LICOR - LI 1000) mesurant la lumière reçue (longueur d'onde 400 à 700 nm) par les bactéries est positionné à la même profondeur que la chambre de surface (1 m de profondeur ou 1,50 m selon les sites) ; des mesures ponctuelles en profondeur sont réalisées plusieurs fois dans la journée pour étudier le coefficient de pénétration de la lumière sur le site de mesure. L'unité de mesure de la lumière est exprimé en  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

Les prélèvements sont réalisés toutes les deux à trois heures selon les sites et l'ensoleillement, à l'aide d'une seringue stérile.

Les analyses bactériologiques sont :

- la recherche par culture milieu de Drigalski (AES Laboratoire) incubé pendant 24 h à 37 °C pour les études faites en Martinique ; Trypticase doux pour celles sur Granville incubation à 37 °C pendant 24 h,

- la recherche de la viabilité s'est faite par la méthode Direct Viable Count (DVC) (Kogure *et al.*, 1979). Dans un prélèvement de 10 ml on ajoute 1 ml d'extrait de levure à 0,25 %. Comme il s'agit d'un milieu très riche, les bactéries vont trouver tout ce qui leur faut pour croître. Après une demi-heure de contact, l'acide nalidixique est additionné à une concentration légèrement supérieure à la Concentration Minimale Inhibitrice de la souche (de l'ordre de 0,014 % d'acide nalidixique). Après incubation de 24 h à 37 °C l'échantillon est formolé. Les bactéries viables sont comptées par épifluorescence, après coloration à l'acridine orange.

- le contrôle de la population par épifluorescence : l'échantillon est formolé puis observé au microscope à épifluorescence (Hobbie *et al.*, 1976).

*Les études ont été réalisées sur les sites suivants :*

- **Morlaix** : site du Dourduff (janvier - février 1987)  
Château du Taureau (janvier - février - juin 1987 ; juin 1988)
- **Granville** (Ouest-Cotentin) : point situé à 500 m au nord-est de la ville de Granville, (14 -15 mai 1991)
- **Martinique - Baie de Fort de France**: la Lézarde Cohé du Lamentin (juin 1992).
- **l'anse d'Arlet (juin 1992) et l'anse du Robert** (Décembre 1992).

Le choix des sites correspond aux différentes conditions physico-chimiques trouvées (présence de matière organique, eau claire, etc.).

En rade de Brest, aucune étude *in situ* n'a été réalisée. Une estimation des T90 basée sur une comparaison des concentrations calculées par modèle mathématique et des concentrations mesurées *in situ* a permis d'évaluer des facteurs de décroissance (IFREMER, 1981).

## II - ETUDE DES RELATIONS BACTERIES-PARTICULES (RADE DE BREST)

### 1. Filtration différentielle

Une étude par filtration différentielle a été réalisée sur les eaux de la rade de Brest afin de connaître les pourcentages respectifs de bactéries libres et adsorbées dans le milieu. On constate que, près des rejets, le pourcentage de bactéries libres est faible (inférieur à 7 % pour la plupart des espèces bactériennes). Par contre, dans l'ensemble de la rade, par temps calme (juin), les bactéries libres sont généralement dominantes. Lors des périodes agitées (mars 1981), le pourcentage de bactéries libres tend à diminuer jusqu'à s'annuler.

Les résultats de filtrations différentielles doivent être interprétés avec précaution du fait des biais introduits par la technique. En effet, les bactéries libres peuvent être piégées sur le filtre par les particules pendant la filtration. D'autre part, Baleux *et al.* (1986) montrent que l'utilisation de filtres calibrés (ex Nuclepore) rendent mieux compte du nombre de bactéries libres, les filtres en fibres (acétate et nitrate de cellulose. Millipore) peuvent laisser passer les bactéries libres.

### 2. Examens au microscope à balayage

Un autre élément est apporté par l'examen des échantillons au microscope à balayage. Ce travail a donné lieu à un rapport (UER-CNEXO, 1981). Quelques résultats sont présentés ici. Tout d'abord on observe des colonisations différentes selon les points de prélèvements.

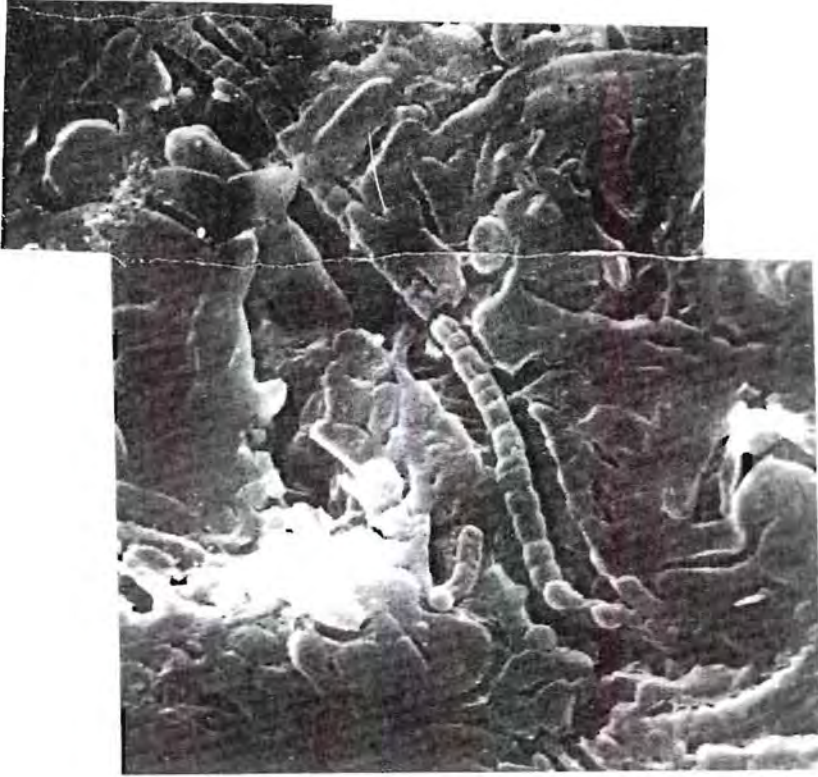
#### A proximité des rejets

A faible grossissement (X 50), de nombreux amas de matière organique apparaissent. L'observation à fort grossissement (X 10 000), montre que ces amas sont principalement composés de bactéries (photo 1 et 2). Leur polymorphisme traduit l'hétérogénéité de la flore de ces amas.

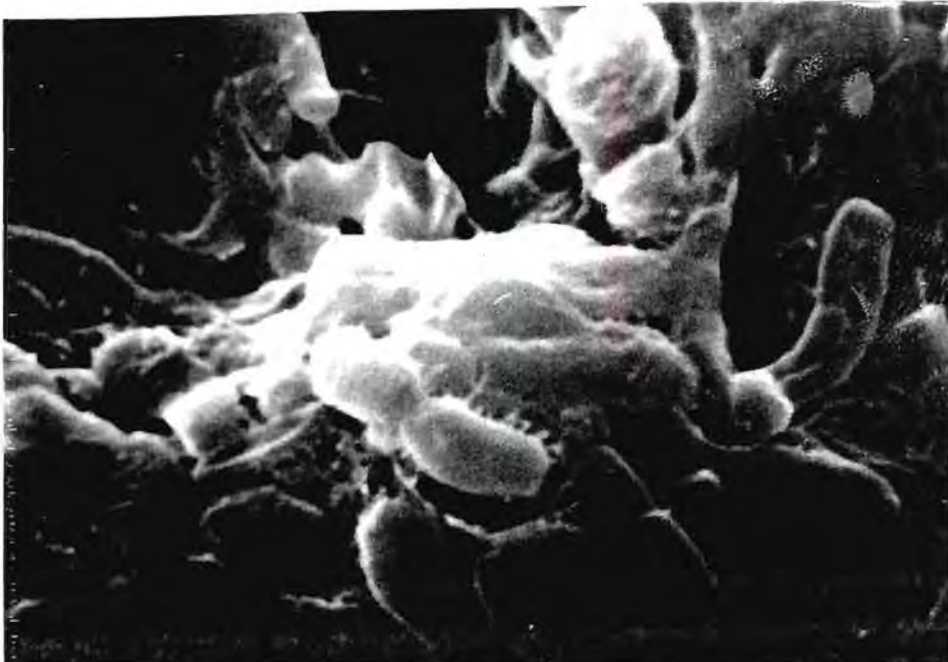
Une soixantaine d'analyses effectuées au moyen de la microsonde électronique CAMEBAX, ont permis de confirmer que lorsque, visuellement, la particule présentait un aspect structuré, cela correspondait effectivement à un réseau cristallin (feldspath, quartz...). De manière abusive, nous utilisons ici le terme de matière organique ou colloïde pour tout ce qui a un aspect inorganisé et dont la composition chimique ne répond pas à celle d'un minéral (absence de Si, Al, Fe...).

#### A distance des rejets :

On observe des particules de nature minérale (quartz, feldspath...) ; les bactéries qui leur sont associées sont peu nombreuses (photo 3). Elles apparaissent isolées, certaines semblent en voie de lyse.

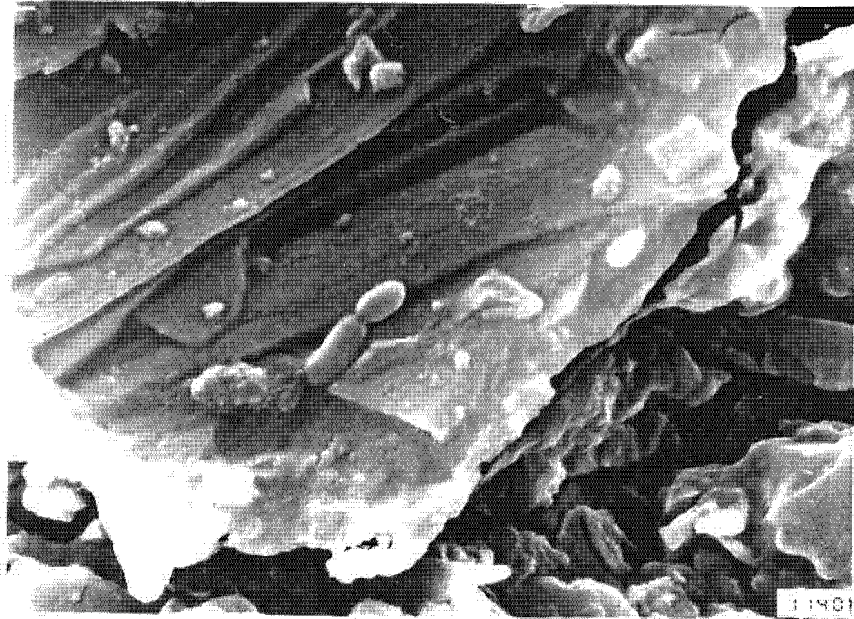


**PHOTO 1**  
(x 10 000)



**PHOTO 2**  
(x 25 000)





**PHOTO 3**  
(x 7 500)



**PHOTO 4**  
(x 10 000)

Les colloïdes sont moins nombreux et de taille inférieure à ceux observés à proximité des rejets. L'association des bactéries à cette matière organique peut s'expliquer selon deux modes :

- dans un premier cas, la flore bactérienne est engluée dans la matière organique d'une façon comparable à ce que l'on observe à proximité des rejets (photo 4) ; cependant, la flore semble plus homogène (photo 5),

- dans un deuxième cas, des microcolonies (amas ou chaînettes) de bactéries sont associées à la surface des colloïdes organiques. Les bactéries possèdent des structures qui les lient au matériel organique. Des structures semblables existent entre les bactéries d'un amas ou d'une chaîne (photo 6).

### **Ces observations suggèrent les commentaires suivants :**

Les méthodes de numération sont prises en défaut puisque l'appréciation du nombre de bactéries dans un amas est difficile, voire impossible.

Ces résultats mettent en évidence le rôle de la sédimentation : les bactéries rejetées dans le milieu marin sont, pour la plupart, fixées sur les matières en suspension. Dans ces conditions, elles sédimenteraient assez rapidement, et survivraient dans les sédiments.

L'agitation due aux courants et aux vagues aurait pour conséquence la remise en suspension de particules chargées de bactéries.

Les relations entre le matériel particulaire et les bactéries ne sont pas faciles à mettre en évidence parce que différents facteurs entrent en jeu :

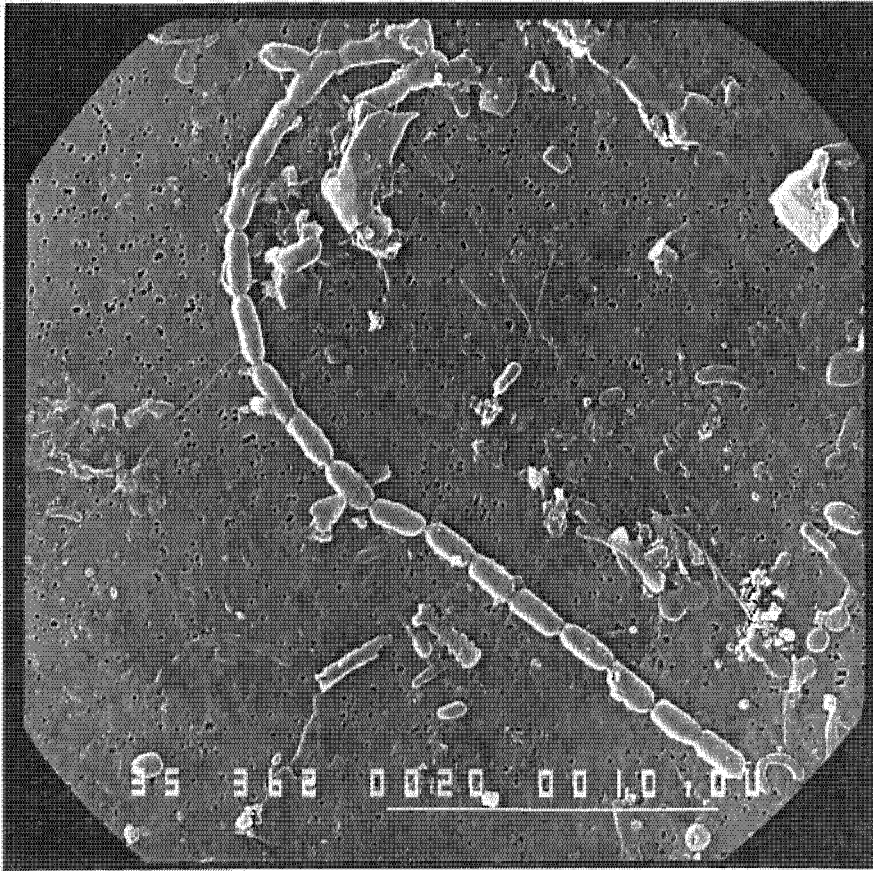
- La qualité des particules est variable selon les saisons (poussées planctoniques), ou selon les conditions hydrodynamiques ; ainsi, en vives eaux, la turbidité est plus élevée qu'en mortes eaux, tandis que le pourcentage de matière organique dans les particules est plus faible.

- Les remises en suspension sont variables dans le temps et dans l'espace. Elles sont plus intenses et plus fréquentes dans les zones exposées (bancs de Plougastel et du Moulin Blanc).

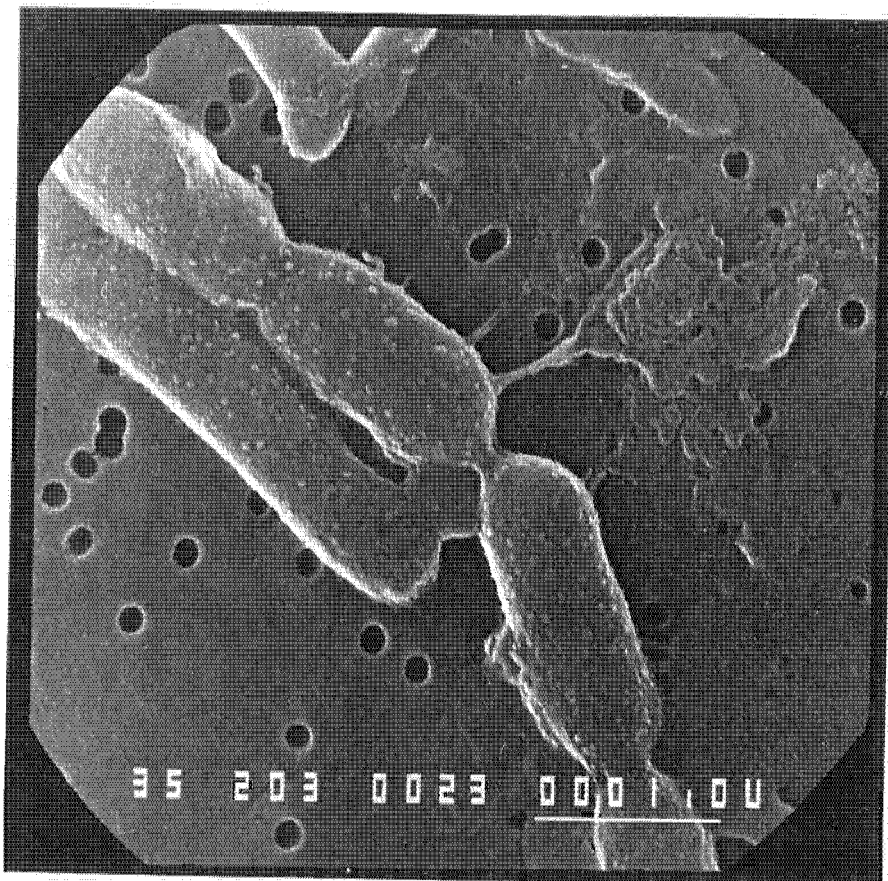
### **3. Conclusion**

Malgré la faible corrélation établie en rade de Brest entre les particules et les bactéries, ces relations ne peuvent être ignorées, car les valeurs élevées en coliformes thermotolérants correspondent très souvent à des anomalies positives en matière organique particulaire (près des égouts Pt 17) ou en turbidité (après les tempêtes ou en vive eau). Un autre élément est apporté par l'examen des échantillons au microscope à balayage : on observe des colonisations différentes selon la qualité du matériel :

- la fixation des bactéries aux particules dépend de la composition chimique du support (organique ou non) ; ceci peut expliquer les corrélations peu significatives entre les numérations bactériennes et la turbidité,



**PHOTO 5**  
(x 10 000)



**PHOTO 6**  
(x 25 000)

- au contact des matières organiques particulaires, les bactéries ont une activité physiologique, puisque l'on observe des chaînettes bactériennes qui traduisent une multiplication et l'existence de structures d'adhérence.

Les bactéries rejetées par les stations d'épuration arrivent en mer sous différentes formes : libres, adsorbées sur du matériel organique ou minéral ou agglomérées en floes. Il est généralement admis que le temps de survie d'une bactérie libre - à moins qu'elle n'adhère au cours du transport à une surface - est moins long que celui d'une bactérie fixée qui sur son support peut trouver des nutriments nécessaires à son métabolisme.

Le type de traitement des eaux (physico-chimique, avec ou sans floculation, biologique) doit nécessairement jouer sur la taille des particules rejetées.

Parkess *et al.* (1971) estiment que les floes des boues activées ont des tailles comprises entre 1 et 1 000  $\mu\text{m}$ . Ces très grandes variations de taille modifient l'efficacité de la désinfection par ultraviolets (Qualls *et al.*, 1985).

Sur la rade de Brest les examens en microscopie à balayage associés à l'étude par filtration différentielle montrent que la plupart des bactéries rejetées sont sous formes associées (floes, ou association matière en suspension-bactéries). Sur les rejets de Morlaix et Toulon, Dupray *et al.* (1991) estiment que respectivement 28 et 25 % des coliformes thermotolérants sont associés à des amas ou des particules. Cependant les dysfonctionnements des traitements biologiques (bulking, croissance dispersée sans floes, slimes...) ainsi que les variations de charges peuvent modifier le pourcentage de bactéries adsorbées (Bitton, 1994). Mitchel et Chamberlin (1974) estiment que, à la suite d'un traitement primaire classique, 50 à 75 % des coliformes thermotolérants sont associés à des particules ayant des vitesses de sédimentation supérieures à 0,05 cm/s.

Lors du rejet en mer, des phénomènes de floculation se produiraient en présence d'eau marine, la sédimentation jouait alors un rôle important et limiterait la propagation des bactéries dans l'eau. La floculation semble intervenir dans les premiers instants du mélange à des salinités inférieures à 5 ‰. Des floculations en eau douce ont également été observées (Bassoullet, communication personnelle). Dans la rade de Brest, en période de beau temps, on observe une majorité de bactéries libres ; lors de remises en suspension par le clapot, les bactéries sédimentées se retrouvent dans la masse d'eau et contribuent notablement à la dégradation de la qualité de l'eau. Le même constat a été observé sur l'Elorn : en vives eaux le sédiment contamine de manière significative l'eau surnageante.

### III - ETUDE DE LA CONTAMINATION D'UN SEDIMENT \* (OUEST-COTENTIN)

La côte ouest du Cotentin est utilisée essentiellement pour la mytiliculture et l'exploitation conchylicole est périodiquement menacée par des contaminations fécales. Le Remi, Réseau Microbiologique de surveillance et de contrôle de la qualité des eaux conchylicoles, met en évidence des dépassements périodiques des normes de salubrité (300 CF/100 ml dans la chair de coquillages) (Beliaeff et Cochard (1995) ; DDASS-IFREMER, 1988, 1989, 1992).

L'objectif de notre étude était d'évaluer les deux sources potentielles de contamination : les eaux des havres et le sédiment. Pour cela, des études ont été réalisées *in vitro* sur le potentiel de décantation des eaux de la Vanlée et *in situ* sur la contamination des sédiments côtiers.

#### a) Etude de la décantation des eaux de la Vanlée

Les expériences ont été réalisées *in vitro* dans la colonne à sédimentation décrite précédemment.

La caractérisation des eaux du havre de la Vanlée, prélevées au point 5, était la suivante :

**30 janvier 1991** : salinité 23 ‰ - Coliformes thermotolérants :  $7.10^2$  UFC/100 ml). Teneur en matières en suspension : 220 mg/l.

**18 mars 1991** : salinité : 31 ‰ - Coliformes thermotolérants  $8.10^2$  UFC/100 ml. Teneur en matières en suspension : 22 mg/l.

30.1.1991			18.3.1991		
Temps	Surface	Fond	Temps	Surface	Fond
0	$7.10^2$	ND	0	$8.10^2$	$8.10^2$
10 mn	$10^3$	$9.10^2$	10	$6.10^2$	$5.10^2$
20 mn	$10^3$	$9.8.10^2$	20	$5.10^2$	$3,5.10^2$
60 mn	$8.9.10^2$	$7.3.10^2$	60	$3,2.10^2$	$5,2.10^2$
2 h 00	$8.7.10^2$	$7.9.10^2$	2 h 00	$5.10^2$	$5.10^2$
3 h 00	$7.5.10^2$	$8.4.10^2$	3 h 00	$4,5.10^2$	$3,5.10^2$
5 h 00	$6.3.10^2$	$7.5.10^2$	5 h 00	$4.10^2$	$4,5.10^2$

**Tableau 16 :** expériences de décantation des eaux du havre de la Vanlée.  
Concentration en coliformes thermotolérants (CF/100 ml).

- 30 janvier : salinité 23 ‰
- 18 mars : salinité 31 ‰
- MES : 220 mg
- MES : 22 mg/l

Les résultats bactériologiques (tab. 16) montrent une stabilité de la concentration en coliformes : que ce soit en surface ou au fond, les numérations restent identiques quelque soit la charge en particules. Il n'y a pas de décantation significative des contaminants bactériens dans les conditions de notre expérimentation (vitesse de courant nulle) alors que les particules en suspension décantent en quelques minutes (résultats non reportés).

\* Ce travail a été réalisé en collaboration avec Ph. Bassoullet et J. L'Yavanc.

Au débouché des havres on peut donc considérer que seule la dispersion des eaux intervient comme mécanisme physique principal et que le dépôt des bactéries est négligeable. Ces résultats sont différents de ceux trouvés dans l'estuaire de Morlaix (Pommepuy *et al.*, 1991). En effet les bactéries des eaux de l'estuaire de Morlaix décantent plus rapidement puisqu'en deux heures on observe, en surface, une diminution d'un logarithme décimal des concentrations bactériennes. Sur les deux sites les matières en suspension décantent très rapidement.

#### *b) Qualité du sédiment de l'ouest Cotentin*

Nous avons ensuite étudié la qualité bactériologique du sédiment des havres et de la zone mytilicole au débouché de la Vanlée, de façon à confirmer les études de décantation et apprécier l'impact d'éventuelles remises en suspension. En effet, le sédiment, lorsqu'il est riche en matière organique, peut servir de "réservoir" aux micro-organismes d'origine terrigène qui y trouvent un environnement favorable à leur survie en zone littorale (cf. rade de Brest). Dans le cas de l'Ouest-Cotentin, il s'agit d'un site ouvert dont les sédiments sont sableux.

Des prélèvements ont eu lieu les 4 et 5 décembre 1990 (havre de la Vanlée et zone mytilicole) (Fig. 14a) et le 9 avril 1991 (havre de la Vanlée et havre de Regnéville).

#### **Le havre de la Vanlée**

En ce qui concerne la granulométrie (tab. 17), seuls deux échantillons à l'intérieur du havre de la Vanlée appartiennent à la classe des sables vaseux, les autres sont des sables pratiquement purs (pourcentage d'éléments fins (< 40 µm) est inférieur à 2,5 %).

Prélèvements	Médiane en µm	% éléments fins (< 40 µm)	% Matière organique totale	% Carbone organique Total
Vanlée 1	125	22,0	0,79	0,46
Vanlée 2	120	33,5	1,29	0,75
Vanlée 3	251	0	ND	< 0,01
Vanlée 4	265	0	ND	< 0,01
Vanlée 5	237	0	ND	< 0,01
Vanlée 6	189	0	0,02	< 0,01
Vanlée 7	290	0	ND	< 0,01
Vanlée 8	240	0	0,03	0,02
Vanlée 9	180	0	0,03	0,02
Vanlée 10	167	0	0,05	0,03
Vanlée 11	208	1,5	0,02	0,01
Vanlée 13	220	0,9	0,03	0,02
Vanlée 14	175	2,4	0,07	0,04
Vanlée 15	224	0,1	ND	< 0,01
Vanlée 16	340	0	0,02	0,01
Vanlée 17	180	0,8	0,07	0,04
Vanlée 18	162	0,9	0,16	0,09
Vanlée 19	207	2,1	0,29	0,17
Vanlée 20	172	0	0,14	0,08

**Tableau 17 : Caractéristiques des sédiments du havre de la Vanlée 4-5 décembre 1990 (Lafond, 1992)**

Les teneurs en matières organiques sont en moyenne assez fortes dans la partie interne du havre de la Vanlée : (supérieur à 0,8 %) et en relation avec la présence de sédiments fins. Dans la partie externe de la Vanlée, les teneurs en carbone organique sont à la limite des valeurs mesurables pour le sédiment total.

Pour ce qui est de la bactériologie (figure 32) on constate que seule la partie amont (points 1 et 2) est fortement contaminée en germes-test de pollution fécale. La partie aval et le débouché du havre présentent un sédiment peu contaminé, mais les concentrations en coliformes et streptocoques fécaux sont à nouveau élevées dans la zone des bouchots. Le relargage de fèces par les moules à certains moments de la marée (flot) pourrait expliquer en partie cette remontée des contaminations au niveau des bouchots.

Des prélèvements ont été également réalisés le 9 avril : la contamination en coliformes évaluée sur Drigalski à 42 °C (D42) était plus homogène sur les points échantillonnés (1 à 6) et dix fois plus élevée ( $10^3$  à  $5.10^3$  UFC/100 g) alors qu'en décembre, les valeurs en coliformes thermotolérants dans le havre étaient autour de  $10^2$  UFC/100 g. En avril, le point 4 est le plus contaminé, il est situé à la sortie du ruisseau des Hardes.

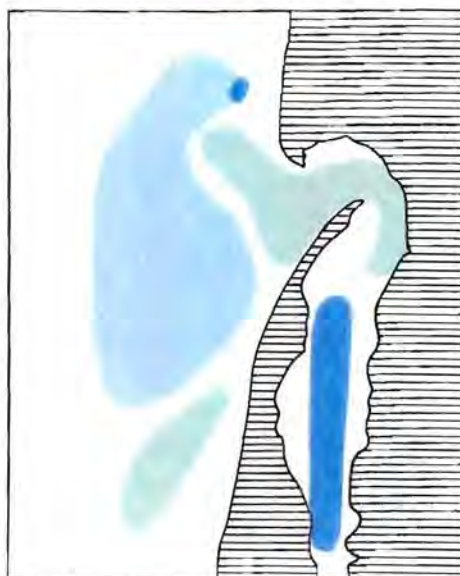
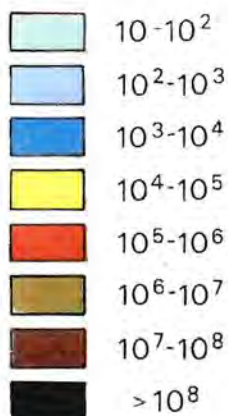
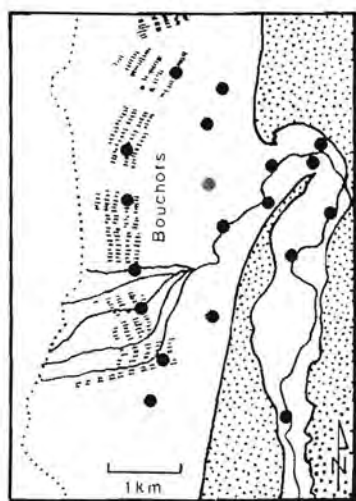
### **Le havre de Regnéville**

Pour compléter cette approche et au vu des résultats granulométriques, des échantillons de sédiments ont été prélevés les 2 et 9 avril 1991 dans le havre de Regnéville, de l'aval au niveau de l'épi de Regnéville-sur-Mer jusqu'en amont, au débouché de la Sienne et de la Soulle (pont de la Roque) (fig. 33). D'une manière globale les sédiments de ce havre sont plus fins, plus chargés en matière organique et plus contaminés que ceux du havre de la Vanlée ; le 2 avril les concentrations en coliformes (D42) étaient pratiquement toutes supérieures à  $10^4$  UFC/100 g ; le 9 avril des valeurs très élevées ont été trouvées près de l'épi extérieur ( $10^5$  UFC/100 g) et en amont (pont de la Roque).

### *c) Conclusions*

Les études de décantation mettent en évidence un très faible pouvoir de décantation des coliformes thermotolérants présents dans les eaux du havre de la Vanlée, puisqu'en cinq heures aucun abattement n'est observé en laboratoire. Ces résultats sont différents de ceux trouvés à Morlaix sur des mélanges eaux usées-eaux d'estuaire puisqu'à Morlaix 90 % des bactéries décantent en 2 heures. Milne *et al.* (1986) ont comparé la décantation des eaux d'effluents (traitement primaire) avec celles d'eaux de l'estuaire de la Clyde. Ces auteurs montrent que la décantation des coliformes thermotolérants et des matières en suspension de l'estuaire est corrélée avec les teneurs en matières en suspension (entre 25 et 100 mg/l) et est fonction du temps. Dans nos expériences aucune décantation n'a été observée que ce soit en faible charge (22 mg/l - 18 mars 1991) ou forte charge (220 mg/l - 30 janvier 1991).

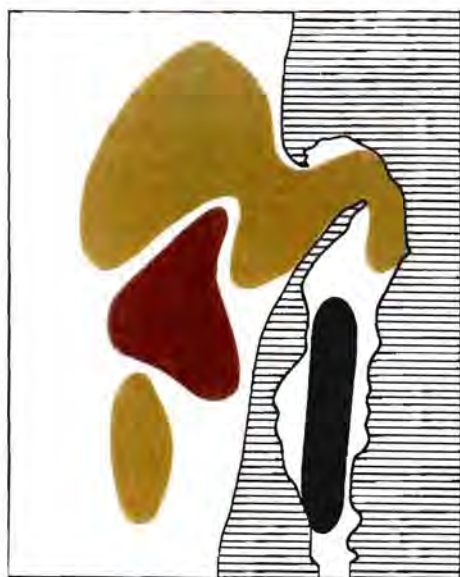
Figure 32 : Qualité bactériologique du sédiment - 4 et 5 décembre 1990. Havre de la Vanlée. Coliformes thermotolérants - Streptocoques fécaux - Flore hétérotrophe d'eau douce (TD 20 °). Exprimés pour 100 g.



Coliformes thermotolérants

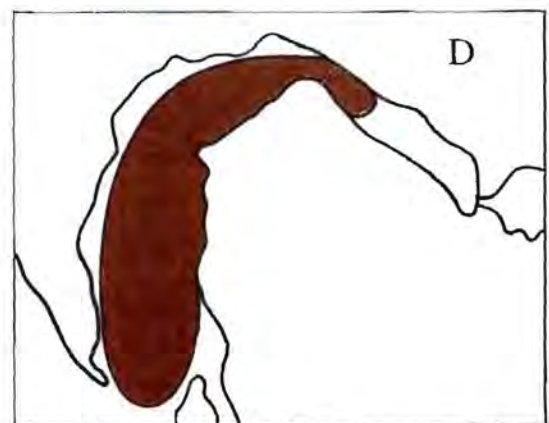
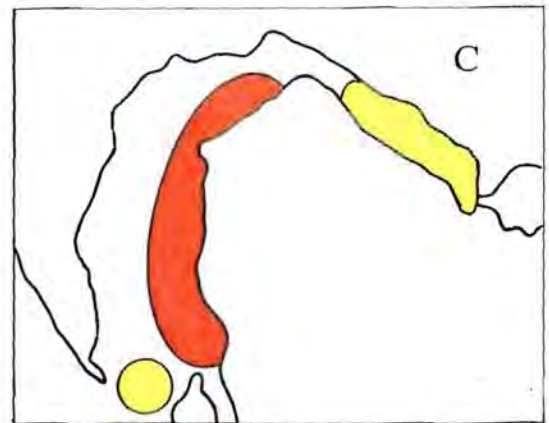
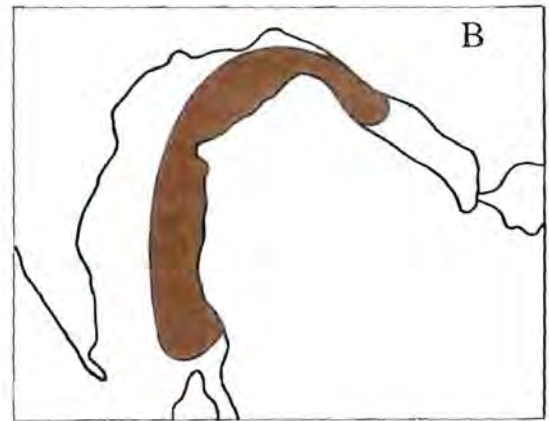
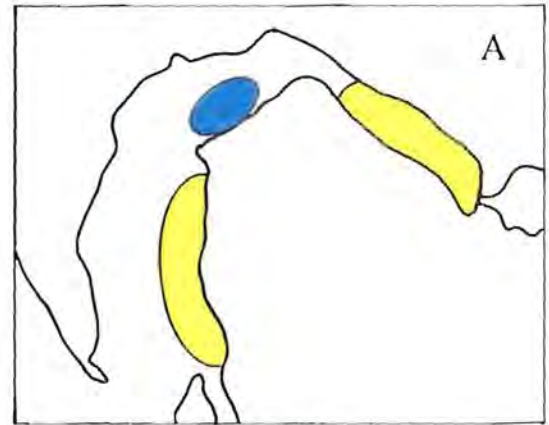
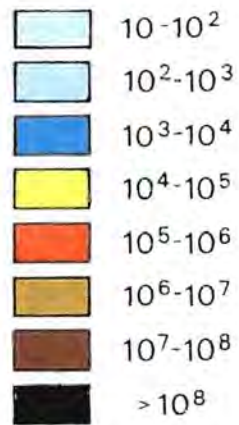
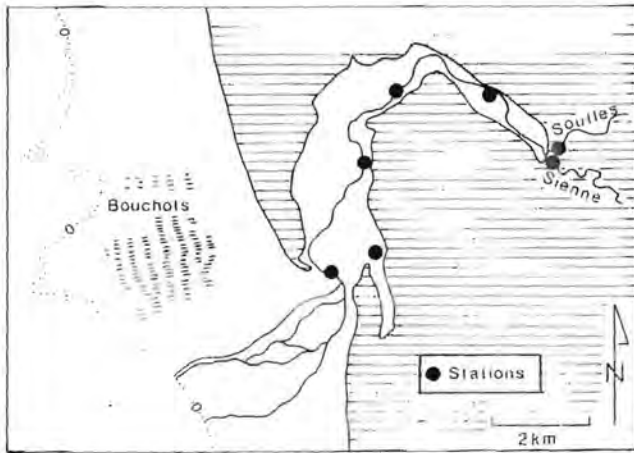


Streptocoques fécaux



Flore hétérotrophe (TD 20°)





**Figure 33 :** Qualité bactériologique du sédiment - 2 et 9 avril 1991. Havre de Regnéville.  
 2 avril 1991 : A : coliformes (D 42°) - B : Flore hétérotrophe (TD 20°)  
 9 avril 1991 : C : coliformes (D 42°) D : flore hétérotrophe (TD 20°)  
 Exprimés pour 100 g.

En ce qui concerne la **contamination des sédiments sur une côte ouverte Atlantique**, on constate que seuls les sédiments vaseux des havres (amont de Regnéville et de la Vanlée) présentent une contamination en coliformes thermotolérants. Dès que la granulométrie augmente et que le pourcentage de vase et de matière organique diminue, cette contamination devient faible à très faible. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus à Morlaix (Guillaud, 1988) : sur ce site les sédiments sont très fins (en amont 28 à 44 % des particules sont inférieures à 19  $\mu\text{m}$  et 51 à 67 % de 19 à 77  $\mu\text{m}$ ) et très contaminés. Lorsque les prélèvements présentent des pourcentages en vase plus faibles (dans la baie) la contamination fécale diminue ; une forte corrélation en bactérie fécale et carbone organique a été démontrée (Pommepuy *et al.*, 1991).

Le rôle du sédiment sur la contamination de la zone Ouest Cotentin semble très limité, sauf en cas de "chasse" des sédiments fins stockés en amont du havre de la Vanlée ou d'expulsion lors des crues des sédiments de Regnéville (plus organiques, plus fins et donc plus contaminés) vers les parcs de la Vanlée.

L'ensemble des résultats de cette étude indique que la source de pollution principale est très certainement l'eau qui baigne les bouchots, et principalement celle issue des havres et qui s'écoule sur les parcs à marée basse ou lors du jusant.

**IV - Article 2 :**  
**Rejets urbains et contamination fécale.**



# Rejets urbains et contamination fécale

Bactéries fécales  
*E. coli*  
Halotolérance  
Temps de survie  
Intensité lumineuse

Fecal bacteria  
*E. coli*  
Salt tolerance  
Die-off rate  
Light intensity

Monique POMMEPUY<sup>a</sup>, Elisabeth DUPRAY<sup>a</sup>, Jean-François GUILLAUD<sup>a</sup>,  
Annick DERRIEN<sup>a</sup>, Jacky L'YAVANC<sup>a</sup> et Michel CORMIER<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), B.P.  
70, 29280 Plouzané, France.

<sup>b</sup> U.E.R. de Sciences Pharmaceutiques, Université de Rennes, 35043 Rennes  
Cedex, France.

## RÉSUMÉ

Une étude sur le devenir de la flore d'origine fécale a été réalisée dans un estuaire turbide à vocation ostréicole. Les études de décantation de l'eau du rejet montrent que les particules qui sédimentent en quelques heures sont peu chargées en bactéries, mais peuvent néanmoins contaminer les vasières ; dans le sédiment, la contamination fécale est bien corrélée avec le pourcentage de matière organique. Les bactéries restées en suspension se mélangent aux eaux de l'estuaire et peuvent survivre très longtemps (les T90 atteignant plusieurs jours). Les études montrent que la présence de matière organique a pour conséquence d'augmenter l'halotolérance de souches d'*E. coli* et *Salmonella*, qui sont alors capables de supporter les augmentations de salinité de l'estuaire. De plus, les matières en suspension, en arrêtant la pénétration de la lumière dans l'eau, réduisent l'effet bactéricide du soleil ; une corrélation entre les T90 et l'intensité lumineuse reçue par les bactéries a été établie. Ces mécanismes seraient responsables des temps de survie particulièrement longs observés dans les zones estuariennes.

*Oceanologica Acta*, 1991. Actes du Colloque International sur l'environnement des Mers épicontinentales, Lille, 20-22 mars 1990, vol. sp. n° 11, 321-327.

## ABSTRACT

### Urban waste disposal and fecal contamination

The behaviour of fecal bacteria was investigated in a turbid estuary which is also a shellfishing area. Sediments are polluted by sewage by the way of settlement, fecal bacteria mixed with estuarine water being able to survive a very long time (T90 are about several days). By measuring the increase of salt tolerance of the strains grown in natural estuarine organic matter, it was demonstrated that *E. coli* is able to support the salinity of coastal water.

Moreover, because light penetration is obstructed by suspended matter, the solar bactericidal effect is very low. A close relationship between T90 and light intensity received by the bacteria is found. These mechanisms can explain the low die-off rate found in turbid areas.

*Oceanologica Acta*, 1991. Proceedings of the International Colloquium on the environment of epicontinental seas, Lille, 20-22 March, 1990, vol. sp. n° 11, 321-327.

Le devenir en mer des bactéries d'origine entérique a fait l'objet de nombreux travaux tant *in situ* (Harremoës, 1975 ; Fujioka *et al.*, 1981 ; Grimes and Colwell, 1986 ; Rhodes et Khator, 1988 ; El Sharkawi *et al.*, 1989), qu'*in vitro* (Gameson et Gould, 1985 ; Bonnefont *et al.*, 1990).

Ces études ont permis de dégager les différents paramètres responsables de la disparition des bactéries en mer (Carlucci et Pramer, 1960 ; Mitchell et Chamberlin, 1975 ; Crane et More, 1986) : température, salinité, ensoleillement, absence de nutriments, prédatons. La disparité des résultats, mise en évidence par Plusquellec (1984), tient souvent au fait que, lors de l'étude de ces phénomènes, les auteurs ont des conditions expérimentales très différentes les uns des autres.

Très peu d'études ont pris en compte les milieux côtiers estuariens riches en apports organiques, et qui sont le siège d'une activité ostréicole importante : dans ce type de milieu récepteur, régi par un fort hydrodynamisme et où les polluants peuvent sédimenter sur de vastes vasières découvrantes et être remis en suspension dans les eaux turbides, il nous a paru intéressant d'étudier le devenir de la flore fécale.

Le but de cette étude était donc d'évaluer, dans cet environnement particulier, le rôle des différents paramètres responsables du devenir des bactéries. Pour ce faire, des travaux ont été menés tant *in situ* (prélèvements, chambres à diffusion) qu'au laboratoire (étude de l'halotolérance, survie en enceinte fermée, décantation en colonne).

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Présentation du site

L'estuaire de Morlaix, situé sur la côte de Bretagne Nord, est le lieu d'une activité conchylicole importante dans la partie la plus ouverte de la baie et sur les bancs découvrants. Les normes régissant la qualité des coquillages exigent des concentrations en bactéries fécales inférieures à 300 coliformes fécaux/100 g de chair de coquillages et les contrôles effectués dans cette région indiquent certains dépassements de cette norme. Les principaux rejets apportant une pollution bactérienne sont situés en amont de la baie (rivière du Dourduff), ou en tête d'estuaire : rivière de Morlaix et rejets de la station d'épuration. Cette station biologique traite environ 20 000 équivalents/habitants et des effluents peuvent être by-passés directement dans l'estuaire. L'étude des flux met en évidence l'importance de cette partie du rejet non épuré par rapport aux autres rejets bactériens. En effet, il peut représenter près de dix fois les apports de la rivière de Morlaix (Salomon et Pommepuy, 1990).

## Prélèvements d'échantillons

Des prélèvements de sédiments ont été effectués sur le site dans différentes conditions saisonnières et hydrodynamiques : en été, en mortes eaux (2 juin 1987) et vives eaux (11 juin 1987) ; en hiver, en mortes eaux (14 octobre 1987-24 mars 1988) et vives eaux (22 octobre 1987-16 mars 1988). Les échantillons sont prélevés à marée basse, et seul le film superficiel est échantillonné. Quelques carottes ont été également prises en utilisant des tubes en PVC préalablement nettoyés et stérilisés à l'alcool. Les échantillons sont gardés au froid (4 °C) et traités le plus rapidement possible (délai de 4 à 10 h). La flore totale est numéree par épifluorescence (Hobbie *et al.*, 1977) ; la flore hétérotrophe est isolée sur milieu trypticase-soja (AES laboratoires) incubée cinq jours à 20 °C ; la flore fécale est isolée sur milieu de Drigalski (AES lab.) ; ce milieu a été préalablement utilisé par Pommepuy *et al.* (1987) ; il est sélectif des bacilles à Gram négatif incubés à 42 °C pendant 24 heures. Seuls les bacilles fermentant le lactose sont comptés. Les identifications montrent que 60 % environ de ces bactéries sont des entérobactéries, dont *E.*

## DECANTATION DES EAUX DE L'ESTUAIRE DE MORLAIX

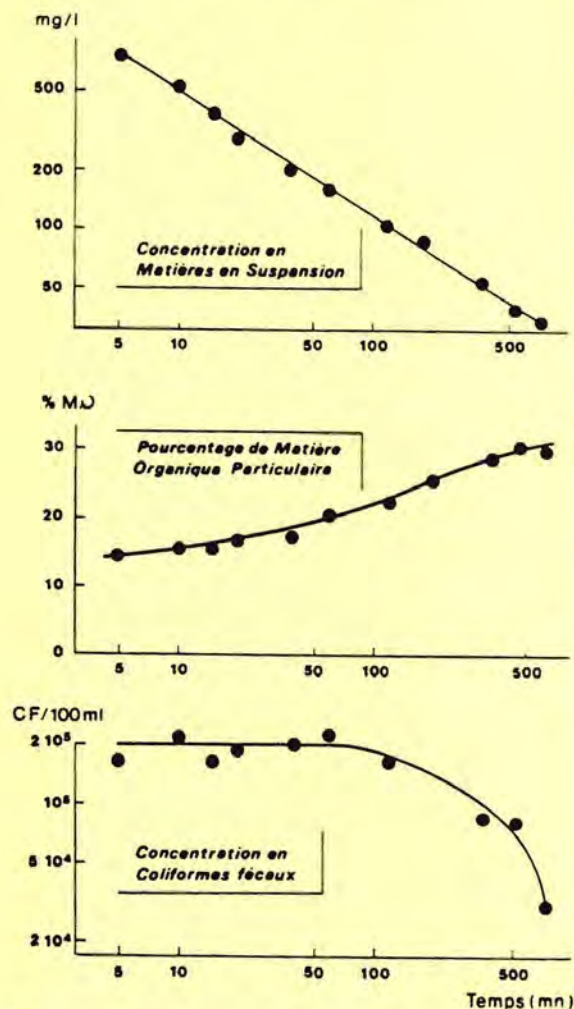


Figure 1

Decantation des eaux de l'estuaire de Morlaix.

Settlement experimentation of estuarine water from Morlaix estuary.

*coli* représente entre 40 et 90 % de la population. le reste étant des *Klebsiella citrobacter*, *enterobacter*, etc.

#### Étude de l'halotolérance

1) L'halotolérance de 112 souches d'*E. coli* isolées d'eau, de sédiments de l'estuaire et de la station d'épuration de Morlaix a été étudiée en milieux synthétiques :

- milieu minimum M63 (Cohen et Rickenberg, 1956) + 10 mM glucose,
- M63 + glycine bêtaïne (GB) 1 mM, composé osmoprotecteur (Le Rudulier et Bouillard, 1983),
- bouillon trypticase-soja (AES lab.). Chaque souche, en fin de phase exponentielle de croissance en bouillon trypticase-soja, est centrifugée, et lavée trois fois en eau physiologique (9 g/l NaCl). Sept concentrations de NaCl (0, 10, 20, 30, 40, 50 et 60 g/l) sont testées pour chaque milieu et réparties en microplaques de titration.

L'inoculum est d'environ  $10^6$  bactéries/ml. Après 24 heures d'incubation à 37 °C, on observe la croissance dans chaque puit de microplaque.

2) D'autre part, l'halotolérance de 23 souches d'*E. coli* et de 19 souches de *Salmonella* a été recherchée en présence de matière organique naturelle. Le milieu M63 a été fabriqué avec différents prélèvements d'eau de l'estuaire de Morlaix, autoclavés 15 minutes à 110 °C. Sept concentrations de NaCl ont été testées, et les conditions de culture sont identiques au (1).

#### Étude des lois de décroissance

Des expérimentations de décroissance d'*E. coli* en eau de mer ont été conduites en laboratoire dans des enceintes fermées, et *in situ* dans des chambres à diffusion. En laboratoire des flacons de 2 l, remplis d'eau de mer stérilisée par filtration à 0,22 µm sont maintenus à 18 °C dans un bac thermostaté agité et exposé au soleil. Des flacons témoins, placés dans les mêmes conditions, sont protégés de la lumière par du papier d'aluminium.

*In situ*, les chambres à diffusion (protocole détaillé dans Salomon et Pommepuy, 1990) sont immergées à différentes profondeurs. Les expériences ont été réalisées en hiver et en été dans diverses conditions d'ensoleillement. L'intensité lumineuse, mesurée à l'aide d'un appareil Licor, Li. 1000 est exprimée en  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ .

La souche utilisée pour ces expériences est un *E. coli* H 10407 fournie par le Professeur Joly (Université de Clermont-Ferrand). Les cellules, en phase exponentielle de croissance en bouillon trypticase-soja (AES) sont lavées trois fois à l'eau physiologique (9 g/l NaCl), et centrifugées à 4 °C durant 15 minutes à 1 900 g. La concentration initiale des flacons et des chambres à diffusion est d'environ  $5 \cdot 10^5$  bactéries/ml. Des numérations sont réalisées à intervalle de temps régulier sur milieu de Drigalski, incubé 24 heures à 37 °C.

#### Étude de la décantation des eaux d'estuaire

Elles est réalisée en laboratoire à 20 °C environ, dans une colonne de verre de 2 m de hauteur et 25 cm de diamètre

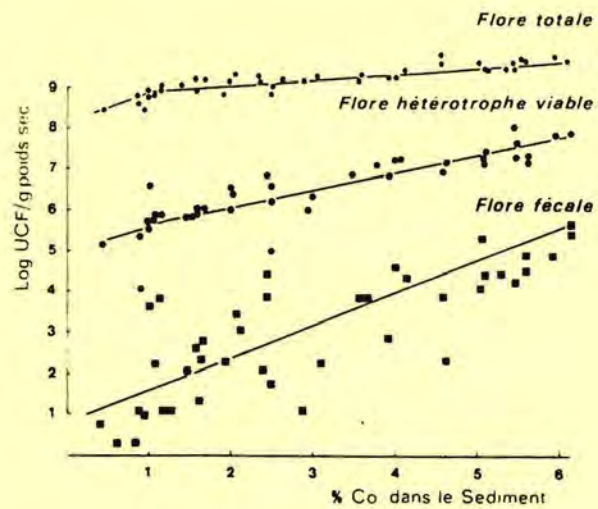


Figure 2

Relations entre le pourcentage de carbone organique et les flores bactériennes du sédiment-estuaire de Morlaix (coefficients de corrélation avec la matière organique : flore totale ( $r = 0,87$ ) ; flore hétérotrophe ( $r = 0,87$ ) ; coliformes fécaux ( $r = 0,78$ ) avec  $n = 40$ ).

*Relationships between the percentage of organic carbon and the bacterial flora in the sediment-Morlaix estuary (correlation coefficient with organic carbon : total flora ( $r = 0,87$ ) ; heterotrophic flora ( $r = 0,87$ ) ; fecal coliforms ( $r = 0,78$ ) with  $n = 40$ ).*

équipée de systèmes de prélèvements situés sur la paroi tous les 50 cm (Prolabo). L'eau utilisée est prélevée dans l'estuaire à environ 500 m en aval de la station d'épuration ; la colonne une fois remplie est homogénéisée ; les prélèvements sont fait selon une échelle de temps logarithmique, et on effectue quatre types d'analyse : 1) les matières en suspension par filtration sur filtre de porosité 0,45 µm, séchage à 70 °C durant 2 h et pesée (Aminot, 1983) ; 2) la matière organique particulaire après séchage à 500 °C et pesée ; 3) les numérations bactériennes (Drigalski (AES) à 42 °C, 24 h) ; 4) le diamètre moyen des particules à l'aide d'un Coulter Counter TA2.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Le devenir des bactéries rejetées dans l'estuaire sera fonction, d'une part des lois de la dynamique (dispersion - sédimentation), d'autre part des lois biologiques (changement du métabolisme, adaptation, mortalité).

#### La contamination du sédiment

Le flux polluant issu de la station d'épuration se mélange aux eaux souvent turbides de l'estuaire, et l'étude de leur comportement a été réalisée en laboratoire afin de connaître leur capacité à sédimenter. Les eaux turbides ( $> 500$  mg/l), fortement chargées en bactéries ( $2 \cdot 10^5$  coliformes fécaux/100 ml), et dont le pourcentage de matière organique particulaire est de 15 %, ont été placées dans la colonne à sédimentation. La figure 1 présente un des résultats obtenus à 1 m de la surface ; on constate que les teneurs en matières en suspension

diminuent très vite en fonction du temps, tandis que les concentrations bactériennes restent stables durant les deux premières heures ; ce n'est qu'après cette période qu'une diminution des concentrations bactériennes intervient. Ces résultats montrent qu'en début d'expérience, l'on a une décantation, importante en masse, des particules les plus grossières (diamètre moyen de 24  $\mu\text{m}$  à  $T_0 + 5 \text{ mn}$ ) et peu chargées en bactéries ; ce n'est que dans un deuxième temps que les particules les plus fines (diamètre moyen de 8  $\mu\text{m}$  à  $T_0 + 500 \text{ mn}$ ), riches en matière organique et en bactéries, sédimentent.

Dans l'estuaire, lorsque les conditions hydrodynamiques s'y prêtent, par exemple durant les étales de courants, ou bien lorsque la hauteur d'eau est très faible, les eaux peuvent contaminer le sédiment ; des carottes prélevées dans l'estuaire montrent que la pollution est très superficielle et intéresse essentiellement le premier centimètre ; cependant, à 10 cm de profondeur, alors que le milieu est anoxique, on trouve encore des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux ; ces derniers décroissent moins vite en fonction de la profondeur que les coliformes fécaux (Pommepuy *et al.*, 1989). D'autre part, il existe une corrélation entre la teneur en matière organique du sédiment et sa contamination fécale. Sur la figure 2 sont reportés les résultats obtenus durant les campagnes de mesures effectuées en 1987. On constate que les fortes valeurs en matière organique et en flore fécale correspondent aux points situés en amont, à proximité des rejets. Lorsque l'on s'éloigne de la zone d'apport, les deux paramètres diminuent en même temps. La flore fécale ne constitue dans ce secteur le plus contaminé qu'une partie de l'ensemble de la flore totale et de la flore hétérotrophe cultivable (respectivement

1/10 000 et 1/100) : dans la partie aval, ces proportions diminuent, les bactéries fécales ne représentant alors qu'une fraction infime de l'ensemble de la flore bactérienne (1 bactérie fécale pour  $10^7$  bactéries totales et pour  $10^4$  bactéries hétérotrophes).

### La contamination de l'eau

Le devenir des bactéries dans l'eau dépend des différents processus physiques et biologiques. En ce qui concerne les phénomènes de courantologie, de dispersion et de remise en suspension, ils sont régis par des lois classiques bien connues et ils ont été modélisés sur le site de Morlaix (Salomon et Pommepuy, 1990 ; Le Hir *et al.*, 1990). Les lois biologiques sont par contre assez mal connues, et l'un des buts de cette étude était de préciser le rôle de la matière organique, de la salinité et de la lumière sur la mortalité des bactéries fécales dans la zone estuarienne.

### L'halotolérance des bactéries

Parmi les stress subis par les bactéries d'origine entérique arrivant en milieu marin, l'un des principaux est exercé par la salinité. Le rétablissement de l'équilibre osmotique entre le milieu extérieur et le cytoplasme bactérien met en jeu, dans certaines conditions, des mécanismes variés qui évitent la lyse de la cellule.

Très schématiquement, ces mécanismes font appel à une augmentation de la concentration de certains solutés dans la bactérie. Ils ont été décrits, chez *E. coli* notamment, mais aussi chez *Salmonella* et *Klebsiella*. On peut citer, comme principaux composés osmoprotecteurs (revue bibliographique de Csonka, 1989) : le potassium, les acides aminés, la glycine bêtaïne, le tréhalose.

Des travaux récents ont montré que de la glycine-bêtaïne pouvait être accumulée par *E. coli* en présence de sédiments estuariens, riches en matière organique (Ghoul *et al.*, 1990).

Dans nos expériences, l'halotolérance des 112 souches d'*E. coli* issues de l'environnement a tout d'abord été testée en milieux synthétiques : on constate (fig. 3) que 100 % des bactéries croissent en milieu minimum à une salinité de 10 g/l ; à 20 g/l, 75 % des souches présentent encore une croissance. L'ajout de glycine-bêtaïne à ce milieu de culture induit une meilleure tolérance au sel, puisque 96 % des bactéries supportent alors 30 g/l et environ 50 %, 40 g/l de NaCl. De plus le milieu BT riche en peptones, acides aminés, accroît encore cette halotolérance.

Ces résultats ont été confirmés par des études d'halotolérance effectuées avec de l'eau côtière naturelle. Sur la figure 4 sont reportés des résultats de culture obtenus dans des eaux naturelles d'estuaire dont les teneurs en matière organique varient entre 11 et 52 mg/l. L'augmentation de l'halotolérance est reportée en ordonnée : il s'agit de la différence entre les résultats obtenus en milieu minimum (halotolérance intrinsèque) et en milieu minimum additionné de matière organique naturelle ; on constate que, dans les eaux estuariennes, l'halotolérance peut être augmentée de 5 à 20 g/l. Dans ces conditions, la

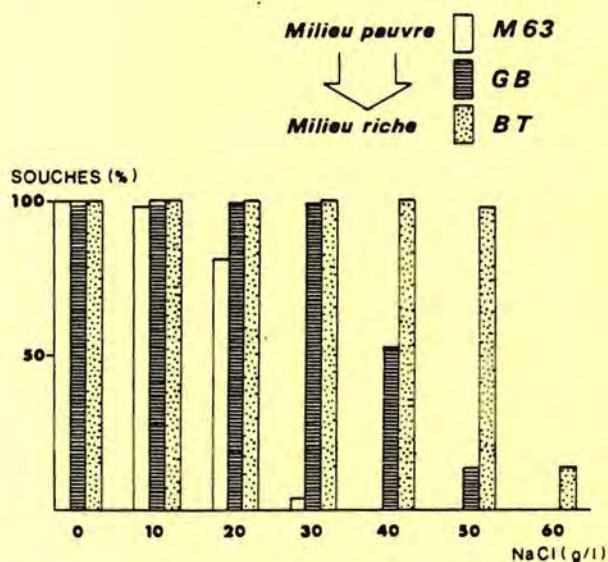


Figure 3

Halotolérance de 112 souches de *E. coli* dans différents milieux : milieu minimum M63, M63 + glycine-bêtaïne (GB), et bouillon trypticase-soja (BT).

Comparative salt tolerance of 112 *E. coli* strains using different media : minimal medium M63, M63 + glycine-bêtaïne (GB), and tryptic-soy broth (BT).

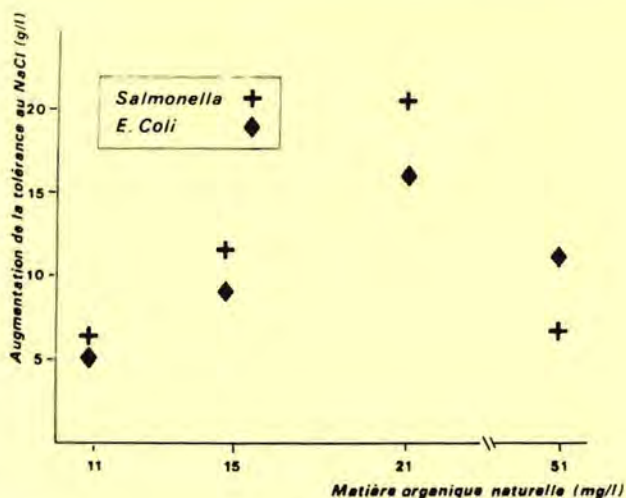


Figure 4

Augmentation de l'halotolérance de souches de *E. coli* et *Salmonella*, en présence d'eaux de l'estuaire de Morlaix.

*Increase of salt tolerance of E. coli and Salmonella strains with estuarine waters.*

présence d'éléments nutritifs ou d'osmoprotecteurs permet la survie de la bactérie à des salinités tout à fait compatibles avec celle de l'eau côtière, (généralement inférieure à 38). Le cas de l'eau chargée à 52 mg/l en matière organique et ne permettant qu'une faible augmentation de l'halotolérance est caractéristique des problèmes de «qualité» de matière organique, qui peut comporter des substances favorables, mais également des inhibiteurs (métaux lourds, détergents...).

#### Effet de la lumière sur la mortalité

Dans le milieu marin, le pourcentage de transmission de la lumière varie en fonction de la turbidité. C'est ainsi que, dans une eau peu chargée en matières en suspension (1 mg/l), environ 80 % de l'intensité lumineuse est transmise dans les cinq premiers mètres, alors que dans une eau plus turbide (10 mg/l), le pourcentage de lumière transmise n'est plus que de 20 % ; une augmentation de la profondeur aura des conséquences similaires. Dans la baie de Morlaix, selon les conditions hydrodynamiques, la turbidité des eaux sur les parcs conchylicoles peut varier de 5 à plus de 50 mg/l, lors des fortes crues ou des périodes de clapot. La figure 5 présente les résultats obtenus lors des expériences de mortalité réalisées en juin 1989 en baie de Morlaix à l'aide des chambres à diffusion. Le mouillage était situé à l'ouverture de la baie, dans une eau homogène ayant une salinité de 35, une turbidité de 3 mg/l et une température de 15 °C ; les chambres étaient immergées à 2 m, 5 m et 10 m de profondeur ; une chambre noire était utilisée comme contrôle. L'intensité lumineuse était mesurée en continu sous la surface ; le coefficient d'extinction de l'eau a été mesuré pour calculer la quantité de lumière reçue par les bactéries aux différentes profondeurs ; les cellules d'*E. coli* immergées à 2, 5 et 10 m ont reçu des intensités maximales respectivement de 1 200  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , moins de 500  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  et moins de 100  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ . Les numérations bactériennes sont reportées sur la figure 5 ; à

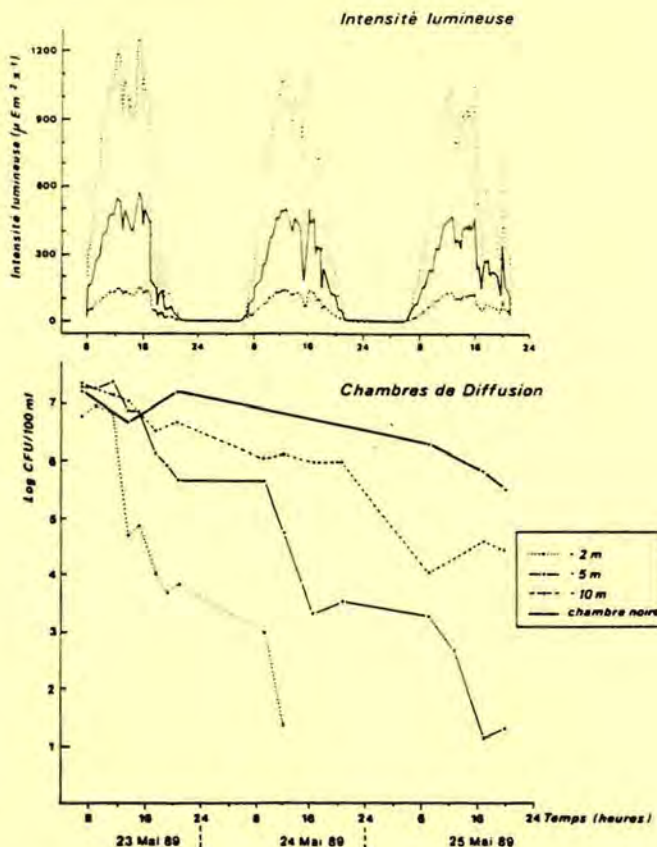


Figure 5

Intensité lumineuse et décroissance d'*E. coli*. Expériences *in situ*, mai 1989 (chambres à diffusions-immersion 2, 5 et 10 m). Salinité 35; turbidité 3 mg/l; température moyenne 15 °C.

*Light intensity and survival of E. coli in replicate diffusion chambers held at depths of 2, 5 and 10 m. May 1989. Salinity 35; turbidity 3 mg/l; mean temperature 15 °C.*

2 m, le nombre de bactéries cultivables chute très rapidement ( $T_{90}^*$  : 3 heures), et on observe un arrêt de la décroissance bactérienne pendant la nuit ( $T_{90}$  : 14 heures) ; le second jour, à ce même niveau, les numérations à la mi-journée sont inférieures à 10 *E. coli*/ml. A 5 m, les numérations bactériennes chutent sensiblement moins vite ( $T_{90}$  : 7 heures) ; comme pour le niveau supérieur, on note des paliers durant la nuit. A 10 m, les vitesses de décroissance sont nettement inférieures à celles observées aux autres niveaux ( $T_{90}$  : 17 heures).

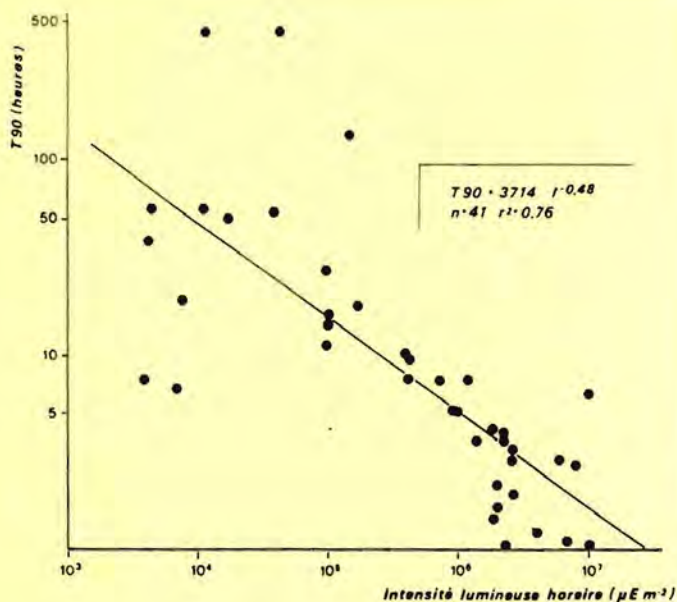
Il est possible, à partir de ces résultats, de corréler les taux de mortalité obtenus avec l'intensité reçue par la cellule pendant une heure. Sur la figure 6 est reporté l'ensemble des résultats obtenus lors des expériences réalisées en laboratoire et *in situ* pour différentes conditions d'ensoleillement ; on constate qu'il existe une bonne corrélation entre les deux paramètres ( $T_{90} = 3714 I^{-0.48}$ ,  $n = 41$ ,  $r^2 = 0,76$ ). Pour de fortes intensités lumineuses ( $> 10^6 \mu\text{E m}^{-2} \text{h}^{-1}$ ), correspondant à des éclaircissements estivaux dans des eaux claires et en surface, les  $T_{90}$  sont inférieurs à 5 heures ; lorsque l'intensité diminue, du fait de la couverture nuageuse, de la profondeur ou de la turbidité, les  $T_{90}$  (= temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne cultivent plus) augmentent et peuvent alors



Figure 6

Corrélation entre les valeurs de T90 et l'intensité lumineuse. Résultats obtenus *in vitro* et *in situ*, estuaire de Morlaix.

Relationship between T90 values and the hourly light intensity. Survival trials in field and flasks. Morlaix estuary.



varier de quelques dizaines d'heures à quelques jours. On observe, par ailleurs, une plus grande dispersion des points à l'obscurité : en absence d'ensoleillement, d'autres paramètres pourraient alors jouer un rôle dans les phénomènes de mortalité ou de survie de la bactérie, comme par exemple la teneur en éléments nutritifs, la température, ou l'état physiologique de la bactérie, etc.

## CONCLUSIONS

Dans les systèmes côtiers estuariens, la présence de matière en suspension et de matière organique confère au milieu des caractéristiques spécifiques favorables à une mortalité lente des bactéries ; la matière organique naturelle possède des éléments nutritifs et des osmoprotecteurs qui permettent à la bactérie de lutter

efficacement contre le stress osmotique. Des résultats semblables ont été obtenus *in vitro* (Bonfont *et al.*, 1990) et au niveau du sédiment (Ghoul *et al.*, 1990). Indirectement, en arrêtant la lumière, les matières en suspension contribuent à augmenter les temps de survie. Ces travaux réalisés en baie de Morlaix semblent expliquer les T90 très longs trouvés en Manche atlantique (Pompey *et al.*, 1987 ; Institut Pasteur de Lille, 1985) et en eau saumâtre (Alibou, 1987). Ils pourraient expliquer également pourquoi, dans les eaux pauvres et bien ensoleillées, les auteurs observent des T90 très courts (Chamberlin et Mitchell, 1978 ; Bellair *et al.*, 1977).

## Remerciements

Nous remercions P. Bassoullet pour ses conseils et sa participation lors des travaux sur la sédimentologie.

## RÉFÉRENCES

- Alibou J. (1987). Étude de l'évolution simultanée des abondances et de la survie de *Salmonella* et des coliformes fécaux dans différents ouvrages épurateurs et milieux aquatiques. Thèse de Doctorat. Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, 218 pp.
- Aminot A. (1983). Mesure des matières en suspension, in : Manuel des analyses chimiques en milieu marin, Centre National pour l'Exploitation des Océans (CNEXO), 1983.
- Bellair J.T., G.A. Parr Smith et I.G. Wallis (1977). Significance of diurnal variation in fecal coliform die off rates in the design of ocean outfalls. *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, septembre, 2022-2030.
- Bonfont J.L., Y.-P. Martin et B. Guiennet (1990). Étude expérimentale de la décroissance des bactéries fécales en milieu marin, quantification, facteurs impliqués. *Wat. Res.*, 24, 3, 267-273.
- Carlucci A.F. et D. Pramer (1960). An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in sea water. I : Experimental procedures. *Appl. Microbiol.*, 8, 243-227.
- Chamberlin E. et R. Mitchell (1978). A decay model for enteric bacteria in natural waters. in : *Water pollution microbiology*. Vol. 2. R. Mitchell, éditeur, 325-348.
- Cohen G.N. et H.V. Rickenberg (1956). Concentration spécifique réversible des amino-acides chez *E. coli*. *Annls Inst. Pasteur*, 91, 693-720.
- Crane S.R. et J.A. Moore (1986). Modelling enteric bacterial die-off ; a review. *Wat. Air Soil Pollut.*, 27, 411-433.
- Csonka L. (1989). Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress, *Microbiol. Rev.*, 53, 1, 121-147.
- El Sharkawi F., L. El Attar, A. Abdek Gaward et S. Malazem (1989). Some environmental factors affecting survival of fecal pathogens and indicator organisms in sea water. *Wat. Sci. Technol.*, 21, 1, 115- 120.
- Fujioka R.S., M.M. Hashimoto, E.B. Siwak et R.H. Young (1981). Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl. environ. Microbiol.*, 41, 3, 690-696.

- Gameson A.L.M. et D.J. Gould** (1985). Bacterial mortality. In : *Investigation of sewage discharge to some British coastal waters*. Part. 2. Chap. 8. Water Research Center. 40 pp.
- Ghoul M., T. Bernard et M. Cormier** (1990). Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine-bétaïne from marine sediments. *Appl. environ. Microbiol.*, **56**, 2. 551-554.
- Grimes D.J. et R.R. Colwell** (1986). Viability and virulence of *E. coli* suspended by membrane chamber in semi tropical ocean water. *FEMS Microbiol. Letts.* **34**. 161-165.
- Harremoës P.** (1975). *In situ* methods for determination of microbial disappearance in sea water. in : *Discharge of sewage from sea outfalls*. A.L.N. Gameson. éditeur. Pergamon Press. New York. 181-190.
- Hobbie J.E., R.J. Daley et S. Jasper** (1977). Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. environ. Microbiol.*, **33**. 1225-1228.
- Institut Pasteur de Lille** (1985). Devenir des germes entériques en Mer du Nord. Contrat IFREMER 83/3046B. juin 1985. 152 pp.
- Le Hir P., J.-F. Guillaud, M. Pommepuy, F. Le Guyader et J.-C. Salomon** (1990). Modélisation du transport dissous et particulaire dans l'estuaire de Morlaix. Application au devenir des bactéries entériques. *La Houille Blanche*, **3/4**. 273-278.
- Le Rudulier D. et L. Bouillard** (1983). Glycine-bétaïne. an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the Enterobacteriaceae. *Appl. environ. Microbiol.*, **46**. 152-159.
- Mitchell R. et C. Chamberlin** (1975). Factors influencing the survival of enteric microorganisms in the sea : an overview. In : *Discharge of sewage from sea outfalls*. A.L.N. Gameson. éditeur. Pergamon Press. 237-251.
- Plusquellec A.** (1984). Contribution à l'étude de la pollution bactérienne des eaux littorales. Cas particulier de la baie de Concarneau-La Forêt. Thèse de 3<sup>ème</sup> cycle. Université de Bretagne Occidentale. Brest. France. 202 pp.
- Pommepuy M., M. Cormier, L. Brunel et M. Breton** (1987). Étude de la flore bactérienne d'un estuaire breton (Élorn-rade de Brest). *Oceanologica Acta*, **10**, 2. 187-196.
- Pommepuy M., J.-F. Guillaud, F. Le Guyader, E. Dupray, et M. Cormier** (1989). Le devenir de la charge bactériologique des sédiments dragués. *Proceeding of the International Seminar on the Environmental aspects of dredging activities*. Nantes. 27 novembre-1<sup>er</sup> décembre 1989.
- Rhodes M.W. et H. Kator** (1988). Survival of *E. coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. environ. Microbiol.*, **54**, 12. 2902-2907.
- Salomon J.-C. et M. Pommepuy** (1990). Mathematical model of bacterial contamination of the estuary of Morlaix (France). *Wat. Res.*, **24**, 8. 931-939.

V - Article 3 :

*Implantation d'Escherichia coli en  
pilote expérimental et influence des  
compétitions de flore.*

## Implantation d'*Escherichia coli* en pilote expérimental et influence des compétitions de flore

FRANÇOISE LE GUYADER<sup>1</sup>

Laboratoire de bactériologie pharmaceutique, Faculté de pharmacie, avenue du Professeur Léon Bernard,  
35043 Rennes CEDEX, France

MONIQUE POMMEPUY

Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, Centre de Brest, B.P. 70, 29263 Plouzane CEDEX, France

ET

MICHEL CORMIER

Laboratoire de bactériologie pharmaceutique, Faculté de pharmacie, avenue du Professeur Léon Bernard,  
35043 Rennes CEDEX, France

Reçu le 7 mars 1990

Accepté le 18 septembre 1990

LE GUYADER, F., POMMEPUY, M., et CORMIER, M. 1991. Implantation d'*Escherichia coli* en pilote expérimental et influence des compétitions de flore. *Can. J. Microbiol.* 37: 116-121.

L'implantation et l'influence des flores bactériennes de l'eau de mer et (ou) du sédiment sur la survie et la croissance d'une souche d'*Escherichia coli* d'origine humaine sont étudiées en pilote expérimental. Le pilote choisi permet de travailler sur de grands volumes d'eau de mer et de sédiment et de préserver la structure de ce dernier. Différentes expérimentations sont réalisées en présence ou en absence des flores bactériennes de l'eau de mer et (ou) du sédiment, pendant 13 jours. *Escherichia coli* est introduit dans le système expérimental dans l'eau de mer, la concentration de l'inoculum variant de 1 à  $3 \times 10^5$  UFC/100 mL. Dans le sédiment stérile, *E. coli*, après une phase de multiplication, s'implante ( $3 \times 10^4$  UFC/100 g à 0 jour et  $4 \times 10^5$  UFC/100 g à 13 jours). La diffusion, dans l'eau de mer stérile surnageante, de la matière organique libérée du sédiment permet la multiplication de la souche ( $8 \times 10^6$  UFC/100 mL à 1 jour) et sa survie pendant quelques jours ( $1 \times 10^4$  UFC/100 mL à 6 jours) avant la phase de diminution (1 UFC/100 mL à 13 jours). En présence de la flore autochtone de l'eau de mer, la décroissance immédiate ( $2 \times 10^3$  UFC/100 mL à 6 jours), sans phase de croissance ni même de survie, met en évidence l'existence d'une pression de sélection. Dans un sédiment non stérile, en présence ou en absence de la flore autochtone de l'eau de mer, *E. coli* s'implante rapidement ( $5 \times 10^4$  UFC/100 g à 1 jour) et survit ( $1 \times 10^4$  UFC/100 g à 13 jours). Dans l'eau de mer surnageante, la décroissance s'observe dès le premier jour. Cette étude nous a donc permis de mettre en évidence l'établissement d'un état d'équilibre, avec disparition d'*E. coli* de l'eau de mer sous l'influence d'une pression de sélection de la flore marine autochtone (rôle important de la matière organique), et avec une survie importante dans le sédiment, quelles que soient les conditions.

**Mots clés :** *Escherichia coli*, flore bactérienne, eau de mer, sédiment, compétition.

LE GUYADER, F., POMMEPUY, M., and CORMIER, M. 1991. Implantation d'*Escherichia coli* en pilote expérimental et influence des compétitions de flore. *Can. J. Microbiol.* 37: 116-121.

Implantation in seawater and (or) sediment of bacterial flora and the influence of such flora upon the survival and growth of an *Escherichia coli* of human origin have been the object of experimental pilot studies. The selected pilot plant permitted work on large volumes of seawater and sediment, and maintenance of the structure of the latter. Diverse experiments were carried out in the presence or absence of seawater and (or) sediment bacterial flora during 13 days. *Escherichia coli* bacteria were introduced in the seawater experimental system at concentrations of 1 to  $3 \times 10^5$  colony-forming units (cfu) per 100 mL. In sterile sediment, *E. coli* bacteria first went through a proliferative phase and then implanted themselves ( $3 \times 10^4$  cfu/100 g at 0 days and  $4 \times 10^5$  cfu/100 g at 13 days). Diffusion in the supernatant sterile seawater of organic matter released from sediment allowed the strain to proliferate ( $8 \times 10^6$  cfu/100 mL at 1 day) and survive for a few days ( $1 \times 10^4$  cfu/100 mL at 6 days), prior to an ultimate decreasing phase (1 cfu/100 mL at 13 days). In the presence of the seawater indigenous flora, an immediate decrease ( $2 \times 10^3$  cfu/100 mL at 6 days), without a growth or even a survival phase, evidenced a selection pressure. In a nonsterile sediment, in the presence or absence of seawater indigenous flora, *E. coli* bacteria implanted themselves quickly ( $5 \times 10^4$  cfu/100 g at 1 day) and survived ( $1 \times 10^4$  cfu/100 g at 13 days). In the supernatant seawater, a decrease was observed from the 1st day. Our results show that a state of equilibrium was reached, with *E. coli* bacteria disappearing from the seawater under the pressure selection created by the indigenous marine flora (an important role of the organic matter), and with a considerable survival in the sediment, whatever the conditions might be.

**Key words:** *Escherichia coli*, bacterial flora, seawater, sediment, competition.

[Translated by the Journal]

### Introduction

La volonté de développement des activités maritimes et touristiques fait prendre conscience des importants problèmes de salubrité en zone littorale, réceptacle des eaux contaminées d'origine urbaine ou agricole. Les études récentes révèlent la

<sup>1</sup>Auteur à qui faire parvenir toute correspondance à son adresse actuelle : Laboratoire de microbiologie pharmaceutique, Faculté de pharmacie, 1, rue Gaston Veil, 44035 Nantes CEDEX, France.

présence d'entérobactéries, germes témoins de contamination fécale, dans des sites parfois éloignés des zones de rejets, réfutant ainsi le pouvoir auto-épurateur longtemps attribué au milieu marin (Martin et Bonnefont 1986; Irriberi *et al.* 1987; Pommeuy *et al.* 1987). Une nouvelle évaluation de la qualité bactériologique du milieu est maintenant possible grâce aux techniques nouvelles et à la prise en compte de la flore bactérienne du sédiment. Ce dernier permet aux bactéries, autochtones ou allochtones, de s'implanter et même de s'y

multiplier, par le biais de l'adhésion aux particules. Il joue le rôle de piège et de réservoir et constitue un risque sanitaire important (Novitsky et Karl 1986; Rhodes et Kator 1988). En effet, après remise en suspension par de nombreux phénomènes tant naturels (vie aquatique, marées, tempêtes...) qu'artificiels (activités humaines...), l'adhésion des bactéries au matériel particulaire favorise leur dissémination et leur assure une persistance suffisante pour contaminer soit des coquillages, soit l'homme.

Divers auteurs se sont intéressés à la survie des coliformes et des streptocoques fécaux dans le sédiment (Xu *et al.* 1982; Yamamoto et Lopez 1985; Burton *et al.* 1987). Cependant, rares sont ceux qui étudient l'influence des flores autochtones sur la survie de ces germes (Gerba et MacLeod 1976; Hood et Ness 1982). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'implantation d'une souche d'*Escherichia coli* dans un système eau de mer - sédiment et à l'influence des flores bactériennes de l'eau de mer et (ou) du sédiment sur sa survie et sa croissance *in vitro*. L'originalité de notre système expérimental réside dans le respect de la structure sédimentaire, et dans l'utilisation d'une souche d'*E. coli* d'origine humaine supposée non préadaptée au milieu marin.

### Matériel et méthodes

#### Site et prélèvements

Les sédiments sont prélevés dans le port de Saint-Malo (Bretagne, France). Le point de prélèvement, situé à la sortie du port de plaisance et en face de la gare maritime, a été choisi lors d'une étude préliminaire en raison de son aspect macroscopique homogène et de la présence d'une flore de contamination bactérienne. La concentration en carbone organique représente de 1 à 5% du poids de sédiment.

Les sédiments sont recueillis à l'aide d'un bac conçu de façon à permettre le prélèvement sans détruire les couches sédimentaires (fig. 1). Ce bac est un parallélépipède en Inox et Plexiglas (60 × 40 × 30 cm) dont un côté est amovible. Le bac est introduit de biais dans le sédiment jusqu'à une profondeur de 30 cm. Il est tiré parallèlement à la surface grâce aux poignées verticales : lorsque le sédiment a atteint la paroi arrière le bac est sorti verticalement grâce aux poignées horizontales. Le côté amovible est remis en place, l'étanchéité du système étant assuré par un joint siliconé.

Avant chaque prélèvement le bac est lavé au Teepol (solution à 10%), soigneusement rincé à l'eau, séché, puis mis en contact avec de l'alcool à 90° pendant 10 min.

Les échantillons d'eau de mer sont prélevés dans une zone exempte de rejet, en bidon de polypropylène (20 L) préalablement autoclavé à 121°C pendant 15 min.

Les échantillons sont alors transportés au laboratoire où les expérimentations sont mises en oeuvre dans un délai de 2 h.

#### Caractéristiques de la souche bactérienne

La souche bactérienne utilisée est un *Escherichia coli* isolé d'un prélèvement urinaire. Elle a été choisie en fonction de ses marqueurs de résistance chromosomique à l'acide nalidixique et à la rifampicine qui permettent de la différencier des bactéries présentes dans le milieu. La conservation de la souche est réalisée sur gélose trypticase soja (AES Laboratoire, Combourg, France) à 4 ± 0,5°C.

Pour les différentes expérimentations, la souche est utilisée après avoir été cultivée en bouillon trypticase soja (AES Laboratoire) pendant 24 h à 37 ± 0,5°C sans agitation (phase stationnaire de croissance). La culture est centrifugée (3000 × g pendant 5 min) et le culot est lavé trois fois en eau saline stérile à 9 g/L de NaCl (p/v).

#### Stérilisation de l'eau de mer et (ou) du sédiment

##### Stérilisation des prélèvements pour l'utilisation en pilote

L'eau de mer est stérilisée par filtration sur membrane cellulosique Millipore® St Quentin; maille 0,22 µm, diamètre 47 mm), et le sédiment par passage à l'autoclave pendant 1 h à 121°C. Le contrôle

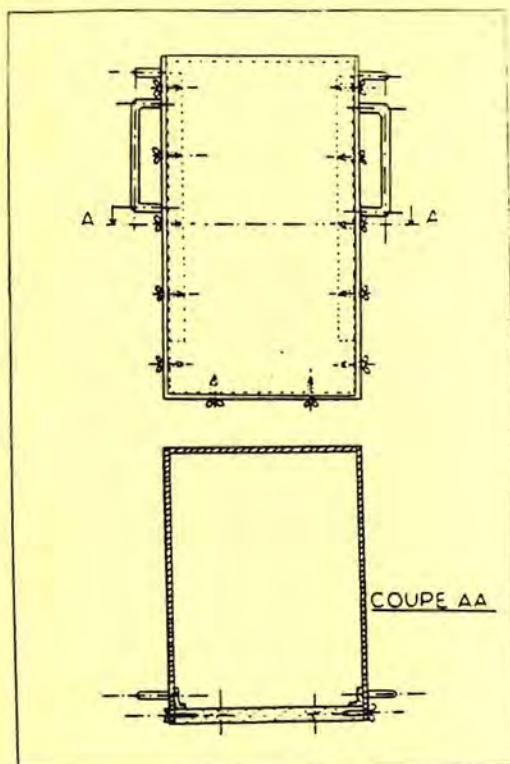


FIG. 1. Bac de prélèvement.

de stérilité de l'eau de mer est effectué par filtration de 100 mL sur membrane de maille 0,22 µm, ce filtre étant ensuite déposé sur une gélose trypticase soja incubée à 37 ± 0,5°C pendant 24 h. Le contrôle de stérilité du sédiment est réalisé par étalement de 0,1 g sur le même milieu de culture, l'incubation étant réalisée dans les mêmes conditions.

#### Influence de la stérilisation par la chaleur sur le sédiment

Un échantillon de sédiment (50 g) est stérilisé à l'autoclave pendant 1 h à 121°C puis mis sous agitation pendant 2 h avec 150 mL d'eau de mer stérilisée par filtration (maille 0,22 µm). Un échantillon de sédiment naturel (50 g) est mis en contact dans les mêmes conditions avec de l'eau de mer stérile. Après décantation les deux surageants sont filtrés sur membrane de maille 0,22 µm afin d'éliminer le matériel particulaire. La souche d'*E. coli* est ensemencée à 5 × 10<sup>5</sup> UFC/100 mL dans ces deux surageants. Des flacons témoins sont réalisés par ensemencement de la souche, selon le même mode opératoire, dans de l'eau de mer et dans de l'eau douce, toutes deux stérilisées par filtration.

Les quatre flacons sont laissés à température du laboratoire (18 ± 3°C), et un dénombrement est réalisé aux temps 0, 1, 3, 5, 7 et 13 jours (T<sub>0</sub>-T<sub>13</sub>).

#### Tests d'implantation

Pour étudier l'influence des flores bactériennes autochtones de l'eau de mer et (ou) du sédiment sur l'implantation d'*E. coli*, nous avons réalisé les expérimentations suivantes : (i) implantation de la souche en milieu stérile (eau de mer et sédiment); (ii) implantation de la souche en présence de la flore bactérienne autochtone de l'eau de mer et de sédiment stérile; (iii) implantation de la souche en présence d'eau de mer stérile et de la flore bactérienne autochtone du sédiment; et (iv) implantation de la souche en milieu naturel (flores bactériennes autochtones de l'eau de mer et du sédiment respectées).

Le mode opératoire développé ci-dessous est celui suivi pour l'implantation en milieu naturel (cas iv). Pour les autres expérimentations, les seules modifications par rapport à ce schéma consistent en la stérilisation préalable de l'eau de mer et (ou) du sédiment. La souche d'*E. coli* est remise en suspension dans 15 L d'eau de mer, la concentration finale variant de 1 à 3 × 10<sup>5</sup> UFC/100 mL. Cet inoculum est alors mis en contact avec le sédiment présent dans le bac de prélèvement où est effectuée toute l'expérimentation. Il est versé lente-

ment le long de la paroi de façon à minimiser la remise en suspension du sédiment; la mise en eau du système dure 30 min.

L'expérimentation est réalisée à température du laboratoire ( $18 \pm 3^\circ\text{C}$ ) et à la pénombre. L'aération du système est assurée par un aérateur Rena 301®. Le diffuseur est stérilisé à l'autoclave pendant 15 min à  $121^\circ\text{C}$  et l'air est passé à travers un filtre Millex (Millipore®, maille  $0,22 \mu\text{m}$ ). Des prélèvements sont réalisés aux temps 0, 1, 2, 4, 6, 9 et 13 jours.

#### Culture des échantillons

##### Milieux de culture

Le dénombrement spécifique de la souche d'*E. coli* est réalisé sur milieu de Drigalski (Institut Pasteur Production, Paris) additionné de rifampicine (Ciba-Geigy) (84 mg/L) et d'acide nalidixique (Winthrop) (100 mg/L). Pour notre étude, nous avons modifié la technique d'isolement d'*E. coli* en incubant le milieu sélectif à  $42 \pm 0,5^\circ\text{C}$ . Cette température s'est avérée suffisamment inhibitrice pour la croissance de la flore hétérotrophe autochtone tout en permettant une meilleure croissance de notre souche qu'à  $44,5^\circ\text{C}$ . Le contrôle de la spécificité des colonies bactériennes est évalué par leur aspect et par l'identification de certaines d'entre elles.

La mise en évidence de la flore hétérotrophe totale a été réalisée sur gélose trypticase soja. Ce milieu a été préparé à partir d'eau de mer naturelle, prélevée à Saint-Malo où la concentration en NaCl est de 35 g/L. La concentration finale, compte tenu de la teneur en sel de la gélose trypticase soja (5 g/L), est ajustée à 40 g/L (p/v) de NaCl. L'incubation est réalisée à  $25 \pm 0,5^\circ\text{C}$  pendant 48 h.

##### Traitement des échantillons et dénombrements

Le sédiment étant homogène, les échantillons sont prélevés au hasard par carottage à l'aide d'un tube en verre stérile. La partie superficielle (0,5 cm de profondeur) est pesée, diluée en eau saline stérile à 9 g/L de NaCl (p/v) et homogénéisée au vortex pendant 2 min. Deux dilutions, choisies selon la charge bactérienne présumée (en fonction des numérations précédentes) sont ensemencées sur milieu solide (0,1 mL par étalement).

L'eau de mer est prélevée à la pipette stérile. Dans le cas d'une concentration bactérienne importante, l'eau est diluée dans les mêmes conditions que le sédiment, puis ensemencée sur milieu solide (0,1 mL par étalement). Lorsqu'une concentration est au contraire nécessaire, l'eau de mer est filtrée sur membrane cellulosique (Millipore®, maille  $0,22 \mu\text{m}$ , diamètre 47 mm), puis le filtre est déposé sur le milieu de culture.

Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonies (UFC) pour 100 mL d'eau de mer ou 100 g de poids humide de sédiment. Toutes les expérimentations ont été réalisées en double ou en triple exemplaires et les valeurs données ici représentent les moyennes avec indications des valeurs extrêmes.

## Résultats

### Capacité de croissance des espèces bactériennes selon le milieu de culture utilisé

Le dénombrement de la souche d'*E. coli* est réalisé sur milieu de Drigalski, milieu lactosé non inhibiteur pour l'isolement des entérobactéries (Le Minor 1990). Des essais quantitatifs de croissance de cette souche sur ce milieu avec ou sans antibiotiques n'ont pas montré de variation. Lors des contrôles réalisés avant la mise en œuvre des expérimentations, aucune bactérie issue de la flore hétérotrophe totale ne s'est développée sur ce milieu.

Sur gélose trypticase soja préparée à partir d'eau de mer (concentration en NaCl de 40 g/L), la souche d'*E. coli* représente moins de 1% de la flore totale. La concentration de la flore bactérienne hétérotrophe isolée, dans ces conditions, est de 10 à 100 fois supérieure à celle isolée sur gélose trypticase soja préparée à partir d'eau distillée et incubée 24 h à  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  (F. Le Guyader, thèse d'Université, Rennes, 1989).

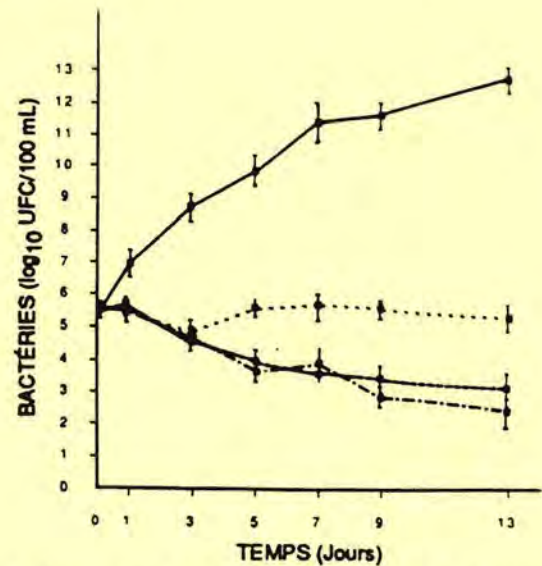


FIG. 2. Influence de la stérilisation du sédiment. Évolution de la souche dans l'eau de décantation du sédiment stérilisé (—), l'eau de décantation du sédiment non stérilisé (····), l'eau de mer témoin (·-·-·), et l'eau douce témoin (- - -).

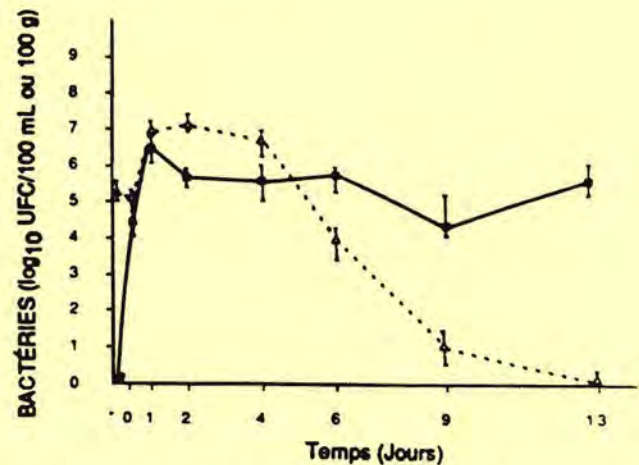


FIG. 3. Implantation d'*E. coli* en milieu stérile. Évolution de la souche dans le sédiment (■) et dans l'eau de mer (Δ); \*, temps avant la mise en œuvre de l'expérimentation ( $T_0 = 30 \text{ min}$ ).

### Influence de la stérilisation du sédiment

En 5 jours, dans les flacons témoins, eau de mer et eau douce, la population d'*E. coli* décroît de  $3 \times 10^5$  à  $4 \times 10^3$  UFC/100 mL (fig. 2).

Dans l'eau de décantation du sédiment non stérilisé, la souche persiste : le nombre de bactéries en fin d'expérimentation est de  $2 \times 10^5$  UFC/100 mL, concentration voisine de celle de l'inoculum. Dans l'eau de décantation du sédiment stérilisé, la croissance de la souche est importante : en 5 jours la population augmente de  $3 \times 10^5$  à  $6 \times 10^9$  UFC/100 mL.

### Implantation en milieu stérile

La contamination du sédiment est très précoce. Le premier prélèvement ( $T_0$ ), effectué dès la fin de la mise en eau du système, montre une concentration en *E. coli* dans le sédiment de  $3 \times 10^4$  UFC/100 g (fig. 3). Le 1<sup>er</sup> jour, la concentration

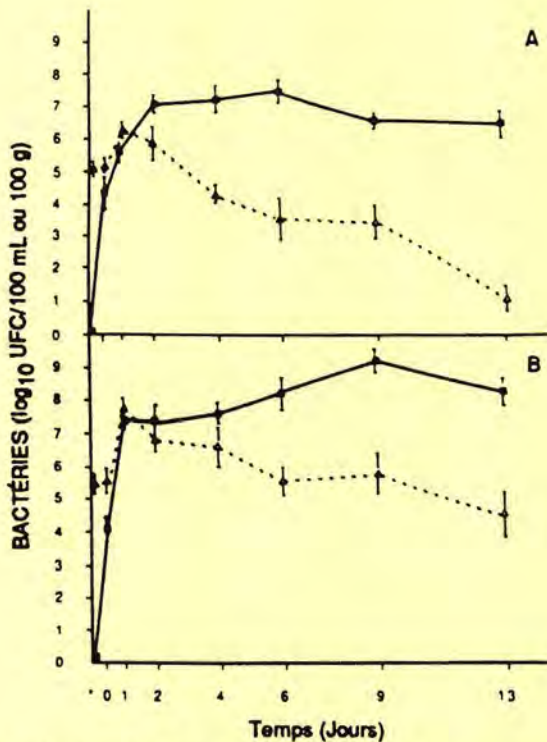


FIG. 4. Implantation d'*E. coli* en présence de la flore autochtone de l'eau de mer et de sédiment stérile. (A) Évolution de la souche d'*E. coli*. (B) Évolution de la flore autochtone. Dans le sédiment (■) et dans l'eau de mer (Δ); \*, temps avant la mise en œuvre de l'expérimentation ( $T_0 = 30$  min).

croît de  $3 \times 10^4$  à  $3 \times 10^6$  UFC/100 g, puis la population se stabilise : elle est de  $4 \times 10^5$  UFC/100 g à  $T_{13}$ .

Une croissance bactérienne est également observable dans l'eau de mer le 1<sup>er</sup> jour de l'expérimentation : la concentration varie de  $2 \times 10^5$  à  $8 \times 10^6$  UFC/100 mL. Les 3 jours suivants, la population en *E. coli* dans l'eau reste supérieure à celle du sédiment, puis la décroissance observée est rapide : le 6<sup>e</sup> jour, la concentration n'est plus que de  $1 \times 10^4$  UFC/100 mL.

#### Implantation en présence de la flore autochtone de l'eau de mer et dans un sédiment stérile

La mise en contact d'une eau de mer naturelle contaminée par la souche d'*E. coli* entraîne une colonisation immédiate du sédiment par la souche étudiée (fig. 4A) mais aussi par la flore autochtone (fig. 4B). Dans le sédiment, la concentration en *E. coli* observée lors du premier prélèvement ( $T_0$ ) est de  $2 \times 10^4$  UFC/100 g, puis elle atteint une concentration de  $1 \times 10^7$  UFC/100 g à  $T_2$ . Par la suite, elle décroît légèrement, et en fin d'expérimentation ( $T_{13}$ ) la charge bactérienne observée est de  $3 \times 10^6$  UFC/100 g.

Dans l'eau, la population en *E. coli* augmente de  $1 \times 10^5$  à  $2 \times 10^6$  UFC/100 mL en 24 h, puis décroît ensuite jusqu'à  $1 \times 10^2$  UFC/100 mL à  $T_{13}$ .

La flore autochtone de l'eau de mer ( $2,4 \times 10^5$  UFC/100 mL) s'implante rapidement dans le sédiment ( $1 \times 10^4$  UFC/100 g à  $T_0$ ), se multiplie pendant 4 jours, puis se stabilise ( $2 \times 10^8$  UFC/100 g à  $T_{13}$ ) (fig. 4B). Dans l'eau de mer, sa concentration augmente pendant 24 h ( $5 \times 10^7$  UFC/100 mL à  $T_1$ ), puis diminue jusqu'à une valeur voisine de celle observée en début d'expérimentation ( $5 \times 10^4$  UFC/100 mL).

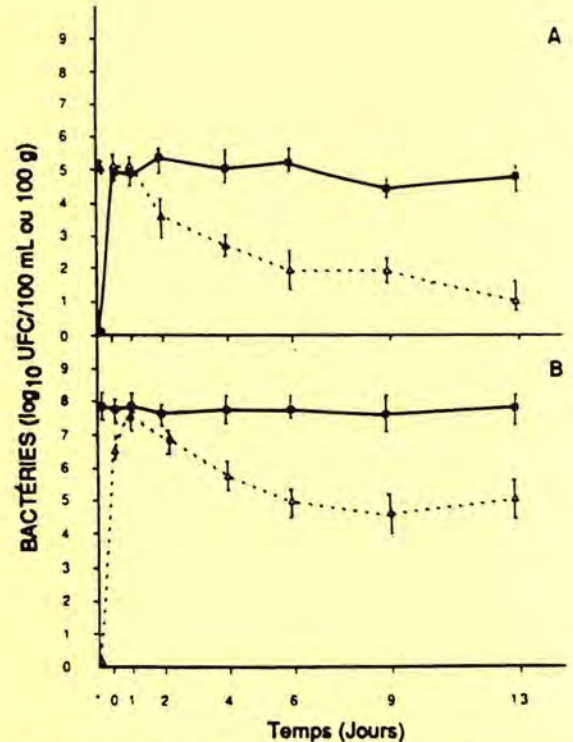


FIG. 5. Implantation d'*E. coli* en présence de la flore autochtone du sédiment et de l'eau de mer stérile. (A) Évolution de la souche d'*E. coli*. (B) Évolution de la flore autochtone. Dans le sédiment (■) et dans l'eau de mer (Δ); \*, temps avant la mise en œuvre de l'expérimentation ( $T_0 = 30$  min).

#### Implantation en présence de la flore autochtone du sédiment et de l'eau de mer stérile

Dans le sédiment, le premier prélèvement effectué à  $T_0$  montre une concentration en *E. coli* de  $8 \times 10^4$  UFC/100 g, puis cette population se stabilise : son titre est de  $6 \times 10^4$  UFC/100 g à  $T_{13}$  (fig. 5A).

Dans l'eau de mer la concentration de la souche diminue. À  $T_4$  le titre est de  $5 \times 10^2$  UFC/100 mL, puis de  $1 \times 10^1$  UFC/100 mL à  $T_{13}$ .

La contamination de l'eau de mer par la flore autochtone du sédiment est également immédiate. À  $T_0$  la concentration dans l'eau est de  $3 \times 10^6$  UFC/100 mL. On constate une croissance bactérienne pendant le 1<sup>er</sup> jour ( $3 \times 10^7$  UFC/100 mL), une diminution jusqu'au 6<sup>e</sup> jour ( $8 \times 10^4$  UFC/100 mL) et une phase stationnaire jusqu'à la fin de l'expérimentation ( $1 \times 10^5$  UFC/100 mL à  $T_{13}$ ) (fig. 5B). Dans le sédiment, le titre de la flore bactérienne autochtone reste stable ( $5,6 \times 10^7$  UFC/100 g à  $T_{13}$ ).

#### Implantation en milieu naturel

La souche s'implante de suite dans le sédiment :  $1 \times 10^4$  UFC/100 g à  $T_0$  (fig. 6A). À  $T_{13}$  le titre de la population d'*E. coli* dans le sédiment est de  $8 \times 10^3$  UFC/100 g. Des prélèvements effectués par carottage à 10 cm de profondeur ne permettent pas de mettre en évidence le germe.

Dans l'eau de mer, la décroissance est immédiate et continue : la concentration diminue de  $9 \times 10^4$  UFC/100 mL à  $T_0$  à 1 UFC/100 mL à  $T_{13}$ .

La flore autochtone se multiplie dans le sédiment ( $4 \times 10^6$  UFC/100 g à  $T_0$  contre  $5 \times 10^8$  UFC/100 g à  $T_2$ ) (fig. 6B). En fin d'expérimentation, sa concentration est encore de  $2 \times 10^7$

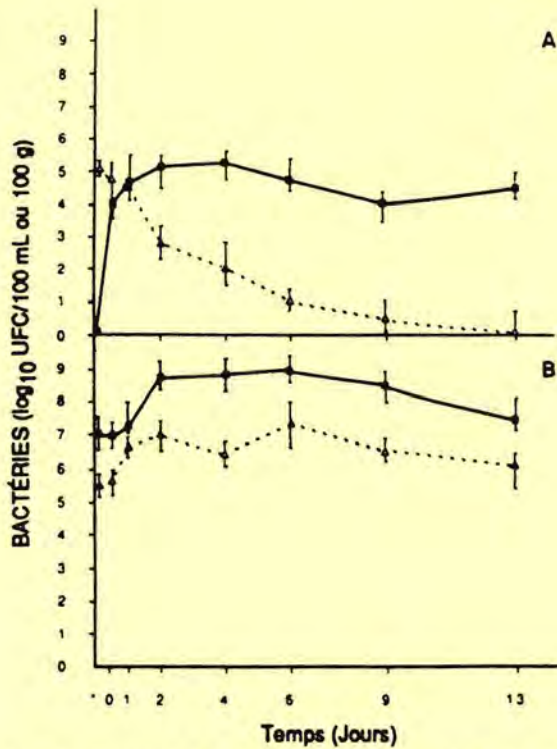


FIG. 6. Implantation d'*E. coli* en milieu naturel. (A) Évolution de la souche d'*E. coli*. (B) Évolution de la flore autochtone. Dans le sédiment (■) et dans l'eau de mer (Δ); \*, temps avant la mise en œuvre de l'expérimentation ( $T_0 = 30$  min).

UFC/100 g. Dans l'eau de mer, sa concentration est stable :  $3 \times 10^5$  UFC/100 mL à  $T_0$  contre  $1 \times 10^6$  UFC/100 mL à  $T_{13}$ . Les colonies lactose<sup>+</sup>, se développant sur milieu de Drigalski incubé à  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ , survivent dans le sédiment et disparaissent de l'eau juste après la phase de contamination. En effet, l'eau de mer, prélevée à distance de rejets, ne présente pas de flore de contamination avant la mise en œuvre de l'expérimentation.

#### Discussion

Le devenir des bactéries d'origine entérique en milieu marin est la résultante d'un grand nombre de facteurs physiques, chimiques ou biologiques. Comprendre les mécanismes conditionnant leur survie ou leur disparition est nécessaire pour améliorer la qualité microbiologique du littoral. Les études in vitro, dont les résultats peuvent présenter des difficultés d'interprétation liées aux conditions expérimentales différentes de celles du milieu extérieur, permettent cependant un contrôle des divers paramètres. Seul ce type d'étude nous permettait d'éliminer sélectivement les flores bactériennes de l'eau de mer ou du sédiment. Notre système de prélèvement, en respectant la structure sédimentaire, permet de préserver l'équilibre biologique existant. Sur une surface réduite ( $\leq 1 \text{ m}^2$ ) macroscopiquement homogène, les variations de densité bactérienne, horizontalement, sont inférieures à 1 log (F. Le Guyader, thèse d'Université, Rennes, 1989). L'hétérogénéité microbiologique est liée à l'établissement de gradients verticaux (Marty *et al.* 1989). Nous avons pu étudier ainsi l'implantation d'une souche d'*E. coli* d'origine humaine et l'influence des flores bactériennes de l'eau de mer et (ou) du sédiment sur son devenir. Lors des expérimentations, les bactéries introduites sont, en majorité, en phase stationnaire de croissance, état métabolique représentatif de celui des bactéries présentes dans un rejet. Le bouillon

trypticase soja employé permet d'obtenir des bactéries peu adaptées au milieu marin. En effet, l'âge des bactéries et les conditions physico-chimiques prévalant lors de la croissance des bactéries ont une importance sur leur résistance en milieu salé (Gauthier *et al.* 1989).

Nos résultats montrent que, quelles que soient les conditions, la contamination du sédiment est rapide et importante. Après 4 jours d'évolution, un état d'équilibre s'instaure entre l'eau de mer et le sédiment. Les concentrations en *E. coli* cultivables sont 100 fois plus élevées dans le sédiment que dans l'eau de mer, apparemment sans échange entre les deux phases. Ce nombre est vraisemblablement sous-estimé, car notre méthodologie ne doit pas libérer toutes les bactéries adhérentes. Elle présente cependant l'avantage de ne pas altérer la viabilité des bactéries comme le font d'autres techniques (ultra-sons, agitation mécanique violente...) (Doria et Bianchi 1982; Ellery et Schleyer 1984). La concentration élevée en *E. coli* est localisée essentiellement dans le sédiment de surface : le germe n'est plus mis en évidence à partir de 10 cm de profondeur, cette disparition s'accompagnant d'une diminution quantitative de la flore hétérotrophe aéro-anaérobie se développant à  $25^\circ\text{C}$ .

De nombreux auteurs montrent la disparition d'*E. coli* sous forme cultivable de l'eau de mer (Xu *et al.* 1982; Grimes *et al.* 1986; Rhodes et Kator 1988). Cependant, selon Gerba et MacLeod (1976), *E. coli* est capable de se multiplier dans une eau de mer stérile provenant d'un site pollué mais il ne se développe pas dans une eau de mer provenant d'un site non pollué. Dans un essai de ce type, réalisé dans une eau de mer stérile enrichie en matière organique libérée du sédiment par la chaleur stérilisante, nous avons mis en évidence une croissance très importante d'*E. coli* (son titre varie de  $3 \times 10^5$  à  $6 \times 10^9$  UFC/100 mL en 5 jours). Dans le pilote, en milieu stérile, où l'absence d'agitation limite le passage de la matière organique à une simple diffusion vers l'eau surnageante, la souche se multiplie pendant 24 h dans l'eau de mer; elle y survit pendant 4 jours avant de décroître. Cette phase de multiplication y est constatée également lorsqu'un sédiment stérile est mis en contact avec de l'eau de mer non stérile. Dans ce cas une phase de décroissance s'observe dès le 1<sup>er</sup> jour, mettant en évidence l'existence d'une pression de sélection de la flore autochtone de l'eau de mer. Ceci est confirmée par l'étude du système sédiment non stérile et eau de mer stérile : le passage de la flore du sédiment dans l'eau de mer provoque une diminution immédiate de la quantité d'*E. coli* introduite. Cette pression de sélection s'exerce vraisemblablement sous forme de compétition pour l'utilisation de la matière organique. Dans cette étude, nous avons isolé sur un milieu enrichi en chlorure de sodium une flore bactérienne hétérotrophe adaptée au milieu marin. Parmi ces bactéries, celles à métabolisme rapide (croissance en moins de 48 h) sont les plus susceptibles d'entrer en compétition avec la souche d'*E. coli* pour l'utilisation des éléments nutritifs.

Dans le sédiment, aucune pression de sélection ne modifie le devenir de la souche d'*E. coli*. Celle-ci se multiplie dans le sédiment stérile même lors de l'implantation simultanée de la flore hétérotrophe autochtone de l'eau. Dans le sédiment non stérile, l'existence de la flore autochtone et d'une flore de contamination ne modifie pas la survie de la souche. Cette absence de pression de sélection est vraisemblablement due au large excès de nutriment disponible (le sédiment étant prélevé dans un site contaminé). Les temps de survie observés dans le sédiment de surface sont très longs : les taux de mortalité caractérisés par les  $T_{90}$  (temps nécessaire pour que 90% des bactéries meurent) sont de 14 jours en moyenne avec une valeur



maximale de 40 jours. Cette répartition des flores bactériennes est voisine de celles décrites in situ (Loutit et Lewis 1985; Shiaris *et al.* 1987; Perez-Rosas et Hazen 1988). Une telle survie est vraisemblablement possible grâce à la mise en œuvre de mécanismes faisant appel à des transformations structurales et physiologiques comme l'accumulation d'osmoprotecteurs (Kogure *et al.* 1979; Roszak et Colwell 1987; Ghoul *et al.* 1990). Notre système expérimental, préservant certains paramètres de l'équilibre biologique, pourrait permettre l'étude de ces mécanismes.

- BURTON, G. A., GUNNISON, D., et LANZA, G. R. 1987. Survival of pathogenic bacteria in various freshwater sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 633-638.
- DORIA, E. V., et BIANCHI, A. 1982. Comparaison de deux méthodes d'extraction des bactéries des sédiments marins. *C. R. Seances Acad. Sci. Ser. 3*, **294** : 467-470.
- ELLERY, W. N., et SCHLEYER, M. H. 1984. Comparison of homogenization and ultrasonication as techniques in extracting attached sedimentary bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **15** : 247-250.
- GAUTHIER, M. J., MUNRO, P. M., et BREITMAYER, V. A. 1989. Influence of prior growth conditions on low nutrient response of *E. coli* in seawater. *Can. J. Microbiol.* **35** : 379-383.
- GERBA, C. P., et MACLEOD, J. S. 1976. Effect of sediments on the survival of *Escherichia coli* in marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **32** : 114-120.
- GHOUL, M., BERNARD, T., et CORMIER, M. 1990. Evidence that *Escherichia coli* accumulates glycine-betaine from marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** : 551-554.
- GRIMES, D. J., ATWELL, R. W., BRAYTON, P. R., PALMER, L. M., ROLLINS, D. M., ROSZAK, D. B., SINGLETON, F. L., TAMPLIN, M. L., et COLWELL, R. R. 1986. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microb. Sci.* **3** : 324-329.
- HOOD, M. A., et NESS, G. E. 1982. Survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in estuarine waters and sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** : 578-584.
- IRIBERRI, J., UNANUE, M., BARCINA, I., et EGEA, L. 1987. Seasonal variation in population density and heterotrophic activity of attached and free-living bacteria in coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 2308-2314.
- KOGURE, K., SIMIDU, U., et TAGA, N. 1979. A tentative direct

microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. Microbiol.* **25** : 415-420.

- LE MINOR, L. 1990. *Escherichia coli*. Dans *Bactériologie médicale*. Éditeurs : L. Le Minor et M. Veron. Flammarion, Paris. p. 395-406.
- LOUTIT, M. W., et LEWIS, G. 1985. Faecal bacteria from sewage effluent in sediments around an ocean outfall. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* **19** : 179-185.
- MARTIN, Y. P., et BONNEFONT, J. L. 1986. Conditions de décroissance en milieu marin des bactéries fécales des eaux usées urbaines. *Oceanis*, **12** : 403-418.
- MARTY, D., BERTRAND, J. C., et CAUMETTE, P. 1989. Les métabolismes bactériens dans les systèmes sédimentaires marins. *Dans* : *Microorganismes dans les écosystèmes océaniques*. Masson, Paris. p. 101-141.
- NOVITSKY, J. A., et KARL, D. M. 1986. Characterization of microbial activity in the surface layers of a coastal sub-tropical sediment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **28** : 49-55.
- PEREZ-ROSAS, N., et HAZEN, T. 1988. In situ survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in tropical coral reefs. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 1-9.
- POMMEPUY, M., CORMIER, M., BRUNEL, L., et BRETON, M. 1988. Étude de la flore bactérienne d'un estuaire breton (Elorn, rade de Brest, France). *Oceanol. Acta*, **10** : 187-196.
- RHODES, M. W., et KATOR, H. 1988. Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in estuarine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** : 2902-2907.
- ROSZAK, D. B., et COLWELL, R. R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microb. Rev.* **51** : 365-379.
- SHIARIS, M. P., REX, A. C., PETTIBONE, G. W., KEAY, K., MCMANUS, P., REX, M. A., EBERSOLE, J., et GALLAGHER, J. 1987. Distribution of indicator bacteria and *Vibrio parahaemolyticus* in sewage-polluted intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **53** : 1756-1761.
- XU, H. S., ROBERTS, N., SINGLETON, F. L., ATTWALL, R. W., GRIMES, D. J., et COLWELL, R. R. 1982. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbiol. Ecol.* **8** : 313-323.
- YAMAMOTO, N., et LOPEZ, G. 1985. Bacterial abundance in relation to surface area and organic content of marine sediments. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **90** : 209-220.

**VI - Etude du coefficient  
de décroissance ( $T_{90}$ )**

La phase de décroissance est exprimée par la loi de Chick :

$$N_t = N_{t_0} \times 10^{-K(t-t_0)}$$

avec  $N_t$  = concentration bactérienne au temps  $t$  (UFC/100 ml)  
 $N_{t_0}$  = concentration bactérienne à  $t_0$  (UFC/100 ml)  
 $K$  = coefficient de décroissance (jour<sup>-1</sup>)  
 $t_0$  = temps de latence (jour)

dans d'autres expérimentations seule la phase de latence (ou la phase de résistance) existe avant (ou après) la décroissance, les équations deviennent alors :

Latence : 
$$N_t = N_0 \times 10^{-K' t^2}$$

Résistance : 
$$N_t = N_0 \times \frac{1 - 10^{-k'' t}}{2,3 k'' t}$$

$N_0$  = concentration bactérienne

$K'$  = coefficient de décroissance (jour<sup>-2</sup>)

$K''$  = coefficient de décroissance (jour<sup>-1</sup>)

Lors de nos observations *in situ* ou en laboratoire nous avons souvent obtenu, une phase de latence avant la décroissance des numérations. En Martinique cette phase a pu durer 2 à 3 heures. Pour cela nous avons comme Sinton *et al.* (1994), préféré calculer le T90 avec une régression en excluant la phase de latence sur des pas de temps très courts (4 à 5 heures). Lorsqu'une bonne corrélation entre les log de concentration et le temps était observé, l'évaluation des T90 s'est faite par la technique de régression linéaire sur l'ensemble des points.

La méthode de travail sur souche d'*E. coli* H10407 en chambre à diffusion immergées sur site est détaillée dans l'article 6 (Salomon et Pommepuy, 1990).

Des études ont été réalisées sur les sites de Morlaix, de l'ouest Cotentin et de la Martinique selon la même procédure ; les résultats sur Morlaix sont présentés dans l'article 2 et 5 ; ceux de l'Ouest Cotentin et de la Martinique sont présentés ci-dessous.

### 1. Résultat sur le site de l'Ouest Cotentin

Le mouillage était situé à environ 500 m au nord ouest de Granville. L'expérience a été réalisée le 14 mai à partir de 18 h 00 (T0) : l'inoculation de la souche a eu lieu dans trois chambres claires (A<sub>1</sub> : en quartz - A<sub>2</sub> A<sub>3</sub> : en Plexiglas) et une chambre noire utilisée comme témoin (N). L'expérimentation s'est terminée le 15 mai à 18 h 30 ; en parallèle, de nouvelles chambres (quartz et Plexiglas transparent : 6 et 7) ont été remises à l'eau le 15 mai (7 h 30) et relevées en fin de journée (18 h 30).

Les résultats sont présentés sur la figure 35 et les tableaux 18 et 19.

En ce qui concerne les **bactéries cultivables**, après un temps de latence variant entre 3 à 4 heures, on observe, une chute des numérations qui est très importante surtout le 15 mai, journée où l'intensité lumineuse a été assez importante : plus de 1000  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$  à certaines heures de la journée, contre 300 à 500  $\mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ , le 14 mai.

On note aussi un maintien des numérations pendant la nuit (entre T13 et T23.5). D'une manière générale, c'est dans les chambres à quartz (perméables aux rayons UV) que les décroissances sont les plus rapides par rapport aux chambres en Plexiglas (qui ne laissent passer que la lumière visible).

Dans la chambre noire - où l'effet lumière est supprimé - la chute des numérations bactériennes est plus faible puisqu'on retrouve en fin d'expérience  $3.10^3$  UFC/100 ml (alors que dans les chambres claires, les numérations sont inférieures à 10 UFC/100 ml).

Le **nombre de bactéries totales** (déterminé par épifluorescence) ne varie pas significativement pendant l'exposition en mer, il n'y a donc pas de lyse cellulaire. La **viabilité** des bactéries peut être appréciée par les valeurs obtenues en DVC : on observe d'une manière générale une perte d'une unité log entre le début et la fin de l'expérience. Ces résultats concordent avec ceux obtenus sur le site de Morlaix ou par d'autres auteurs (Barcina *et al.*, 1989 ; Gourmelon, 1995) : les bactéries stressées gardent pour la plupart, un état physiologique actif alors qu'elles ne sont plus cultivables.

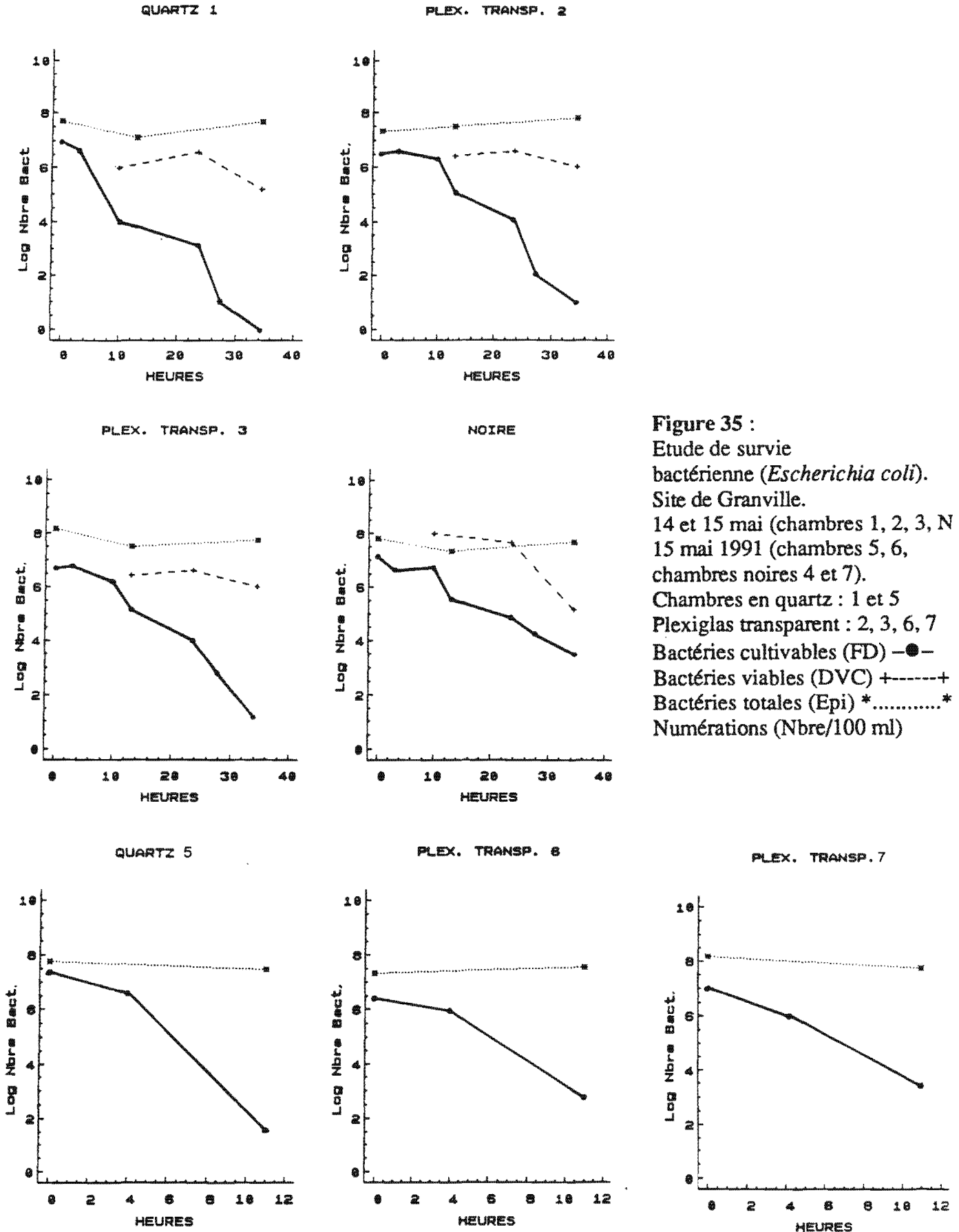
**Les T90 obtenus** à partir de l'évolution du nombre de bactéries cultivables, les 14 et 15 mai 1991 et pour les conditions particulières à ces journées, sont les suivantes :

- chambre en quartz : **2 h 00** (le 15.5) et **4 h 00** (le 14.5),
- chambre en Plexiglas : **3 h 00** (le 15.5) et **9 h 50** (le 14.5),
- chambre noire : **12 h 00**

CHAMBRES	Quartz 1			Plexi 2			Plexi 3			Noire (4)		
	TD	DVC	EPI	TD	DVC	EPI	TD	DVC	EPI	TD	DVC	EPI
T0	$1.0.10^7$	ND	$5.10^7$	$3.2.10^6$	ND	$2.1.10^7$	$4.8.10^6$	ND	$1.5.10^8$	$1.3.10^7$	ND	$6.2.10^7$
T3	$4.3.10^6$	ND	ND	$4.10^6$	ND	ND	$5.6.10^6$	ND	ND	$4.10^6$	ND	ND
T10	$10^4$	$9.6.10^5$	ND	$2.10^6$	ND	ND	$1.5.10^6$	ND	ND	$4.8.10^6$	$10^8$	ND
T13	$7.10^5$	ND	$1.2.10^7$	$1.1.10^5$	$1.4.10^7$	$3.2.10^7$	$1.4.10^5$	$2.6.10^6$	$3.16.10^7$	$4.10^5$	ND	$2.1.10^7$
T23.5	$1.1.10^3$ $1.5.10^3$	$3.4.10^6$	ND	$1.2.10^4$	$8.35.10^6$	ND	$10^4$	$4.10^6$	ND	$7.10^4$	$4.3.10^7$	ND
T27.5	< 10	ND	ND	$10^2$	ND	ND	$7.10^2$	ND	ND	$1.7.10^4$	ND	ND
T34.5	< 1	< $1.5.10^5$	$4.6.10^7$	< 10	$2.2.10^6$	$6.06.10^7$	< 10	$1.04.10^6$	$5.3.10^7$	$3.10.10^3$	< $1.5.10^5$	$4.6.10^5$

TD : bactéries cultivables.  
DVC : bactéries viables.  
Epi : bactéries totales.  
ND : non déterminé

**Tableau 18 :** Résultats des numérations bactériennes/100 ml dans les chambres à diffusion - site de Granville - 14 mai 1991.



**Figure 35 :**  
 Etude de survie  
 bactérienne (*Escherichia coli*).  
 Site de Granville.  
 14 et 15 mai (chambres 1, 2, 3, N  
 15 mai 1991 (chambres 5, 6,  
 chambres noires 4 et 7).  
 Chambres en quartz : 1 et 5  
 Plexiglas transparent : 2, 3, 6, 7  
 Bactéries cultivables (FD) —●—  
 Bactéries viables (DVC) +-----+  
 Bactéries totales (Epi) \*.....\*  
 Numérations (Nbre/100 ml)

CHAMBRES	Quartz 5			Plexi 6			Plexi 7		
	TD	DVC	EPI	TD	DVC	EPI	TD	DVC	EPI
T0	2.2.10 <sup>7</sup>	ND	5.6.10 <sup>7</sup>	2.4.10 <sup>6</sup>	ND	2.10 <sup>7</sup>	10 <sup>7</sup>	ND	1.5.10 <sup>8</sup>
T4	4.10 <sup>6</sup>	ND	ND	9.10 <sup>5</sup>	ND	ND	9.10 <sup>5</sup>	ND	ND
T11	36	5.4.10 <sup>5</sup>	2.9.10 <sup>7</sup>	6.10 <sup>2</sup>	6.13.10 <sup>5</sup>	3.5.10 <sup>7</sup>	3.10 <sup>3</sup>	1.2.10 <sup>6</sup>	5.5.10 <sup>7</sup>

TD : bactéries cultivables.  
DVC : bactéries viables.  
Epi : bactéries totales.  
ND : non déterminé.

**Tableau 19 :** Résultats des numérations bactériennes dans les chambres à diffusion - site de Granville - 15 mai 199.

TD : Bactéries cultivables      DVC : Bactéries viables  
Epi : bactéries totales          ND : non déterminé

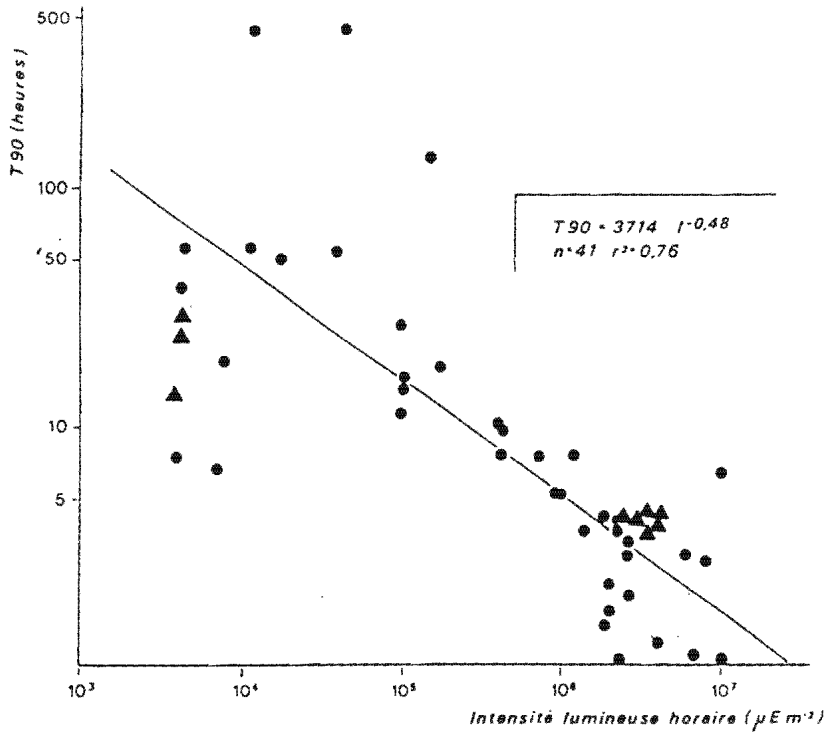
Afin d'évaluer ces résultats dans un contexte plus général, les T90 obtenus à Granville ont été reportés sur le graphe obtenu à partir des études réalisées sur Toulon et Morlaix (Pommepuy *et al.*, 1991) (fig. 36a). Sur cette figure les T90 sont corrélés avec l'intensité lumineuse reçue par la bactérie : intensité mesurée sur le site corrigée de la diminution due au coefficient de pénétration de la lumière dans l'eau - mesuré sur place - et dans la chambre à diffusion (l'atténuation, est calculée suivant la nature de la chambre).

On constate que les résultats trouvés sur le site de Granville concordent avec ceux précédemment obtenus, sur le site de Morlaix. Connaissant les valeurs en matières en suspension sur la zone ouest du Cotentin, on peut conclure que, dans les eaux claires de Granville (MES < 10 mg/l), les T90 sont de l'ordre de quelques heures (2 - 5 h). Par contre au niveau des havres et surtout du havre de Regnéville, où nous avons mesuré des teneurs en MES de l'ordre de 10 à 40 mg/l, les T90 peuvent être estimés à plusieurs dizaines d'heures (T90 de 30 à 40 h) en se reportant à l'abaque (figure 36b) permettant de relier la profondeur, la turbidité, l'intensité lumineuse et les T90.

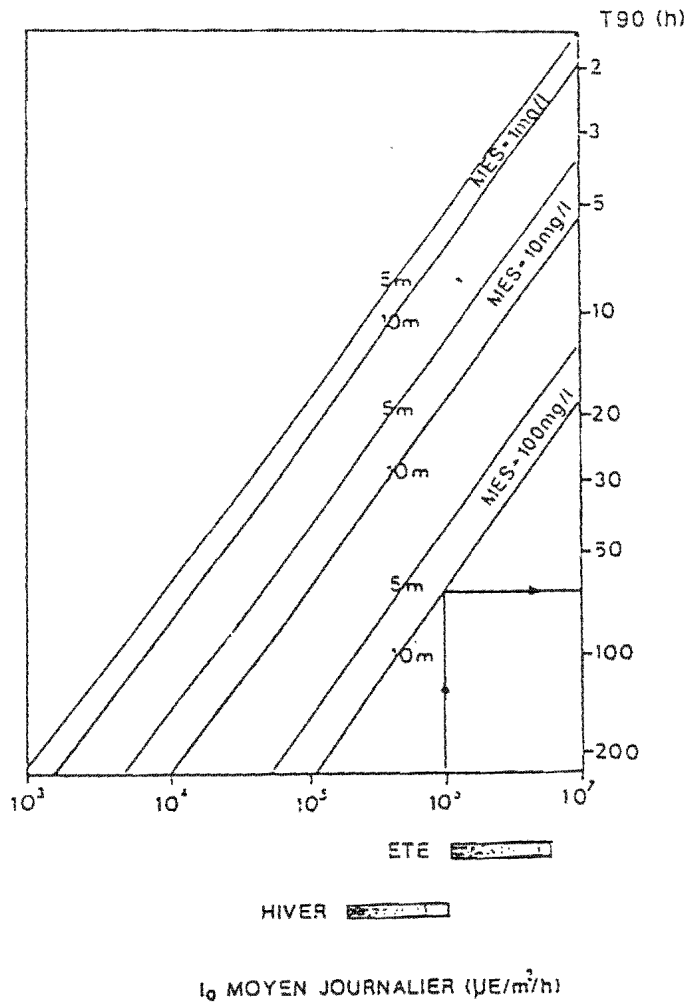
## 2. Martinique

Les trois sites retenus pour l'étude en Martinique sont présentés sur la figure ci-dessous :

Les sites correspondent aux différentes conditions physico-chimiques trouvées dans l'île : présence de matière organique au débouché de la Lézarde et eau claire dans l'anse d'Arlet et au Robert.



A.  
 résultat  
 site de Gr.  
 Résultats anté.



**Figure 36b :** Relation entre la profondeur, la turbidité, l'intensité lumineuse et les T90.

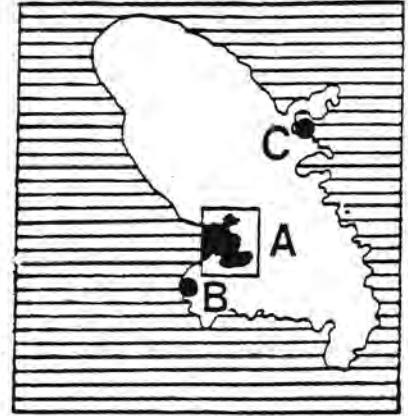


Figure 37 : Positionnement des sites de mesure du T90.  
 A : baie de Fort de France.  
 B : Anse d'Arlet.  
 C : Baie du Robert.

Sur le site de l'anse d'Arlet (fig. 38) (eau claire et fort ensoleillement : 800 à 1 000  $\mu E m^{-2}s^{-1}$  observés à 2 m sous la surface) on note une perte de cultivabilité très rapide d'*E. coli* dans la chambre en quartz située à 2 m sous la surface et dans laquelle les bactéries reçoivent les ultraviolets. Dans les chambres en Plexiglas qui arrêtent les UV et sont positionnées à 5 et 10 m sous la surface - l'effet de la lumière est très faible ; la chambre noire suit les variations des deux chambres en Plexiglas avec un certain retard. A partir de 25 heures (seconde journée), la perte de cultivabilité est très rapide dans les chambres.

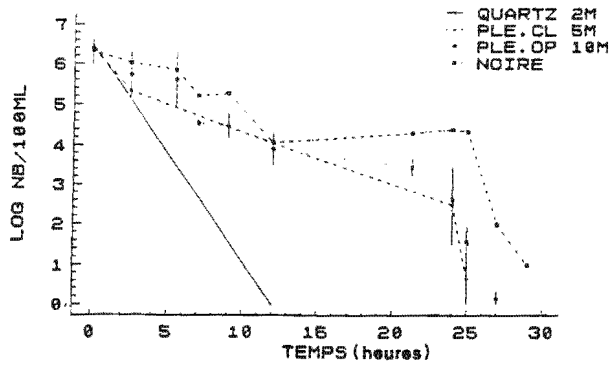
Sur le site du Robert : (fig. 39) (eau claire, faible ensoleillement < 400  $\mu E m^{-2}s^{-1}$  en moyenne), *E. coli* reste viable sur des périodes assez longues, puisque en 8 heures on observe une perte de cultivabilité inférieure à un logarithme décimal lors de faibles ensoleillements.

Sur le même site (fig. 40) lors de forts ensoleillements, les pertes de viabilité observées sur *E. coli* sont très élevées aussi bien dans les chambres en quartz que pour les chambres en Plexiglas. Les numérations se maintiennent dans la chambre à l'abri de la lumière.

Sur le site de Fort de France (figure 41) les mêmes résultats sont trouvés que dans la baie du Robert.

Quelques résultats des T90 calculés sur les sites de Martinique sont reportés sur le tableau 20 : les T90 varient en surface de quelques heures (1,85 h à 2,5 h) pour de fortes illuminations à quelques dizaines d'heures (7 h à 29 h) pour les chambres noires.





INTENSITE LUMINEUSE

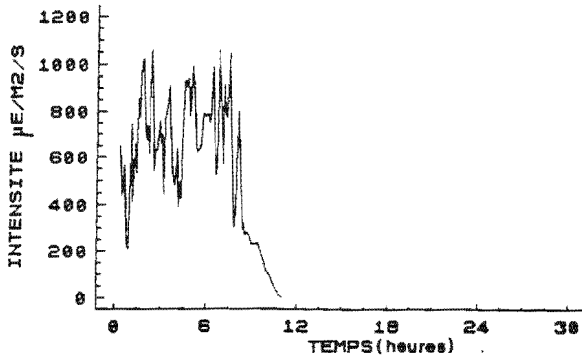
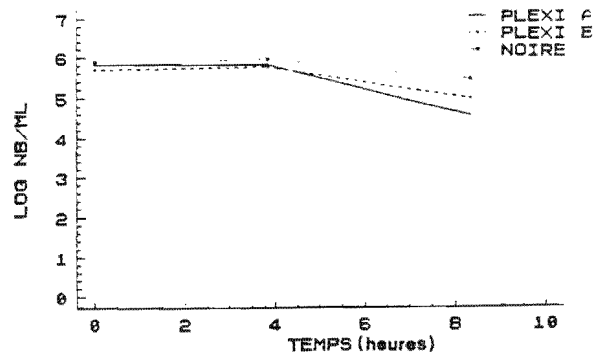


Figure 38 : Survie d'*E. coli* dans les eaux de l'Anse d'Arlet (9 juin 1992) et intensités lumineuses.



INTENSITE LUMINEUSE

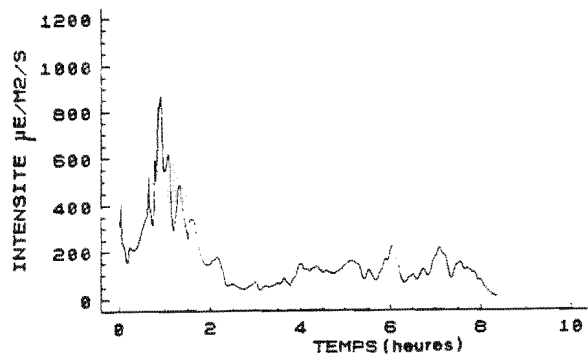
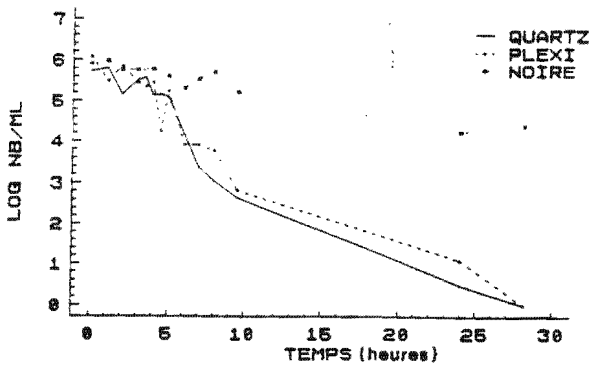


Figure 39 : Survie d'*E. coli* dans les eaux du Robert (16 décembre 1992) et intensités lumineuses.



INTENSITE LUMINEUSE

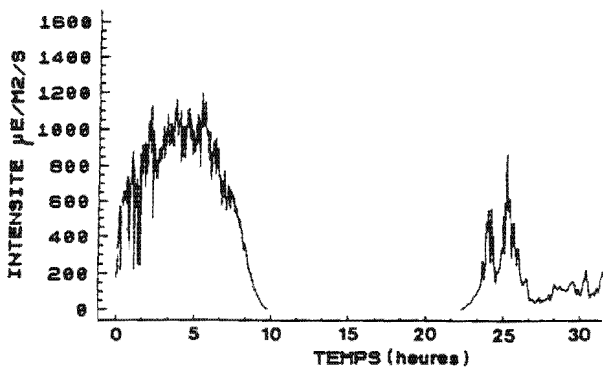


Figure 40 : Survie d'*E. coli* dans les eaux du Robert (15 décembre 1992) et intensités lumineuses.

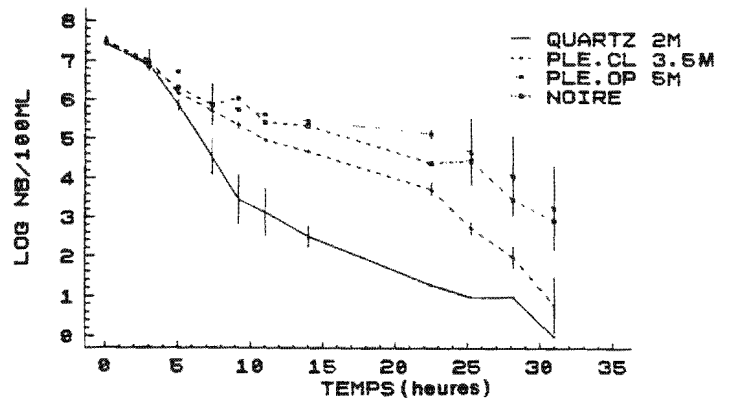


Figure 41 : Survie d'*E. coli* dans la baie de Fort de France (zone du Lamentin) et intensités lumineuses.  
 PLE.CL : Plexiglas clair  
 PLE. OP : Plexiglas opaque

Date	Localisation	T° (°C)	Profondeur (m)	Chambres à diffusion	Intensité lumineuse $\mu\text{Em}^{-2}\text{h}^{-1}$	T90 (heures)	Salinité ‰	Turbidité (mg/l)
Juin 1992	A	27.7	2	Lumière	nd	2.50	35.20	4.92
		28.0	5	Lumière	nd	9.50	35.60	
		28.0	5	Lumière	nd	6.40	35.60	
		28.2	6.50	Obscurité	$< 10^4$	7.80	35.70	nd
Juin 1992	B	28.0	2	Lumière	$1.38 \cdot 10^6$	1.85	34.70	2.43
		28.0	10	Lumière	$5.13 \cdot 10^5$	7.10	34.75	nd
		28.0	10	Lumière	$3.65 \cdot 10^5$	4.80	34.75	nd
		28.0	13	Obscurité	$< 10^4$	6.50	34.75	nd
Déc. 1992	C	26.8	1	Lumière	$1.73 \cdot 10^6$	1.85	32.00	0.87
		26.8	1	Lumière	$8.44 \cdot 10^5$	4.50	32.00	0.7
		26.8	1	Lumière	$2.00 \cdot 10^4$	8.30	32.00	0.7
		nd	3	Obscurité	$< 10^4$	16.30	nd	nd
Mars 1993	C	27.0	0.5	Lumière	$3.82 \cdot 10^6$	1.55	35.80	4.85
		27.0	1	Lumière	$1.01 \cdot 10^6$	5.10	35.80	4.85
		nd	3	Obscurité	$< 10^4$	29.00	nd	nd
		nd	3	Obscurité	$< 10^4$	15.35	nd	nd

**Tableau 20 :** Exemples de T90 pour *Escherichia coli* sur trois sites de Martinique.  
A : Baie de Fort de France (côché du Lamentin),  
B : Anse d'Arlet,  
C : Baie du Robert.

### 3. Conclusion

Sur la figure 42 est reporté l'ensemble des points d'expérimentations ; on observe des relations différentes pour les observations précédemment faites en métropole et pour celles de Martinique :

. Métropole (1)  $T90 = 3714 \cdot I^{-0,48}$   
pour  $n = 61$  avec  $I$  en  $\mu\text{Em}^{-2}\text{h}^{-1}$   
 $r = 0,84$  T90 en heure

. Martinique (2)  $T90 = 113 \cdot I^{-0,24}$   
pour  $n = 41$  avec  $I$  en  $\mu\text{Em}^{-2}\text{h}^{-1}$   
 $r = 0,52$  T90 en heure

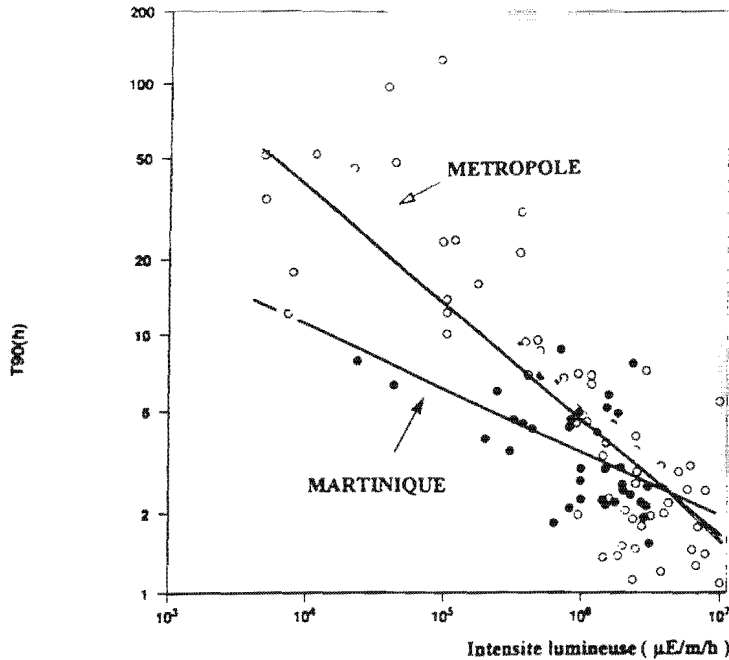


Figure 42 : Relation entre le T90 et l'intensité lumineuse :  
 - Europe,  
 ----- Martinique (sans obscurité)

Pour les forts ensoleillements la perte de cultivabilité est rapide (< 5 heures). Le métabolisme bactérien d'après Barcina *et al.* (1989, 1990) est dépendant de l'ensoleillement et de la présence de sel : ainsi à la lumière ces auteurs observent une diminution de la taille des bactéries et de l'assimilation du glucose. Les T90 trouvés pour ces intensités correspondent à ceux cités dans la littérature (Perez-Rosas et Hazen (1988), Bravo et Vicente (1992) ; Roberts et William (1992)).

Dans les chambres à l'abri de la lumière le T90 varie entre 7 h et 30 h en Martinique. Tandis que sur les côtes européennes les T90 trouvés sont généralement plus longs et peuvent atteindre 7 à 9 jours (Le Hir *et al.*, 1990) mais seulement 12 h sur le site de Granville. Le fait qu'en Martinique à l'obscurité, les T90, soient faibles (< 30 h) peut être attribué aux conditions locales de température et d'oligotrophie. En effet, de nombreux travaux montrent le rôle de la matière organique et des osmoprotecteurs sur le maintien de la viabilité des bactéries (Gourmelon, 1995 ; Bonnefont *et al.*, 1990). Dans les eaux martiniquaises, du fait de l'oligotrophie des eaux, les bactéries fécales seraient plus stressées que dans les eaux européennes estuariennes. D'autre part différents travaux ont montré que la survie était prolongée dans les eaux froides par rapport aux eaux chaudes (Bonnefont *et al.*, 1990). En Martinique, les expérimentations sont réalisées dans des eaux à 27-28 °C alors qu'en Atlantique la température était de 10 à 15 °C maximum.

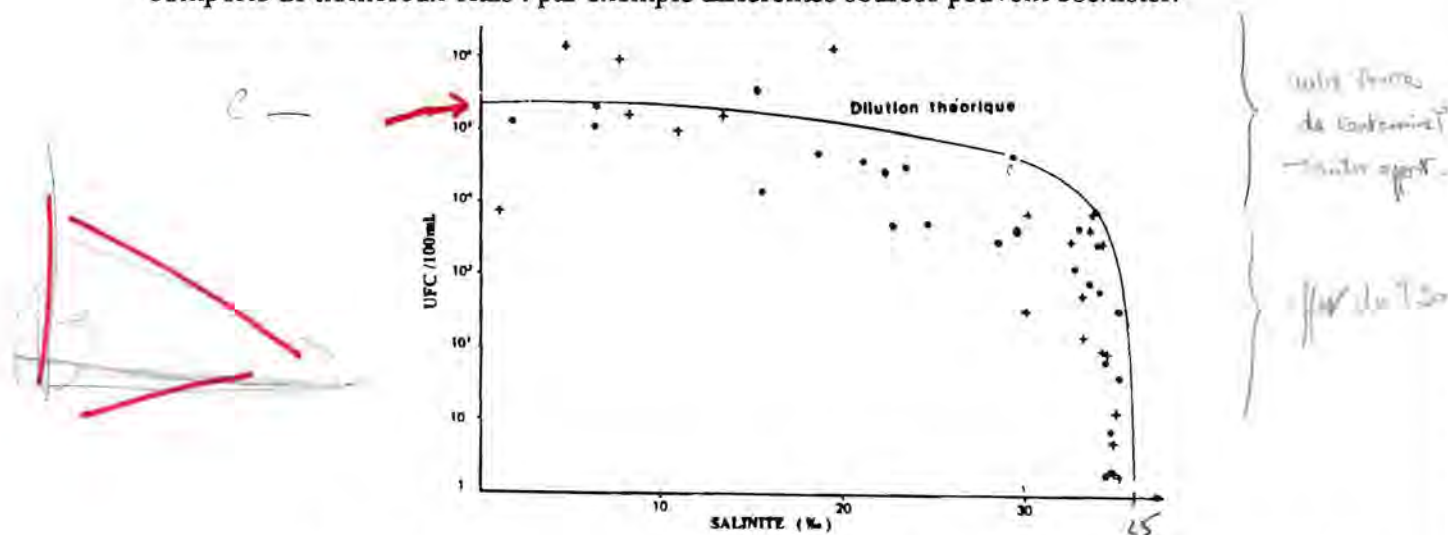
Ces différents facteurs de stress et leur accumulation peuvent être également responsables ou explicatifs d'autres observations : ainsi en Europe, tandis que les numérations bactériennes se stabilisaient la nuit, en Martinique elles continuent à décroître de façon importante. Il serait nécessaire d'avoir une idée plus précise des spectres solaires en Martinique et en Atlantique pour comprendre précisément les mécanismes impliqués dans le stress lumineux. Sinson *et al.* (1994), Davies-Colley *et al.* (1994) montrent que l'efficacité de la lumière est fonction de la longueur d'onde ; en milieu marin, UV A et la lumière visible seraient très efficaces pour inactiver les bactéries fécales.

**L'application de ces T90 dans les études d'impact** doit intégrer les conditions locales d'ensoleillement. La spécificité du climat doit être prise en compte par exemple en Martinique, le temps est fréquemment nuageux, avec des périodes brèves mais très intenses d'ensoleillement. La période journalière d'efficacité sur les 12 heures entre le lever et le coucher du soleil, peut être réduite à 8 ou 10 heures. Roberts et Williams (1992) qui estiment que dans la modélisation de la dispersion le nombre réel d'heures de jour et de nuit doivent être intégrés et sont dépendants de la saison (et évidemment de la latitude). Trousselier et Legendre (1989) soulignent également l'importance des variations saisonnières.

Pour l'application des T90 dans les études d'impact, un autre facteur important doit être pris en considération. Les études de survie s'appuient pour la plupart sur des travaux sur *E. coli* de façon à simuler le devenir des coliformes fécaux. Cependant *E. coli* n'est pas la bactérie la plus résistante au stress lumineux. Ainsi *Vibrio cholerae* (Perez-Rosas et Hazen, 1988), les streptocoques fécaux (Davis-Colley *et al.*, 1994), les bactéries autochtones (Servais et Menon, 1991 ; Garcia Lara *et al.*, 1991) ou les salmonelles (Montfort et Baleux, 1995) présentent des taux d'inactivation beaucoup plus faibles qu'*E. coli*. Ces considérations ajoutées au fait que la perte de cultivabilité ne peut être considérée comme une mortalité bactérienne doivent être présents à l'esprit lors d'étude d'impact.

Une fois obtenus, les coefficients de décroissance T90 et K peuvent être comparés avec les coefficients de dilution physique afin de **déterminer sur un site, les facteurs responsables de la décroissance bactérienne observée.**

Dans l'eau, la concentration en bactéries peut être calculée à partir des lois de la dilution physique. Une loi de dilution théorique peut être établie (fig. 43) : la dilution des coliformes ou autres bactéries issues du rejet en fonction de la salinité, est considérée dans un premier temps comme conservative. Cette courbe est établie à partir de la concentration à l'origine dans le rejet et dans les eaux marines. L'écart des points d'observation par rapport à cette courbe peut indiquer soit des "sources" (apports secondaires) soit des "puits" (mortalité, sédimentation...). Cette technique est dérivée de celle utilisée pour l'étude des sels nutritifs en zone côtière (Aminot, Communication personnelle) ; il s'agit d'une approche très grossière qui comporte de nombreux biais : par exemple différentes sources peuvent coexister.



**Figure 43 : Relation entre les concentrations en bactéries fécales et la salinité dans l'estuaire de Morlaix (étiage - Morte eaux + Pleine mer ; Basse mer). (Pommepuy et Guillaud, 1992).**

Plus élégantes et surtout plus performantes sont les techniques de modélisation mathématique qui permettent une analyse quantitative des diverses composantes d'un processus. Une fois étalonné, le modèle permet de décrire les zones impactées et de présenter des solutions d'aménagement. Ces modèles permettent également d'évaluer les risques sanitaires des rejets sur les activités (Ganoulis, 1991).

Différents modèles mathématiques ont été réalisés ces dernières années et appliqués à la contamination fécale des eau côtières : modèles de régressions multiples permettant de prédire les concentrations en coliformes fécaux (Kay et Mc Donald, 1983), modèles basés sur des traitements statistiques de données de courant (Ganoulis, 1991, Teusen et Linde-Jensen, 1992 ; Thouvenin, 1991), modèle en boîtes (définition de zones homogènes et calcul de flux au travers des limites) (Chen *et al.*, 1991), modèles numériques de courant (Bell *et al.*, 1992 ; Monterio, 1992 ; Roberts et Williams, 1992). Sur les côtes françaises plusieurs modèles numériques ont été développés en Manche Atlantique (Salomon *et al.*, 1991 ; 1994), en Méditerranée (Thouvenin, 1991), en Martinique (Lazure *et al.*, 1995) et dans les principaux estuaires ; ces modèles tiennent compte de différents facteurs hydrodynamiques et sédimentaires (Le Hir *et al.*, 1993).

Quelques applications à l'étude de la dispersion des rejets bactériens ont été réalisées à partir de ces outils et sont présentés ci-après (articles 4, 5 et 6).

**VII. Article 4 :**

**Mathematical model of bacterial  
contamination of Morlaix estuary  
(France).**

# MATHEMATICAL MODEL OF BACTERIAL CONTAMINATION OF THE MORLAIX ESTUARY (FRANCE)

JEAN CLAUDE SALOMON and MONIQUE POMMEPUY<sup>Ⓜ</sup>  
IFREMER, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzane, France

(First received March 1989; accepted in revised form January 1990)

**Abstract**—By a modelling procedure, knowledge concerning bacterial transport and disappearance can be attained to provide useful management information for minimizing faecal pollution in shellfishing areas such as Morlaix Bay. A set of two numerical models was built to simulate currents, water fluxes, transit times, trajectories, dispersion and bacterial decay. The models were tuned and fed by survival trials carried out in the field with *Escherichia coli* strains. Die-off rates ranged from 2 h to 1 week. Model results compared well with *in situ* measurements and show that, in all circumstances, physical dilution processes are much more efficient than mortality in this estuary. The last simulations provided suggestions for improving water quality in the study area.

**Key words**—mathematical model, bacterial contamination, *Escherichia coli*, estuary, dispersion

## INTRODUCTION

Shellfishing areas are located in nutrient rich coastal waters which are sheltered from currents and waves, they are often vulnerable to bacterial pollution. The sanitary quality of these waters depends on the dispersion potential of the area and on bacterial quality of natural and treated in-flowing waters. Bacterial water quality is routinely assessed by bacterial indicator counts, the faecal coliforms test being the most frequently used. Useful as it may be, this monitoring task is far from being sufficient. The economic impact of shellfishing and the high cost of purification are two reasons why more comprehensive and predictive tools should be developed.

Main questions to be addressed by these tools are as follows:

- determination of paths, dilution rates and residence times of released materials;
- quantification of the role of biological factors, generally measured in terms of die-off rate;
- comparison of the respective efficiencies of biological versus physical factors;
- setting up of a "model" reliable enough to be used for predictions and which is able to point out means of improving water quality.

## SOME PHYSICAL CHARACTERISTICS OF THE MORLAIX ESTUARY

The Morlaix estuary is located on the northern coast of Brittany (Fig. 1). Two distinct parts can be characterized:

- the upper section is 5.5 km long beginning at the city of Morlaix, where two small rivers flow into a

harbour enclosed by a sluice gate. The flow rate of both rivers varies between 2 m<sup>3</sup>/s in summer and 6 m<sup>3</sup>/s in winter. Four kilometers downstream, a smaller river the Dourduff (about 30% flow rate of the above mentioned rivers), flows into the main estuary. This part of the estuary is shallow (about 4 m under mid-water level) with mud banks. Its average width decreases from about 100 to only 10 m between high and low tides.

—The outer estuary is 5 km long and up to 3.5 km wide. The mouth of the estuary in the north narrows to about 1 km wide where it connects to the sea. There are extensive shoaling banks, used by oyster-breeders, throughout most of this area. In the centre of the bay there is a narrow 12 m deep channel.

The sea-tide is mainly semi-diurnal, with a slight quarter diurnal effect. Its maximum range is about 9.5 m in spring.

The bacterial input in this aquatic system is mainly due to the sewage treatment plant (STP) of the city of Morlaix. This plant is situated at the upstream extremity of the estuary near the sluice and the two rivers. Estimated fluxes are  $0.16 \times 10^9$  Enterobacteria/s from the rivers and  $7 \times 10^9$  from the STP. These high values may be explained by the fact that only 60% of the sewage is depurated. There are other minor tributaries around the bay which we considered as negligible.

## MATERIALS AND METHODS

### (1) The hydrodynamic model

The behaviour of released bacteria and all chemical components linked to the water or to the sediment are closely related to the currentology. The aim of the model is thus to give both a comprehensive description of water

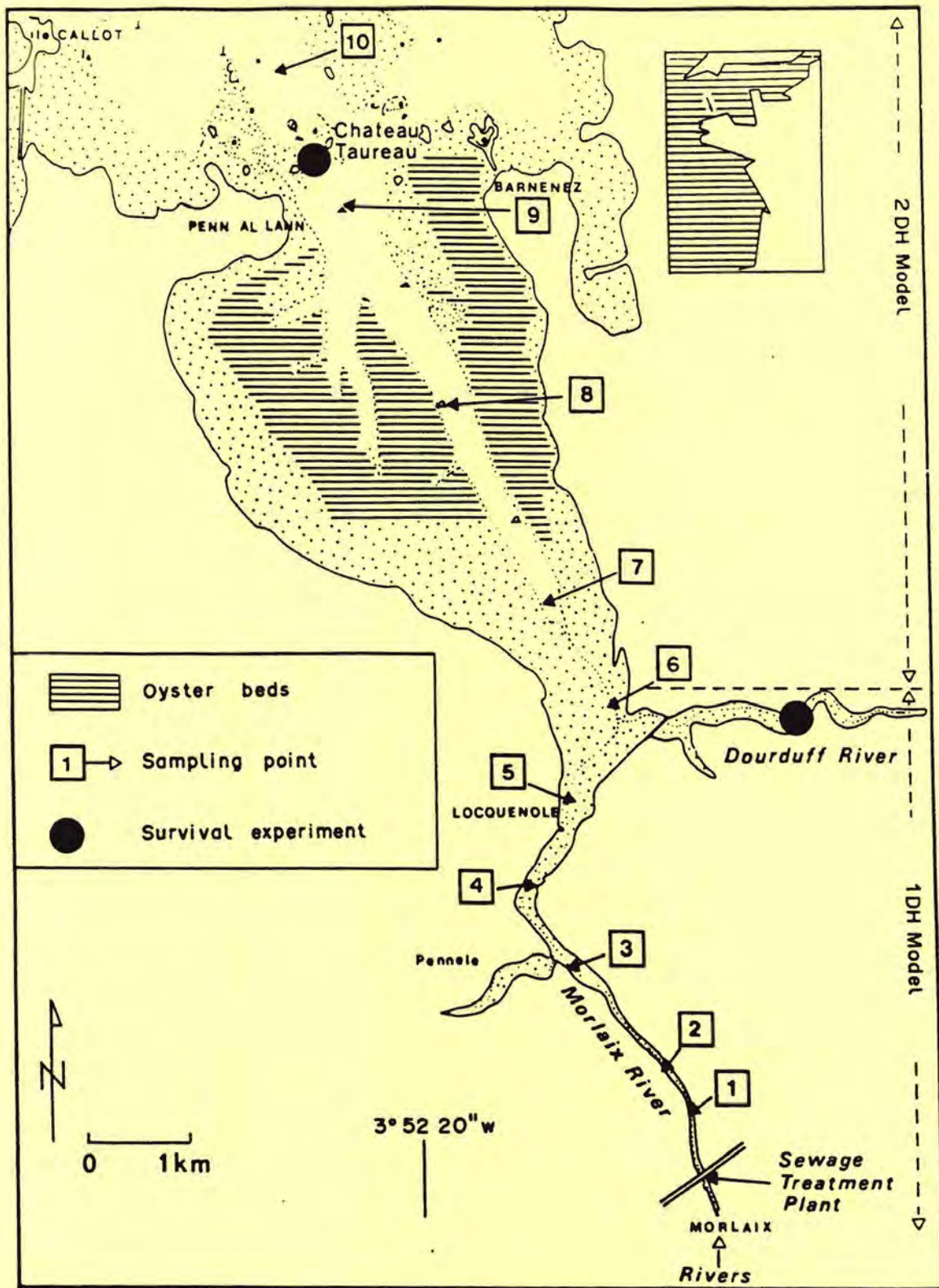


Fig. 1. Map of the Morlaix estuary.

movements, and to make the basis for the bacterial model itself.

The technique of modelization in residual time was discarded at first because of the estuarine morphology (narrow channel, extensive shoaling banks), the macrotidal character of the estuary and the possible complexity of the bacterial behaviour. On the contrary, the actual complexity and financial cost of three-dimensional real time models were considered prohibitive drawbacks for the anticipated simulations. Thus, a set of two numerical models in real time was built: seaward from the Dourduff confluence (Fig. 1) the model is two-dimensional in the horizontal

plane (2DH); upstream from the same limit it is only one-dimensional (1DH), with a distinct branch for each of the two main rivers. Such models have been extensively used and improved by numerous investigators over the last 20 years. They are now efficient and reliable tools (Leendertse and Gritton, 1971; Salomon, 1985; Wallis *et al.*, 1989). This 2DH model is original because it takes account of all shoaling areas by shifting its lateral limits back and forth throughout the calculations. Similarly in the 1DH, a distinction was made between the channel (conveying part of the section) and lateral areas (inundation areas only).



Under these hypotheses, the mathematical equations for hydrodynamics are as follows:

#### Two-dimensional model

$$\frac{\partial u}{\partial t} + u \frac{\partial u}{\partial x} + v \frac{\partial u}{\partial y} - fv + g \frac{\partial h}{\partial x} + gv \frac{\sqrt{u^2 + v^2}}{k_r^2 H^{4/3}} - \mu \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} \right) = 0 \quad (1)$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} + u \frac{\partial v}{\partial x} + v \frac{\partial v}{\partial y} + fu + g \frac{\partial h}{\partial y} + gv \frac{\sqrt{u^2 + v^2}}{k_r^2 H^{4/3}} - \mu \left( \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} \right) = 0 \quad (2)$$

$$\frac{\partial h}{\partial t} + \frac{\partial(hu)}{\partial x} + \frac{\partial(hv)}{\partial y} = 0. \quad (3)$$

#### One-dimensional model

$$\frac{\partial u}{\partial t} + u \frac{\partial u}{\partial x} + g \frac{\partial h}{\partial x} + g \frac{u|u|}{k_r^2 R_h^{4/3}} - \mu \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} = 0 \quad (4)$$

$$\frac{\partial \sigma_t}{\partial t} + \frac{\partial(\sigma_t u)}{\partial x} = 0 \quad (5)$$

where

- ( $u, v$ ) = velocity components
- ( $x, y$ ) = horizontal coordinates
- $t$  = time
- $h$  = surface level
- $H$  = water depth
- $f$  = Coriolis factor
- $k_r$  = friction coefficient
- $\mu$  = horizontal viscosity
- $R_h$  = hydraulic radius
- $\sigma_t$  = total cross-section
- $\sigma_c$  = channel cross-section.

Since both models are linked, no external information is needed at their junction. The only boundary conditions required for them to run simultaneously are the tidal amplitude in the sea and the water discharge of the two rivers.

The numerical systems are solved by classical finite difference techniques (Salomon, 1976; Orbi and Salomon, 1988).

The choice of the grid size is a compromise between the need for accuracy and the need to remain within acceptable computational costs. It is actually 250 m, which allows for long-term simulations of a few weeks.

#### Advection/dispersion computation

The advection/dispersion model obeys the same schematization as the hydrodynamic part. The equations are as follows:

#### 2DH model

$$\frac{\partial HC}{\partial t} + \frac{\partial(HuC)}{\partial x} + \frac{\partial(HvC)}{\partial y} - \epsilon \left( \frac{\partial \left( H \frac{\partial C}{\partial x} \right)}{\partial x} + \frac{\partial \left( H \frac{\partial C}{\partial y} \right)}{\partial y} \right) = 0. \quad (6)$$

#### 1D model

$$\frac{\partial(\sigma_t C)}{\partial t} + \frac{\partial(\sigma_t u C)}{\partial x} - \frac{\partial \left( \epsilon \sigma_c \left( \frac{\partial C}{\partial x} \right) \right)}{\partial x} = 0 \quad (7)$$

where

- $C$  = concentration
- $\epsilon$  = horizontal dispersion.

All other notations as before.

This system is solved by a finite difference technique, second order accurate in time and third order in space, conservative and with very little numerical dispersion (Leonard, 1981).

#### Bacteriological studies

**Sampling trips.** Sampling trips were carried out to estimate the faecal contamination of the bay; eight different hydrodynamical and seasonal conditions were investigated:

—In summer, during neap tides on 1 July 1986 and 3 June 1987, and during spring tides on 23 June 1986 and 12 June 1987.

—In winter, during neap tides on 15 October 1987 and 25 March 1988, and during spring tides on 23 October 1987 and 17 March 1988.

Sampling points are shown in Fig. 1.

Waters were also sampled in the sewage treatment plant, every 2 h over 24 h (6 April 1986) in order to estimate the fluxes.

Water samples were collected in sterile bottles which were all refrigerated immediately. Incubation began 4–10 h after collection. Enterobacteria were enumerated by standard membrane filter techniques (Millipore HAWG 0.45  $\mu$ ) with incubation on Drigalski agar (oxid).

This medium previously used by Pommepuy *et al.* (1987), is selective gram negative bacilli, incubated at 42°C for 24 h. Only lactose positive colonies were counted and characterized as Enterobacteria. Identifications showed that most of these bacteria were *Escherichia coli*, *Enterobacter*, with some *Klebsiella* and *Citrobacter* also present.

**Survival trials.** Survival trials were carried out in the field to determine the die-off rate (T90).

**Culture preparation.** The strain used was *Escherichia coli* H 10407 from Evans isolated, provided by Joly

Table 1. Die-off rate  $K$  (days<sup>-1</sup>) and T90 (days) in Morlaix estuary during seasonal trials in the field (dark and light chambers)

Date	Location*	Sunny h/day	IC <sub>max</sub> † ( $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ )	Mean water temp. (°C)	Secchi (m)	Chambers	Numbers of samples	Die-off rate $K$ (base e) (days <sup>-1</sup> )	Standard error of $K$	T90 (days)
June 1987	1	1	—	15	—	Light	25	-0.972	0.105	2.36
						Light	22	-0.857	0.190	2.68
Jan., Feb. 1988	1	3	400	9.8	2.7	Light	6	-3.019	0.391	0.76
						Light	15	-3.183	0.319	0.72
Jan., Feb. 1988	2	3	400	8.4	0.45	Dark	16	-1.612	0.151	1.40
						Light	18	-0.255	0.041	9.60
June 1988	1	13.4	2000	15.6	5.40	Dark	27	-0.241	0.041	9.82
						Light	8	-26.15	2.18	0.08
						Light	16	-20.12	4.48	0.11
						Dark	18	0.931	0.124	2.46

\*Location 1: Chateau du Taureau; 2: Dourduff estuary.

†IC<sub>max</sub>: maximal sun-radiation received by cells in the chamber.

(Clermont-Ferrand, France). Cell suspensions were exponential phase cultures in 100 ml Tryptone Soy Broth (oxid) incubated at 37°C. Cells were washed three times with physiological water after centrifugation (4°C—15 min, 1900 g). Cultivable bacteria were recovered on Drigalski agar (oxid), incubated at 37°C. Colonies were counted after 1 day overnight incubation.

*Survival experiments.* The experiments were carried out using sterilized membrane chambers as described by Fliermans and Gordon (1977). Each chamber was filled directly in the field using a peristaltic suction pump, with air removed by sea water stirring through the membrane (Millipore HAWG 0.45  $\mu$ ) into the chamber (600 ml vol). This technique enables immediate equilibration of the chamber on the test site.

One ml of *E. coli* suspension was introduced into the chamber. Aliquots were periodically withdrawn and put into sterile tubes, and testing began immediately.

As previously mentioned, two different series of experiments were conducted in summer (June 1987, June 1988) and in winter (January, February 1988). In each case two separate trials were carried out:

—At the seaward extremity of the estuary (near Penn-al-Lann, Fig. 1), where salinity, turbidity and temperature were almost constant (resp. 36.2‰, 2.5 mg/l, 14°C in summer and 35‰, 7.8 mg/l, 9°C in winter) DOC values were close to 0.5 mg/l, DOP 0.2 mg/l (the percentages of degradable matter were about 7 and 50–60%, respectively).\* The extinction coefficient of the water was 0.26/m and the maximum light intensity received by cells in the chambers 400  $\mu$ Einstein/m<sup>2</sup>/s in winter, and 2000  $\mu$ Einstein/m<sup>2</sup>/s during exceptionally sunny conditions.

—In the Dourduff estuary, salinity ranged from zero to 15‰, average temperature was 15.8°C in summer and 8.6°C in winter and turbidity ranged from 15 to 120 mg/l. DOC values were close to 5 mg/l, POD 10 mg/l. The percentage of degradable matter was about 40–50% for each parameter.\* The extinction coefficient (between 1 and 3.5/m) was much higher than in the bay and light intensity received by cells in the chambers was very low: ranging from 2 to 295  $\mu$ Einstein/m<sup>2</sup>/s.

To test the direct effect of light on survival, the experiments included both light and dark diffusion chambers immersed at approx. 0.3 m depth and supported by floating buoys.

## (2) The bacteriological model

Mathematical equations describing the behaviour of bacteria were the same as for any dissolved constituent [equations (6) and (7)], except for a special sink/source term which must summarize all behavioural aspects of these living organisms. This is clearly a key point in the modelling task, however very poorly understood. The behaviour of faecal bacteria depends on several factors such as temperature, pH, nutrient supply and solar radiation. Since all of these parameters are difficult to study in the field, we chose to use a general law which could favourably integrate all of these factors. Several such models have been proposed by Crane and Moore (1986) to predict bacterial die-off in soil and seawater.

Model results and above mentioned measurements showed that a simple first-order reaction could be efficient enough to obtain a reasonable level of accuracy:

$$\frac{dc}{dt} = -kc.$$

In state of decay coefficient ( $k$ ), another parameter is used here, which is the time needed for 90% of bacteria to die: T90. It is closely linked to  $k$  by the following equation:

$$T90 = 2.3/k.$$

\*A. Aminot (IFREMER) personal communication.

## Data from the hydrodynamic simulations

Results obtained for the northern part of the model (north of Penn-al-Lann, Fig. 1) may be questionable because of possible inaccuracies in the boundary conditions, these have not been interpreted.

Calculations reveal that for average spring tides, 96 Mm<sup>3</sup> enters and leaves the bay, compared to 0.17 Mm<sup>3</sup> introduced by the rivers at the same time and to 24 Mm<sup>3</sup> remaining in the estuary at low tide. This indicates a fast renewal of the waters, explaining the predominant marine regime of the estuary.

Instantaneous velocity fields [Fig. 2(A) and (B)] show the role of the axial channel which conveys water fluxes: currents diverge from it in flood, and converge to it in ebb. The resulting gradients are useful for dispersing dissolved matter. Velocities reach one knot in flood and 0.8–0.9 knots in ebb. The tidal excursion is thus 6–7 km. Over the shoaling banks, currents are reduced by a factor of about two, depending on the time and location.

The long-term currentology (Fig. 3) is presented by the eulerian residual velocity field. The channel appears to be predominantly a flood channel, whereas the lateral banks are ebb dominated. This is a well known phenomenon which is due to the kinetic energy acquired by water flowing through an inlet and confirmed here by a lagrangian exploitation of instantaneous velocity fields, also presented in Fig. 3: dots are drifters released across the entrance of the bay at mid-flood and reported every 2 h. At mid-ebb lateral drifters were carried out of the bay while those in the channel remained inside. This is of great interest with respect to contamination of the oyster beds by upstream and lateral polluted water discharge.

Verification and tuning of this part of the model was done through comparisons of salinity simulations with measurements under different marine and fluvial conditions.

Some results are presented in Fig. 4. The main divergence between computations and observations is due to the fact that the upper estuary is clearly stratified, whereas the constructed model, is not.

By this estimate, computed salinities at high tide seem correct for spring and neap tides, during low or high river flow rates.

At low tide the agreement is less correct but the measurement spread was also greater. It seems that computed values were rather too high in the upper reaches, too weak in the lower reaches and then correct in the 2D model. Relative discordance between measurements for similar hydrodynamic conditions suggests that other factors may have come into effect, such as: the wind, waves or the locations where measurements were carried out, sometimes from a boat in the channel and sometimes from the shore. Drainage of mud banks or small lateral

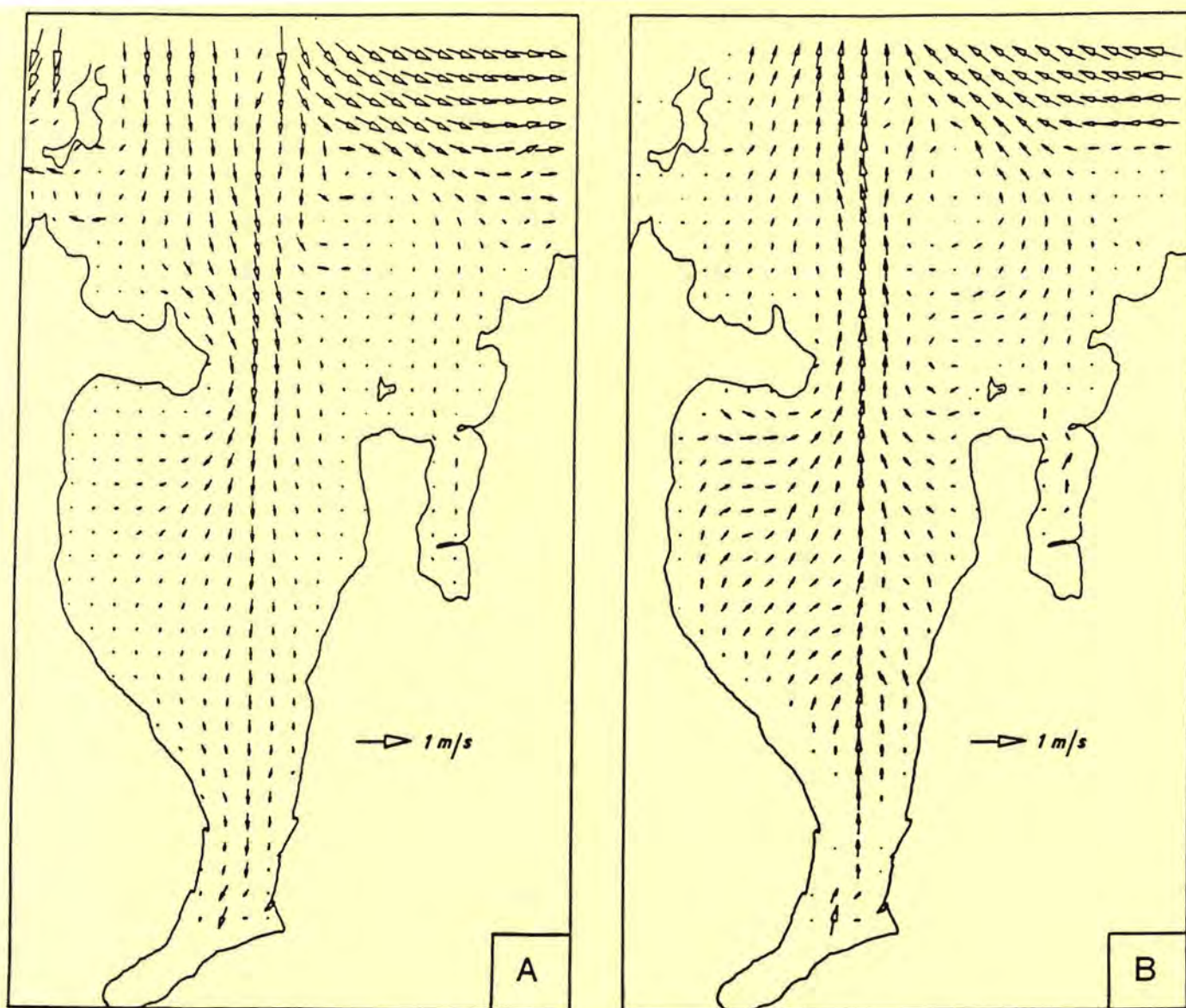


Fig. 2. Example of an instantaneous velocity field, in spring tide (A) flood; (B) ebb.

tributaries, not included in the model, may also have caused some of these discrepancies.

Despite these differences, quite usual when comparing elements as different as simulations and observations, the model is considered to be reasonably reliable and worth being utilized.

**Transit time.** Since many processes in the estuary are time-dependent, the "detention time", sometimes called "flushing time" or "residence time", is a very useful parameter to know. Using the model we calculated a more complete function which is termed "transit time", defined as the average time needed by particles released at the head of the estuary to reach any downstream location. It can easily be calculated by the following formula:

$$\frac{\int_x^L \int_\sigma \frac{S_0 - S}{S_0} d\sigma \cdot dx}{Q} = t(x)$$

where

$L$  = head of the estuary  
 $S$  = local salinity

$S_0$  = marine salinity  
 $Q$  = fluvial discharge.

As this expression is based on a one-dimensional simplification, it has to be preferentially used for the upper part of the estuary. Results are shown in Fig. 5 for high and low river runoff and for the first 8 km of the estuary: as expected, it increased seaward from 0 to 5 days with low river outflow and only to 2.5 days during higher river discharge (three times the average). Comparing these time durations to periods of other chemical or biological reactions already gives an indication of which part of the estuary will eventually be concerned.

**Bacteriological behaviour.** Die-off results are presented in the following table [die-off rate  $K$  ( $\text{days}^{-1}$ ) and T90 values (in days)]. Various T90 values were observed for different ambient conditions:

—Near the sea T90 ranged between 2.2 h and 2.6 days. For very sunny weather T90 values were similar (2 h) to those cited in the literature (Bellair *et al.*, 1977; MacCambridge and MacMeekin, 1981),

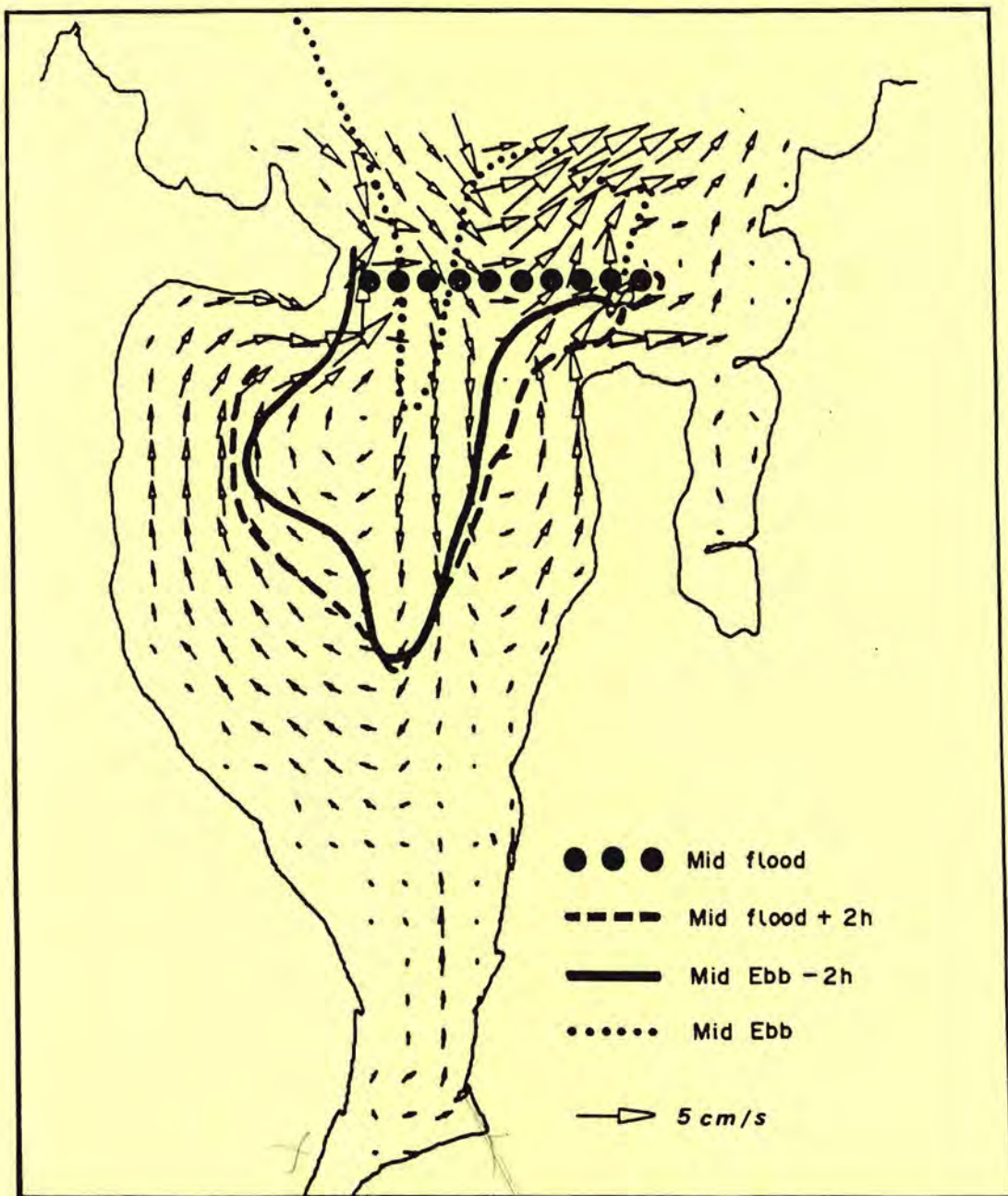


Fig. 3. Residual velocities and drifter movements.

but due to high turbidities and low sunlight, it was usually found to be about 1 or 2 days.

—Inside the estuary, counts decreased very slowly whether the chambers were light or dark. T90 were very long: 9–10 days. These low die-off rates are due to environmental conditions. The cells could not receive high sun-radiation because turbidity decreased light penetration dramatically. However, in this environment organic matter creates favourable conditions for *Enterobacteria* survival. Similar results were found by Alibou (1987) in lagoon effluents of Meze and Gameson (1984) in the laboratory with suspended solids.

#### *Bacterial dispersion*

The model was initially run without including any decay conditions. Bacteria were thus treated as conservative elements and data obtained only referred to physical parameters: dispersion and advection.

Some results are presented in Fig. 6, for a 3 week simulation during a period of low river flow, which began during a neap tide with no contamination in the estuary. *Enterobacteria* originated from both the rivers and the treatment plant.

Figure 6 refers to different sampling locations, equally spaced 4 km apart, along the channel of the estuary. It shows the progressive decrease of contamination from  $10^7$  bacteria/100 ml in the sewer tube, to some  $10^5$  bacteria/100 ml at the top of the estuary and  $10^2$  near Penn-al-Lann. It also shows the relative time variations of this contamination: only a factor of two in the upper part, but generally between 10 and 100. This factor reflects the local currentology and axial concentration gradients.

This figure also shows the effect of the variation in tidal amplitude and even the hysteresis of the estuary, to some degree. As the fortnight tidal cycle proceeds, a given concentration is located somewhat a little

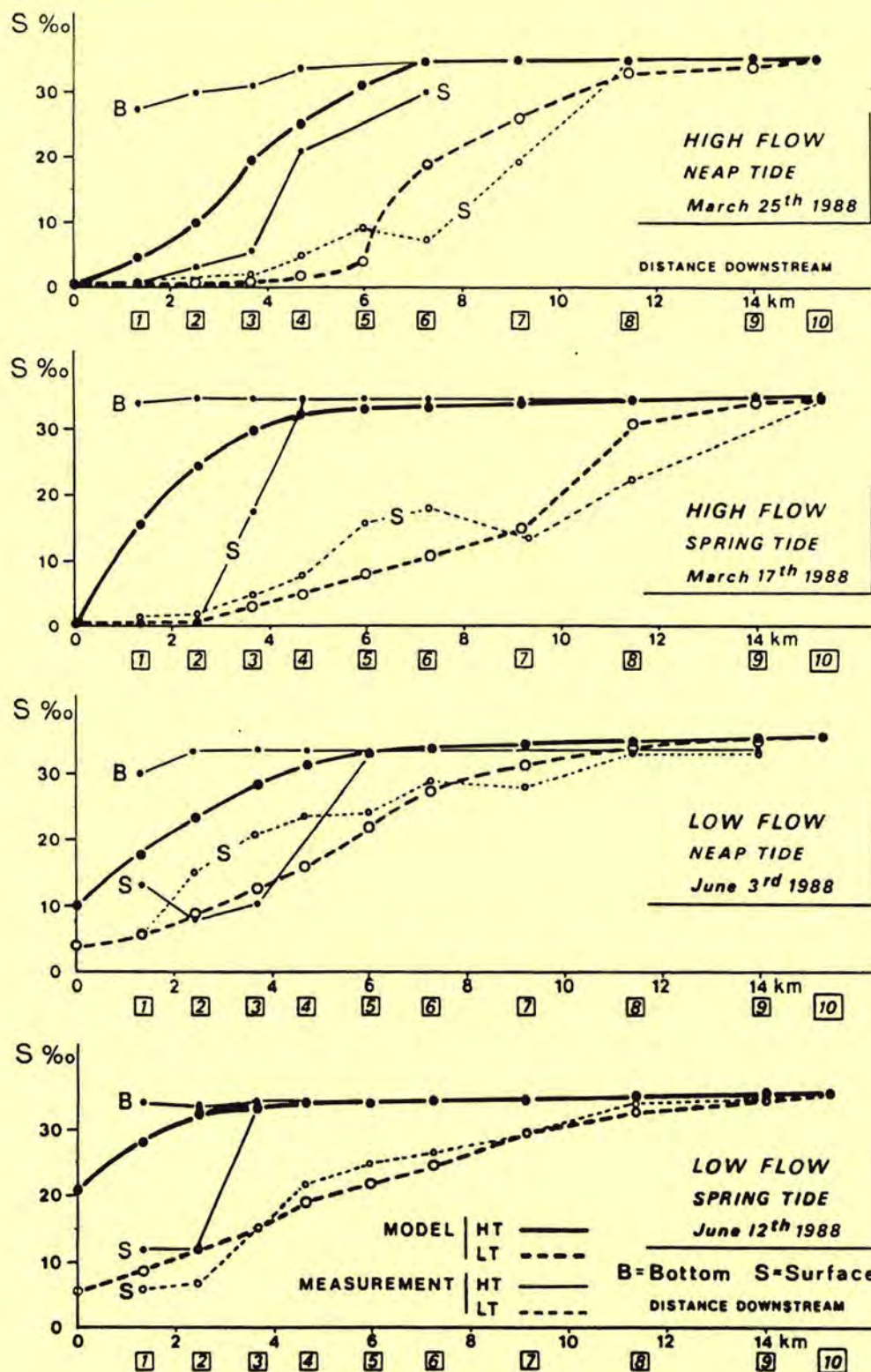


Fig. 4. Comparison between observed and computed salinities.

more seaward when tidal amplitude increases, than when it decreases.

Another very important factor which can be seen is the transit time. Since the initial model condition referred to no contamination, comparing concentrations during the first hours to similar values 2 weeks later gives an indication of the time needed for released material to reach any location. As this is clearly an asymptotic process, here we used the time needed for the concentration to reach 50% of the final value. Results are presented in Fig. 5. They agree

with previous results, established from the one-dimensional exploitation of fresh water content, and extend them closer to the sea. Transit time hardly exceeded 3.5 days in the main channel, and 4 days in lateral areas.

Here also, comparing these values to the die-off coefficient indicates in which geographical location the estuary will be contaminated. When the water is clear on sunny summer days, and T90 is about an hour, only the upper reaches can be contaminated. On the contrary, in winter when the weather is cloudy

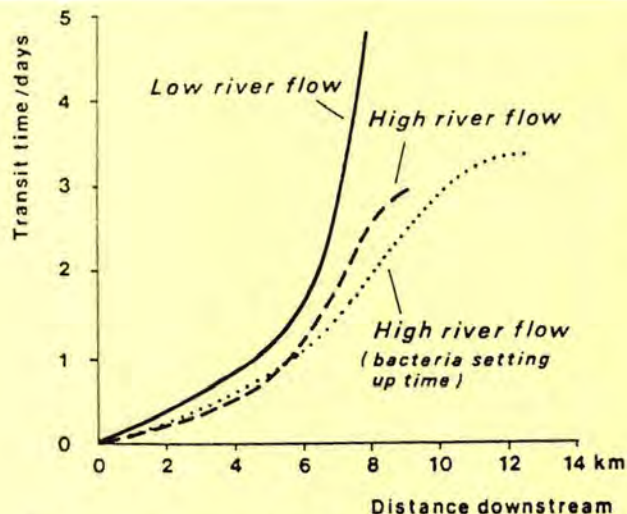


Fig. 5. Transit times deduced from fresh water content and bacterial concentration.

and turbidity is high,  $T_{90}$  is about a week, the only mechanism reducing bacterial concentration is physical dilution. In this case, values may be close to the ones calculated in this simulation.

#### Comparisons with observed contaminations

Figures 7 and 8 compare computed and observed bacterial contamination for two different water discharges. It can easily be seen that upstream of the estuary data for both are quite similar, whereas downstream model results are too high by a factor of a few tenths. This can be attributed to mortality.

#### Simulations including bacterial dispersion and die-off

The following model tests were carried out including the die-off rate which was measured as previously explained. Results are shown on Figs 7 and 8. Compared to preceding tests close to the head of the

estuary, results were very similar because  $T_{90}$  was much longer than the residence time there. It was different in the lower reaches where computed values decreased by a factor of 10–100, thus being much closer to measurements.

A detailed examination shows that, very near the upstream extremity, low tide measurements were about three times higher than computed values. This could be attributed either to an incomplete lateral mixing of the effluent in the estuarine waters, or to the high turbidities existing at that time when previously released bacteria were put in suspension.

Apart from *in situ* experiments, different simulations were carried out for various  $T_{90}$  values in order to determine empirically which would be the more correct evaluation of this decay factor. Results are presented for both summer and winter situations.

*Summer situation, low river flow [Fig. 7(A)].* We observed that  $T_{90}$  ranging between 2 and 8 days did not induce great differences. Physical factors are thus dominant mechanisms, which confirms previous data obtained when considering transit time. However,  $T_{90}$  at 2 h lead to concentrations which were much too low and does not appear to be a realistic value although often cited in the literature. The best agreement was obtained for  $T_{90}$  at about 24 h.

This confirms our laboratory experimental results and explains why high bacterial contaminations are often found in coastal areas. On the whole, the effect of physical factors throughout the estuary was to decrease concentrations by a factor of about  $10^4$ , from  $10^6$  bacteria/100 ml in sewage outfalls to  $10^2$  at the seaward edge, whereas biological processes caused a decrease of  $10^2$  only. A more detailed examination of the ratio between these two coefficients shows that upstream physical processes

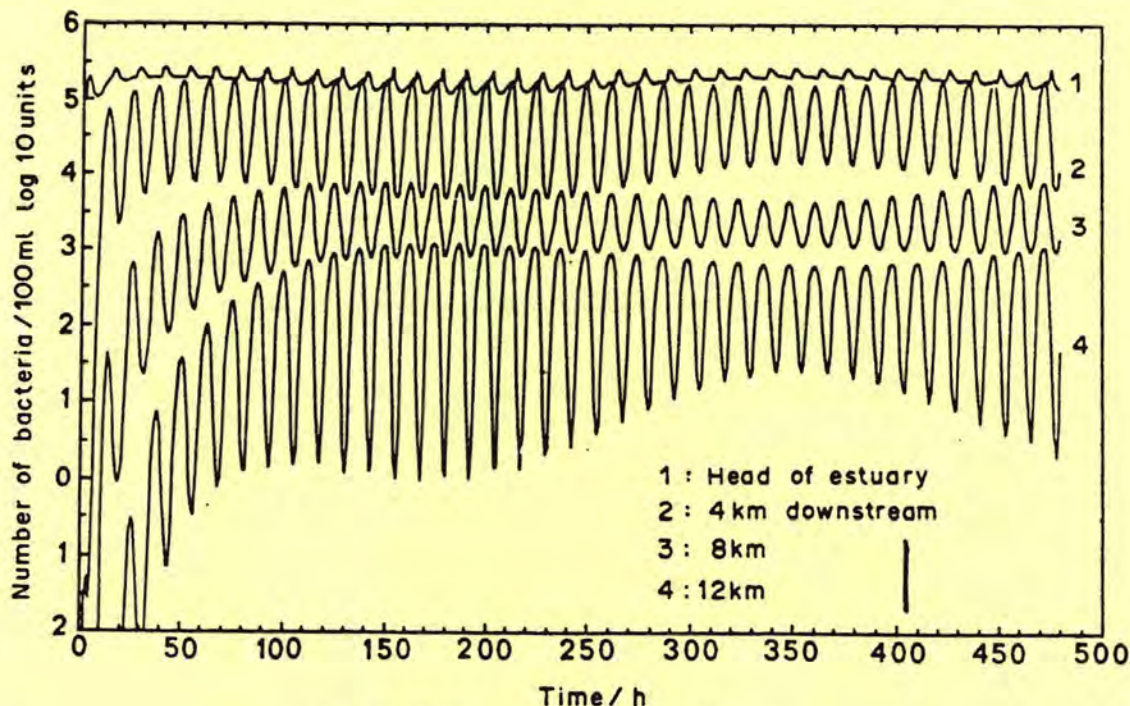


Fig. 6. Model results with no die-off terms.

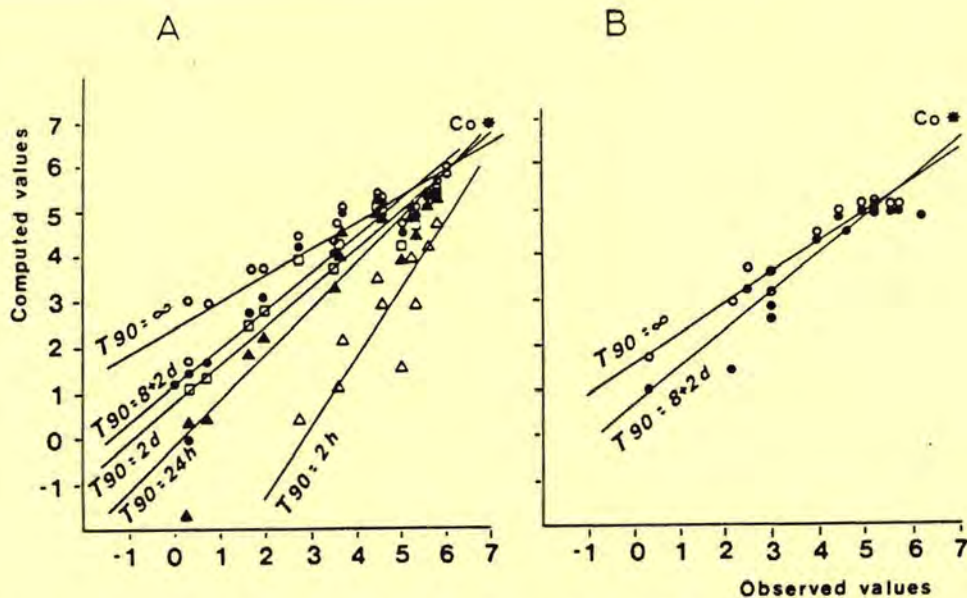


Fig. 7. Computed vs measured bacterial concentrations (expressed in  $\log_{10}$  of bacterial concentration/100 ml).  $C_0$  = initial value. (A) Summer (3 June 1987), (B) winter (15 Oct. 1987).  $T_{90} = \infty$  (○);  $T_{90} = 8 + 2$  days (●);  $T_{90} = 2$  days (□);  $T_{90} = 24$  h (▲);  $T_{90} = 2$  h (△).

are dominant, whereas downstream physical and biological factors play more equivalent roles.

*Winter, high river flow [Fig. 7(B)].* In this case, best results were obtained for distinct  $T_{90}$  values throughout the estuary: 8 days upstream and 2 days downstream. Compared to the summer situation, physical dilution appears even more important (factor  $10^5$ ), with the biological effect still decreasing (factor 50), which seems coherent with bacterial behaviour during winter conditions.

Time variations in bacterial contamination along a tidal cycle accompanying the modification in time of the estuarine geometry are illustrated in

Fig. 8. Comparison with observed values are shown in Fig. 7. We can see the more polluted waters coming from upstream by the channel during ebb and renewed waters entering the estuary by the channel during flood. This results in great variations in the contamination of areas located near the estuarine axis, and the contrary is true for the more lateral zones which, although close to the sea, remain either emerged or covered by contaminated waters. As most oyster beds are situated there and are never exposed to pure marine water, they are very sensitive to sewage coming from upstream.

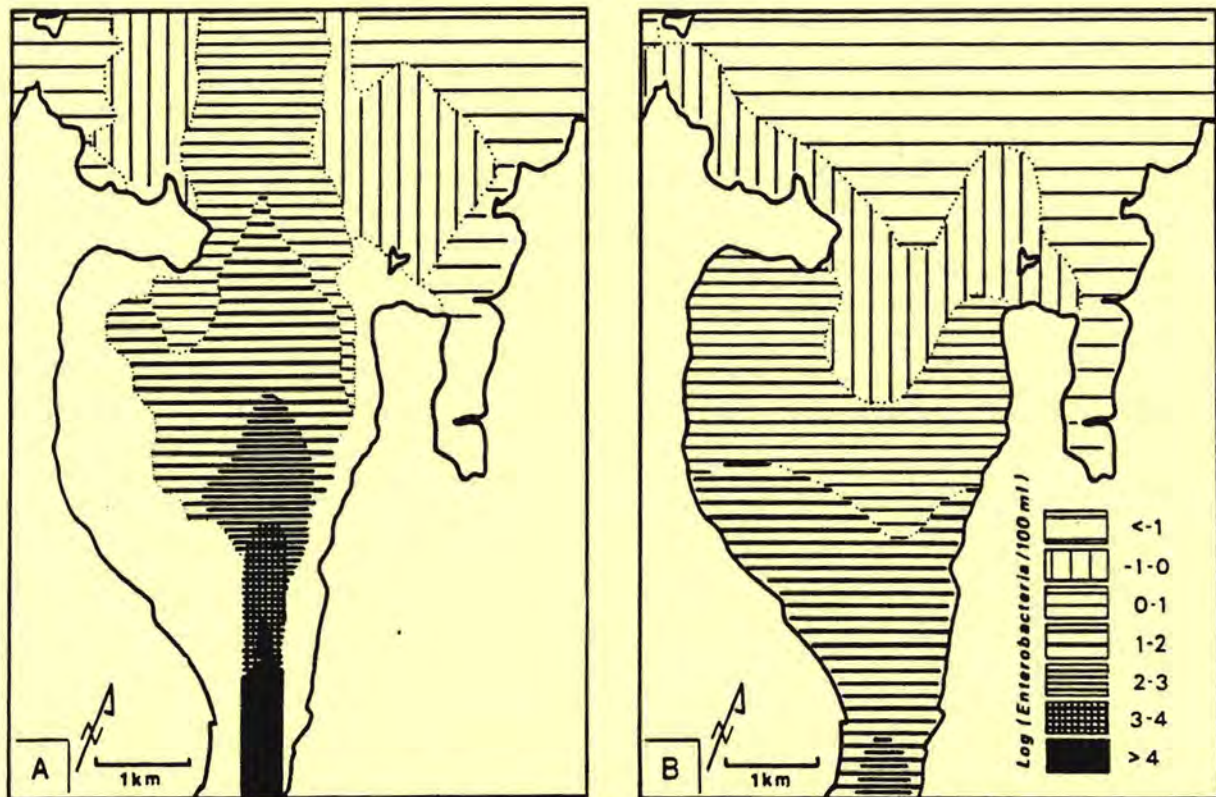


Fig. 8. Concentration maps (computed values). (A) Low tide; (B) high tide.

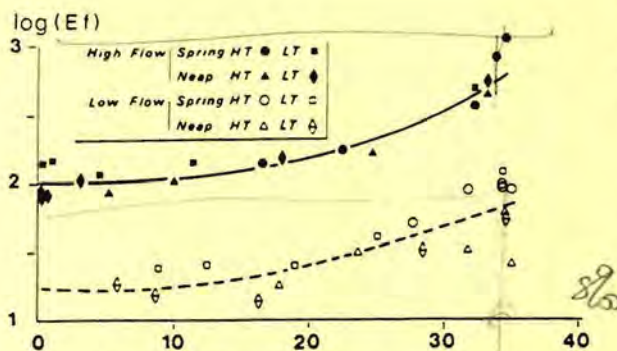


Fig. 9. Relative physical/bacterial decay efficiency.

To summarize most of the information contained in these simulations, we calculated the relative efficiency of bacterial mortality and physical dilution. If  $C'(x)$  is the concentration throughout the estuary calculated for an infinite value of  $T_{90}$ , its comparison with the concentration in the sewage outfall ( $C_0$ ), indicates the efficiency of the physical mechanisms alone:

$$\text{Phy}(x) = C_0/C'(x).$$

The same ratio between  $C'(x)$  and the real bacterial concentration  $C(x)$ , quantifies the role of biological factors:

$$\text{Bio}(x) = C'(x)/C(x).$$

Finally the relative physical versus biological efficiency can be written as:

$$E_f(x) = \text{Phy}(x)/\text{Bio}(x) = C_0 * C(x)/C'(x)^2.$$

This function is presented in Fig. 9. It clearly shows that, in the estuary of Morlaix, physical mechanisms are much more efficient for reducing bacterial sanitary risk, than mortality. Many reasons may explain this physical predominance:

—Currents induced by a high tidal regime, irregularities in bathymetry and the existence of two distinct rivers, gives a great capacity for dispersion; restricted volume of water remaining in the upper estuary during low tide minimizes the transit time.

—High turbidities, moderate insolation and abundance of nutrients make the bacterial mortality unusually small.

In the outer estuary, less turbidity and lack of nutrients, combined with a greater capacity for dispersion make  $E_f$  higher than upstream.

$E_f$  also appears to be very sensitive to the river flow. When this parameter increases, dilution in the upper reaches becomes conspicuously higher, and simultaneously residence time decreases, making  $E_f$  higher still.

#### Some ways to improve the present situation

A numerical model not only gives a better understanding of complex mechanisms, it can also be used

to make suggestions for improving the present situation, either by decreasing the bacterial input, by changing the outfall location or even making some modifications of the estuarine geometry itself.

—The effect of decreasing the amount of bacteria released, through some improvements to the sewage treatment plant operations can be considered in Fig. 8: as advection/dispersion equations [(6) and (7)] are linear with respect to the concentration, a decrease in the released quantity by a certain factor will result in concentrations being divided by the same ratio. Considering the bacterial standards (<300 faecal coliforms/100 ml) the STP outflow would have to be reduced by at least a factor of 10. Since its actual efficiency is poor, this goal is not unreasonable.

—Moving the outfall location seaward would decrease contamination of the upper reaches but increase it downstream, making the situation even worse for the numerous oyster beds situated there. Few improvements would be obtained in this way, unless the outfall is shifted much farther out to sea.

—Even minor modifications of the estuary could lead to serious changes. Out of interest, we tested the effect of a submerged weir supposed by built a few kilometers down from the outfall. The idea being that physical dilution already acts efficiently in this estuary whereas mortality does not because transit times are too short compared to  $T_{90}$ . Since boats cannot enter the estuary at low tide, such a weir or bank would not be very constraining for shipping. However it could prevent sewage material from reaching the oyster beds too quickly and let mortality play its role.

As a rough test we supposed this weir was built about 1 km downstream from the Dourduff confluence reaching to mid-water level. Results are shown in Fig. 10. This seems to improve the situation: in vulnerable areas of the estuary, bacterial contamination is now under the bacterial standards and shellfishing can be carried out without the need for an additional depuration basin.

This is in no way a final solution to the contamination problem of this area. It is only meant to show how a numerical bacteriological model can be used to explore new ways of improving water quality in complex hydraulic areas.

#### CONCLUSION

The sanitary problem of the Morlaix estuary motivated the development of a physical/bacteriological mathematical model.

The physical part of the model is based on well-known physical laws and, for testing and tuning purposes, only a few salinity measurements were necessary. This first step gave information on currentology, water fluxes, transit times and trajectories, which is of great help in understanding the dynamics



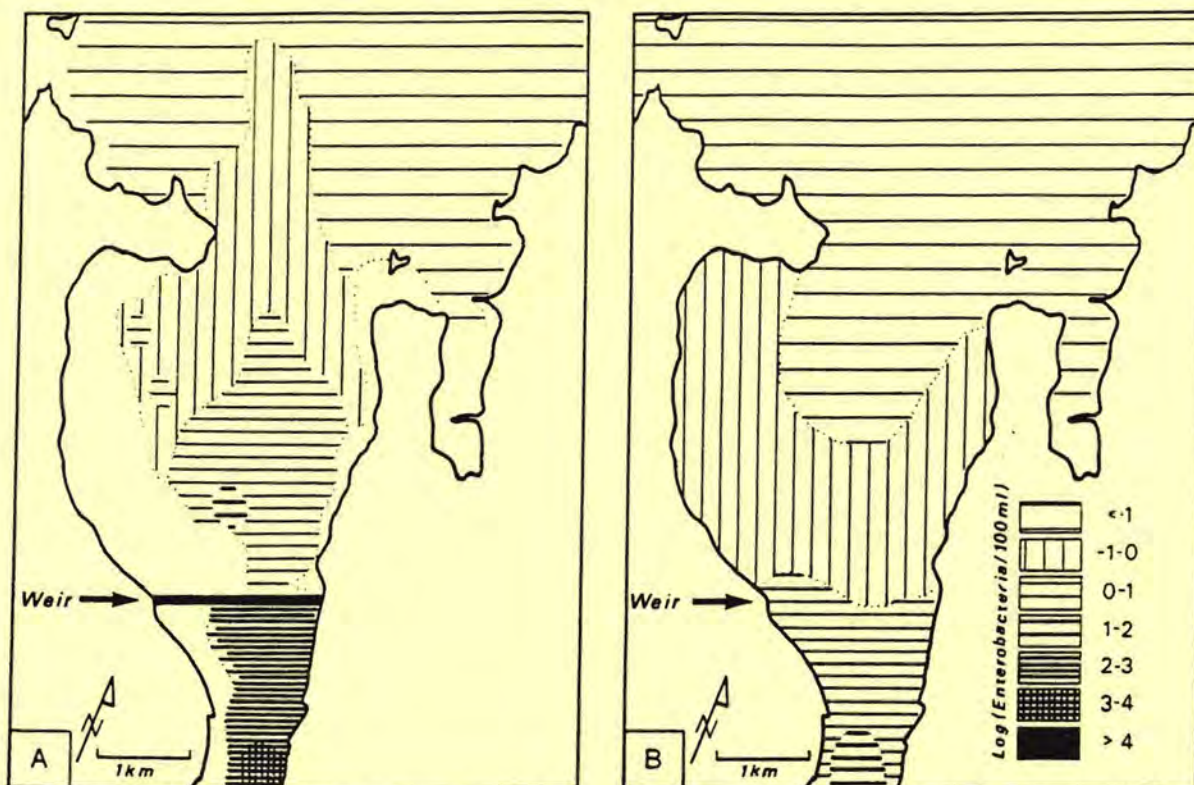


Fig. 10. Concentration map in a modified estuarine geometry. (A) Low tide; (B) high tide.

of the estuary. Transit times were found to be surprisingly minimal. They are a consequence of the hypsometry and the macrotidal regime of the estuary.

The bacteriological part of the model, based on more questionable parameters, required a specific study of bacterial behaviour. Measurements revealed T90 values as high as 1 week in winter. This shows that in such rich and turbid waters bacteria can survive for long periods of time.

With the information input, the model compared well with *in situ* bacterial contamination measurements, thus confirming the preceding assertion. A detailed analysis of model data shows that in all circumstances physical dilution processes are much more efficient in this estuary than bacterial die-off.

The model also provides much information which is impossible to determine by measurement, such as: obtaining a complete synoptic view of contamination all over the estuary under different marine and fluvial conditions. It is irreplaceable for interpreting limited measurements and could be useful for determining better economical, ecological or recreational uses of the natural site.

It can also function to define the modifications needed for improving the actual situation. This possibility has only been sketched here and should be the subject of further studies.

This modelling exercise is also of interest because the numerical code written for Morlaix estuary may be easily transformed for use in other coastal areas. The model is thus a general management tool, but dedicated to high hydrodynamic areas: since the predominating factor controlling the decay of enteric bacterial concentrations is the dilution, it is

not necessary to investigate all of the physical or biological factors responsible for mortality. However, in lagoon or stagnant coastal areas, where transit times are very high, other factors such as temperature, pH, solar radiation could play major roles in bacterial decay. It would therefore be necessary to define all of the factors needed to design real bacterial models adapted to such environments.

#### REFERENCES

- Alibou Jamal (1987) Etude de l'évolution simultanée des abondances et de la survie de salmonella et des coliformes fécaux dans différents ouvrages épurateurs et milieux aquatiques (1987). Thèse de Doctorat d'Etat, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- Bellair J. T., Parr-Smith G. A. and Wallis I. G. (1977) Significance of diurnal variations in fecal coliform die off rates in the design of ocean outfalls. *J. Wat. Pollut. Control Fed.* 49, 2022-2030.
- Crane S. R. and Moore J. A. (1986) Modeling enteric bacterial die-off: a review. *Wat. Air Soil Pollut.* 27, 411-433.
- Fliermans C. B. and Gorden R. W. (1977) Modification of membrane diffusion chambers for deep-water studies. *Appl. envir. Microbiol.* 33, 207-210.
- Gameson A. L. M. (1984) Investigations of sewage discharges to some British coastal waters, Chap. 8. Bacterial mortality, part 1. WRC Technical report TR 201.
- Leendertse J. J. and Gritton E. C. (1971) A water quality simulation model for well mixed estuaries, Vol. II, computation procedures. The New York City Rand Institute Technical Report R-708-NYC.
- Leonard B. P. (1981) A survey of finite differences with upwinding for numerical modelling of the incompressible convective diffusion equation. In *Computational Techniques in Transient and Turbulent Flow*, pp. 1-35. Pine-ridge Press, Swansea.

- MacCambridge J. and MacMeekin T. A. (1979) Effect of solar radiation on predacious microorganisms on survival of faecal and other bacteria. *Appl. envir. Microbiol.* **41**, 1083-1087.
- Orbi A. and Salomon J. C. (1988) Dynamique de marée dans le golfe Normand-Breton. *Oceanol. Acta* **11**, 55-64.
- Pommepuy M., Cormier M., Brunel L. and Breton M. (1987) Etude de la flore bacterienne d'un estuaire breton (Elorn, rade de Brest, France). *Oceanol. Acta* **10**, 187-196.
- Salomon J. C. (1976) Modèle mathématique de la propagation de la marée en estuaire, et des transports sableux associés. Thèse Doctorat es Sciences, Brest, France.
- Salomon J. C. (1985) Modèles mathématiques de courantologie en zone littorale. *Coll. fr.-Japon. Océanogr., Marseille 16-21 Sept.* **1**, 35-44.
- Wallis S. G., Crowther J. M., Curran J. C., Milne D. P. and Findlay J. S. (1989) Consideration of a one dimensional transport model of the upper Clyde estuary. In *Advances in Water Modelling and Measurement* (Edited by Palmer M. H.). BHRA, Cranfield, Bedford.

**VIII - Article 5 :**

**Modélisation du transport dissous et  
particulaire dans l'estuaire de Morlaix.  
Application au devenir  
des bactéries entériques.**

# Modélisation du transport dissous et particulaire dans l'estuaire de Morlaix.

## Application au devenir des bactéries entériques

P. Le Hir (\*), J.F. Guillaud (\*), M. Pommepey (\*), F. Le Guyader (\*\*), J.C. Salomon (\*)

### 1. Introduction

Les sites estuariens, souvent propices au développement de la conchyliculture, sont aussi soumis à de nombreux apports anthropiques qui peuvent altérer leur qualité sanitaire.

Les efforts économiques et techniques qui doivent être entrepris pour réduire la contamination bactériologique de ces zones nécessitent le développement d'outils capables de prédire le transport dissous et particulaire des bactéries fécales et d'intégrer le comportement (temps de mortalité, adsorption...) de ces mêmes bactéries en mer.

Une étude de ce type a été développée sur l'estuaire de Morlaix, localisé sur la côte nord de la Bretagne.

Afin de cerner le devenir des bactéries rejetées par une station d'épuration en amont de l'estuaire, un ensemble de modèles hydro-sédimentaires permettant de simuler le transport d'éléments dissous, des sédiments fins et des contaminants adsorbés a été développé. Ces modèles ont été intégrés pour constituer la base d'un logiciel de modélisation de la qualité de l'eau.

Parallèlement, des travaux bactériologiques ont été réalisés pour estimer :

- la contamination de la zone dans différentes conditions hydrodynamiques ;
- les temps de mortalité dans l'eau et dans les sédiments ;
- le flux de bactéries fécales rejetées par les sources principales (rivière et station d'épuration) en distinguant les formes libres et liées, dont les comportements sont respectivement comparables à ceux d'éléments dissous ou particulaires.

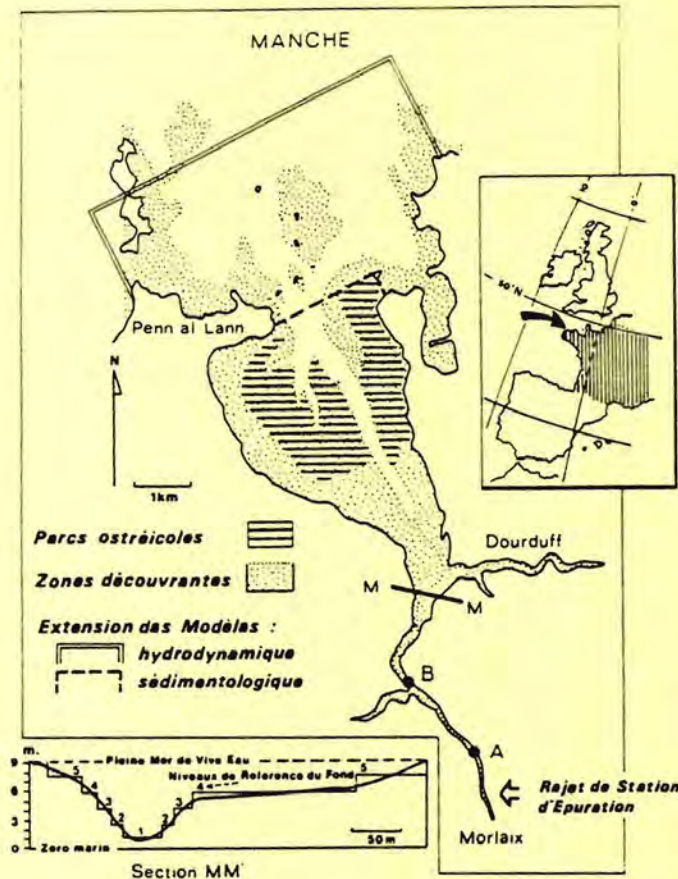
Ces flux, ainsi que les temps de mortalité des bactéries, ont été introduits dans le modèle d'advection/dispersion pour réaliser des calculs de concentrations bactériennes que l'on a comparées aux concentrations mesurées dans l'estuaire.

(\*) IFREMER, Centre de Brest, B.P. 70, 29280 Plouzané.

(\*\*) UER des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, avenue du Professeur L.-Bernard, 35043 Rennes Cedex.

### Modelling dissolved and particulate contaminants transport in the Morlaix estuary. Application to enteric bacteria discharge.

*Dissolved contaminants and cohesive sediment transport models have been developed and applied to a macrotidal estuary. These models are original as several dissolved and particulate constituents can be simultaneously computed, the later being followed in the surficial sediment according to the deposition events. Besides laboratory and field experiments have been conducted in order to evaluate the survival of enteric bacteria both within the sediment and the water body. Showing off rather long survival times especially in the sediment, the results have been introduced in the models in order to simulate the impact of urban disposal on water quality in a shellfishing area.*



1. Présentation du secteur d'étude : l'estuaire et la baie de Morlaix.

## 2. Présentation de la zone d'étude

D'un point de vue morphologique l'estuaire de Morlaix comprend deux parties (figure 1) :

— une section amont longue de 5,5 km, composée de deux bras, l'un menant au déversoir d'un bassin de plaisance situé au cœur de la ville de Morlaix, l'autre constitué par la rivière du Dourduff. Ces estuaires sont peu profonds et marqués par des chenaux étroits bordés de larges vasières découvrantes, de telle sorte que leur largeur moyenne décroît d'un facteur 10 entre Pleine et Basse Mer (de 100 à 10 m en amont). Les apports fluviaux sont faibles ( $20 \text{ m}^3/\text{s}$  en crue) ;

— l'estuaire extérieur, ou baie, long de 5 km et large de 3,5 km, en communication avec la Manche par un étroit goulet. L'estran y est très vaste et largement exploité pour la conchyliculture.

L'amplitude de la marée incidente atteint 9,5 m en vive eau. Compte tenu du caractère fermé de la baie et de la présence de nombreux îlots vers le large, la houle n'y pénètre que très peu : seul un clapot de faible amplitude et de très courte période peut se manifester dans la baie.

## 3. Calcul hydrodynamique

### 3.1. Description des modèles

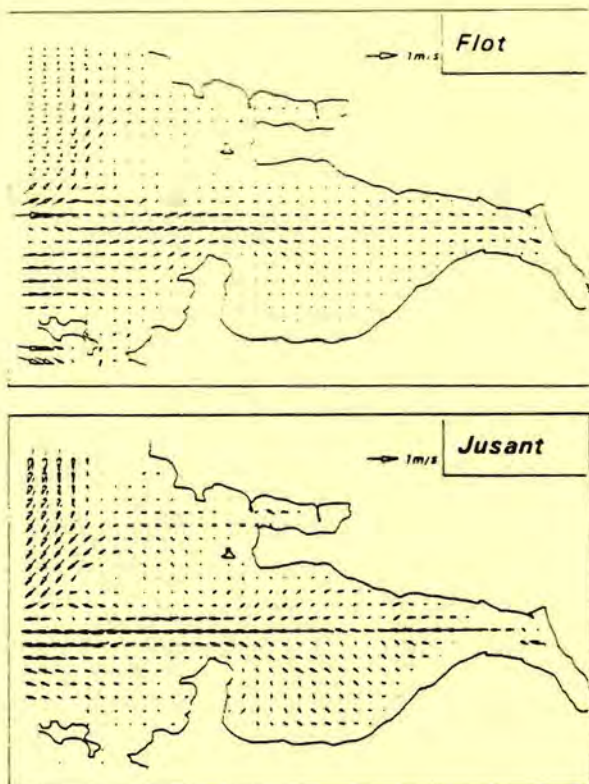
La marée étant le principal facteur de circulation, un calcul de courant barotrope a été mené en résolvant les équations du mouvement intégrées selon la verticale. Deux modèles ont été réalisés (SALOMON et POMMEPUY, 1990). L'un bidimensionnel en plan horizontal (2DH) couvrant la baie et un secteur aval ouvert de façon à calculer les échanges dans le goulet de Penn Al Lann : l'autre est unidimensionnel (1DH) et comprend deux branches : les estuaires du Dourduff et de Morlaix. Le modèle 2DH prend en compte les zones découvrantes par glissement automatique des frontières terrestres au cours des calculs. Le modèle 1DH décrit l'écoulement moyen en chaque section des estuaires et respecte la variabilité effective des sections mouillées et rayons hydrauliques en fonction du niveau de la surface libre. En outre, une distinction est faite entre les sections actives qui participent à l'écoulement et les sections passives qui n'interviennent que dans la conservation de la masse d'eau (stockage de l'eau sur les rives latérales lorsqu'elles sont inondées).

Les systèmes d'équations sont résolus en différences finies. La maille de calcul a une dimension de 250 m et les conditions aux limites sont les débits fluviaux en amont et la hauteur d'eau le long de la frontière maritime à l'aval. Par ailleurs les modèles 2DH et 1DH sont couplés par l'information « cote de la surface libre » grâce au chevauchement de leurs grilles de calcul.

### 3.2. Principaux résultats

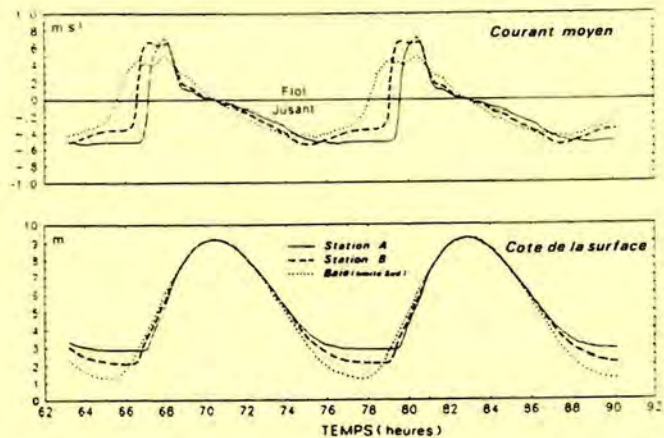
En raison des incertitudes sur les conditions à la limite aval, seuls les résultats obtenus au sud de Penn Al Lann sont considérés. La figure 2 qui présente des champs de courant en flot et en jusant met en évidence le rôle prééminent du chenal axial dans les transferts de masse d'eau. On peut noter que les courants convergent vers ce chenal en jusant et divergent en flot : les gradients qui en résultent favorisent la dispersion des éléments dissous. Les vitesses atteignent 1 nœud en flot et 0,9 nœud en jusant, conduisant à des excursions de marée de même échelle que la baie. Sur les banquettes latérales les vitesses sont environ deux fois plus faibles, mais présentent une dissymétrie flot/jusant inverse de celle du chenal. Ainsi ce dernier apparaît à dominante de flot tandis que les bords ont une résiduelle de jusant : ce phénomène bien connu est lié à l'énergie cinétique acquise par la masse d'eau entrant dans le goulet de Penn Al Lann (SALOMON et POMMEPUY, 1990).

Plus en amont l'assymétrie flot/jusant s'accroît en raison de la déformation de l'onde marée lorsqu'elle se propage par de très faibles profondeurs. Ainsi la figure 3 met en évidence le retard de la marée en amont de l'estuaire au moment de la Basse Mer. En outre on observe dans ce secteur que toute la fin du jusant est marquée par un écoulement fluvial, le niveau de basse mer étant nettement plus bas que la cote du chenal.



2. Champs de courants calculés dans la baie de Morlaix en vive eau.

3. Propagation de la marée et évolution du courant dans l'estuaire amont de Morlaix.



#### 4. Modèle de transport de sédiment cohésif

##### 4.1. Description du modèle

Le modèle de transport sédimentaire repose sur la conservation de la masse de sédiment, à la fois dans la colonne d'eau sous forme de matière en suspension (M.E.S.) et dans les sédiments superficiels (LE HIR *et al.*, 1989a). Ainsi dans l'eau on résout une équation d'advection/dispersion analogue à l'équation de transport d'un élément dissous, avec en plus des termes de dépôts (D) et d'érosion (E). Cette équation est intégrée selon la verticale et est résolue sur le même maillage que le modèle hydrodynamique (1DH ou 2DH).

Le taux de dépôt est représenté par l'expression de KRONE,  $D = W_s.C_f.(1-\tau/\tau_D)$ , où  $W_s$  est la vitesse de chute et  $C_f$  la concentration près du fond, déduite de la concentration moyenne à l'aide d'une fonction de forme. Le taux d'érosion est donné par la formule de PARTHENIADES,  $E = M.(\tau/\tau_E - 1)$ .  $M$  est un coefficient.

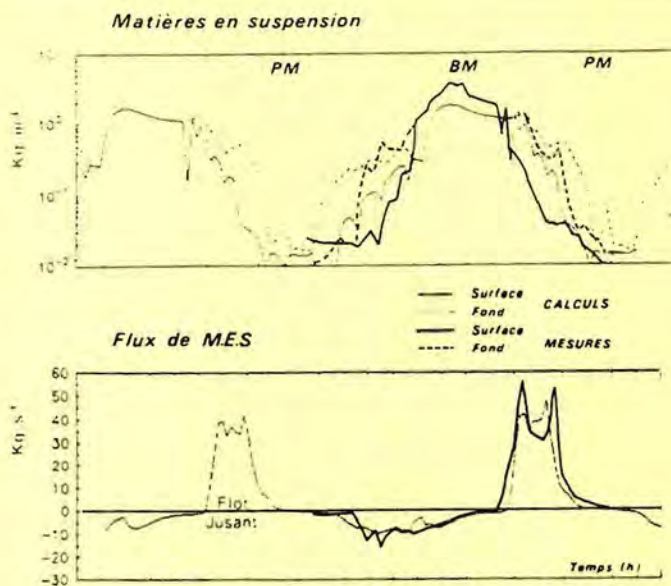
$\tau$  est la tension de frottement sur le fond. Elle est déduite du courant moyen en faisant l'hypothèse d'un profil vertical logarithmique des vitesses. Mais dans le modèle 1DH, pour rendre compte de la disparité des échanges avec le sédiment au sein d'une même section transversale, en particulier en présence de larges estrans, des valeurs locales de  $\tau$ , correspondant à différentes positions du sédiment par

rapport à la surface, ont été calculées en supposant une proportionnalité entre  $\tau$  et la hauteur d'eau locale.

$\tau_D$  et  $\tau_E$  sont respectivement les tensions critiques de dépôt et d'érosion. La première est reliée à la concentration en M.E.S. pour tenir compte des phénomènes de floculation tandis que la seconde dépend des propriétés rhéologiques du sédiment superficiel. Selon de nombreux auteurs (MIGNIOT, OWEN, THORN et PARSONS, HAYTER *in* MEHTA, 1984) on peut écrire  $\tau_E = \alpha C_{sol}^\beta$  où  $C_{sol}$  est la concentration du sédiment. Pour cette raison le calcul des M.E.S. est couplé au modèle de sol dont l'algorithme de tassement permet d'évaluer  $C_{sol}$ .

Ce modèle de sol gère un certain nombre de couches dont seule la masse par unité de surface est fixée. Le tassement est pris en compte sous la forme d'une équation différentielle relative à la concentration en sédiment sec : l'intérêt de la méthode est qu'à l'inverse de la plupart des autres modèles de consolidation, elle ne nécessite pas l'ajustement de profils types de concentration (LE HIR *et al.*, 1989b).

La discrétisation du fond sédimentaire est tridimensionnelle, même dans les estuaires où l'on a considéré plusieurs banquettes de vases, caractérisée chacune par une cote moyenne, comme le montre la section  $MM'$  de la figure 1. Pour chacun de ces niveaux de vase, une hauteur d'eau et un frottement local sont estimés et les échanges avec la masse d'eau sont calculés.



4. Evolution en vive eau des matières en suspension et de leurs flux, simulés ou mesurés à la station B.

#### 4.2. Exemples de résultats

La figure 4 montre l'évolution des concentrations et flux de M.E.S. au point B pendant 2 marées de vive eau, en période d'étiage. La simulation a commencé 14 jours auparavant de telle sorte qu'un cycle complet Vive Eau/Morte Eau s'est déroulé depuis les conditions initiales. On note un bon accord entre les mesures et les calculs malgré une gamme de variation très large.

Les maxima de concentration obtenus à partir de la Pleine Mer sont successivement l'érosion locale, le passage en fin de jusant des matières érodées en amont, le retour de ce dernier maximum juste après la renverse de flot et enfin l'érosion locale en flot. L'importance du maximum de basse mer est liée aux très faibles sections d'écoulement à ce moment, ainsi qu'à une érosion amont par écroulement des banquettes de vase vers le chenal. Ce phénomène observé en nature (L'YAVANC et BASSOULLET, 1990) a été introduit de manière empirique dans le modèle.

La représentation des flux tempère l'importance relative de ces maxima (en particulier à basse mer où les sections sont très faibles) et laisse apparaître un flux résiduel de flot. Ainsi l'estuaire amont s'envase pendant l'étiage et il faut attendre un régime de crue pour inverser la tendance (L'YAVANC et BASSOULLET, 1990). Ce flux résiduel de flot se justifie moins par l'asymétrie du courant flot/jusant que par les écarts de durée des renverses de Pleine et Basse Mer (figure 3) et finalement la forte probabilité de dépôt des matériaux à PM sur les banquettes de vase supérieures : celles-ci étant déjà émergées lorsqu'apparaît un fort courant de jusant, les matériaux fraîchement déposés ne peuvent être remis en suspension.

Les applications du modèle de transport en suspension sont nombreuses, en particulier en terme de bilan sédimentaire. Mais ici on s'intéresse au transport de sédiment comme vecteur potentiel de contaminant.

## 5. Un logiciel de transport de contaminants dissous et particulaires

Les différents modèles que nous venons de présenter ont été couplés et intégrés dans un même logiciel de simulation du devenir de plusieurs contaminants, avec interactions éventuelles.

Dans l'eau, le code numérique résout simultanément l'équation de transport de plusieurs « variables d'état ». Celles-ci peuvent être des contaminants dissous ou particulaires, parfois présents sous les deux formes : généralement l'une des variables est la concentration totale de M.E.S. qui n'est donc pas considérée à part. Quand il y a interaction entre deux variables, elle est introduite dans les équations de conservation de masse sous forme différentielle : ainsi même lorsque l'adsorption/désorption d'un contaminant suit une loi de partage, une loi du premier ordre avec une cinétique quasi infinie est introduite pour chacune des formes de ce contaminant. Ces interactions sont généralement traitées de manière explicite, ce qui peut induire quelques contraintes sur le pas de temps lors de la résolution numérique.

Dans le sédiment, la consolidation n'est exprimée que pour une seule variable : la concentration du sédiment. Les autres variables (particulaires) sont représentées par leurs masses totales dans chaque couche : ainsi le modèle mémorise la part des contaminants contenue dans le sédiment et rend compte de leurs dépôts ou remise en suspension éventuels (LE HIR *et al.*, 1989c).

Naturellement les processus de dégradation ou croissance de chaque variable peuvent être introduits dans l'eau ou le sédiment.

## 6. Application du logiciel au devenir des bactéries

### 6.1. Etude des temps de mortalité des bactéries

Selon l'heure de la marée, l'effluent à son arrivée en estuaire rejette directement des bactéries, soit dans l'eau où elles se dispersent, soit à basse mer sur le sédiment qui se trouve ainsi directement contaminé.

Afin d'évaluer la mortalité des bactéries fécales dans les deux types d'environnement, des études ont été réalisées sur le sédiment (*in vitro*) et dans l'eau (*in situ*) à l'aide d'une même souche de *Escherichia coli*. Cette souche, représentative des coliformes fécaux, est classiquement utilisée dans les études de mortalité.

*Etude de la mortalité dans le sédiment* (LE GUYADER, 1989) : Les travaux ont été réalisés en laboratoire dans un pilote maintenu à température constante. Les prélèvements de sédiment ont été effectués de manière à en conserver la structure, et la mise en œuvre des expérimentations a eu lieu dans les heures qui suivaient le prélèvement.

Les observations montrent que même en l'absence d'agitation, les échanges entre l'eau et le sédiment sont immédiats. Après deux jours de contact, le système atteint un état d'équilibre avec :

- une survie importante de la souche dans le sédiment ;
- une diminution de la population dans l'eau.

En fin d'expérimentation, les concentrations observées dans le sédiment sont environ 100 fois plus élevées que celles de l'eau. Ainsi les taux de mortalité, caractérisés par les T90 (temps nécessaires pour que 90 % des bactéries meurent), sont très longs dans le sédiment : 14 jours en moyenne avec une valeur maximale de 40 jours.

*Etudes de la mortalité dans l'eau* (SALOMON et POMMEPUY, 1990) : Ces études ont été réalisées dans l'estuaire à l'aide de chambres à diffusion immergées à 30 cm sous la surface. Les expérimentations ont été faites à deux endroits différents, l'un en eau marine, l'autre en eau estuarienne turbide, en été et en hiver.

La figure 5 présente quelques exemples de résultats ainsi obtenus. Les T90 trouvés se répartissent de la façon suivante :

- en aval, en eau de mer, ils varient de 2 heures (avec un bon éclairage en surface) à 2 jours (en surface par temps couvert, ou en profondeur). Les résultats de T90 égaux à quelques heures sont en accord avec ceux précédemment trouvés dans la littérature et qui correspondaient à des travaux réalisés en eau de mer dans des conditions d'éclairage optimales ;

- en amont, dans les eaux turbides, les T90 sont généralement très longs : 6 à 9 jours. Ces valeurs sont dues aux conditions environnementales ; en effet dans les eaux turbides les matières organiques sont riches en éléments favorables à la survie des bactéries fécales (nutrients, osmo-protecteurs). D'autre part la turbidité diminue la pénétration de la lumière qui a un effet bactéricide certain. Ces deux facteurs se surajoutent pour créer des conditions favorables à la survie des bactéries en milieu estuarien.

## 6.2. Simulation du rejet bactérien

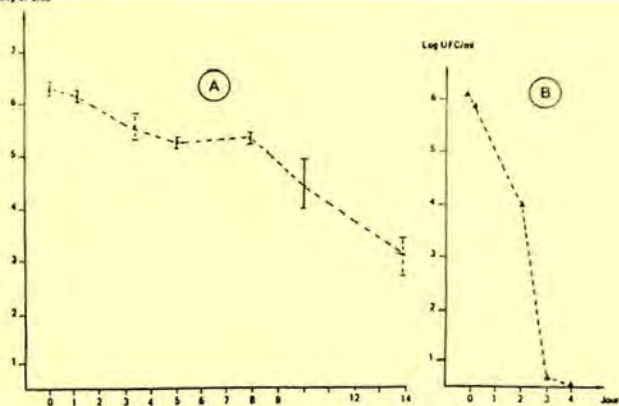
Le logiciel de transport multivariable a été appliqué au calcul de la distribution des bactéries fécales issues du rejet de la station d'épuration de Morlaix, situé en amont de l'estuaire. La simulation a été réalisée dans les conditions suivantes :

- rejet à flux constant, conforme aux mesures, avec 50 % de bactéries libres (assimilables à un élément dissous) et 50 % de bactéries liées (au comportement analogue à celui des suspensions) ;
- simulation de deux cycles complets vive eau/morte eau, pour un débit fluvial moyen ( $2 \text{ m}^3/\text{s}$ ).

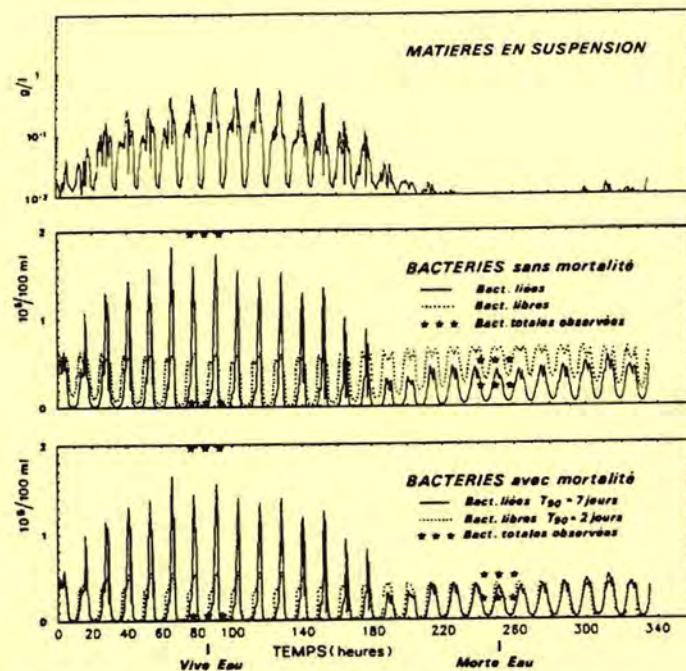
Deux cas ont été considérés : un comportement conservatif des bactéries (sans croissance ni mortalité) et une dégradation par mortalité estimée d'après les résultats des travaux cités en 6.1 à savoir : un T90 de 2 jours pour les bactéries libres, un T90 de 7 jours pour les bactéries liées en suspension et une survie infinie pour les bactéries liées lorsqu'elles sont dans le sédiment.

Les résultats sont présentés au point fixe B (fig. 6) :

- cas 1, absence de mortalité : les bactéries libres varient dans une même gamme en vive eau et en morte eau avec



5. Exemples d'évolutions bactériennes (*E. coli* H 10407) mesurées dans des chambres à diffusion.  
a. Mesure en zone turbide (confluent du Dourduff).  
b. Mesure au « large » (limite nord de la baie).



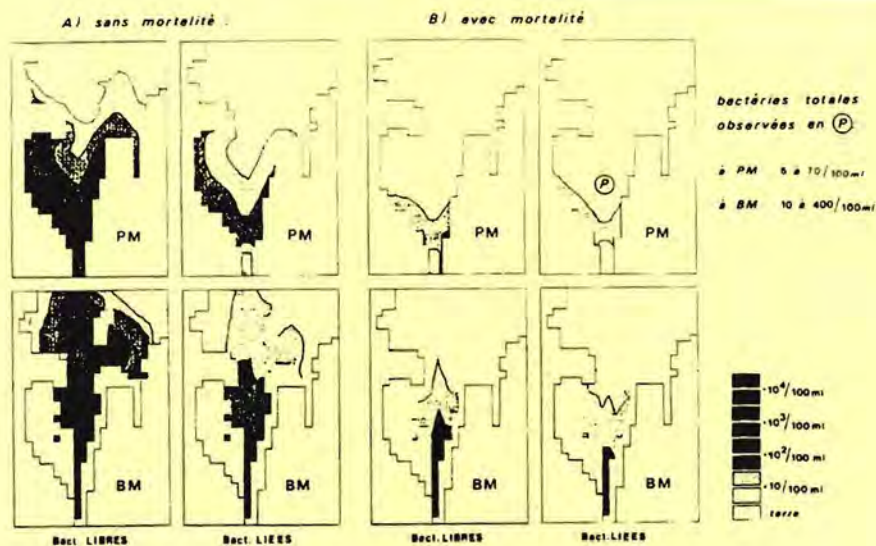
6. Simulation des rejets de bactéries dans l'estuaire de Morlaix. Evolution à la station B.

une moyenne supérieure en morte eau compte tenu du temps de séjour plus long en cette période. Au contraire les bactéries liées présentent des variations nettement supérieures en vive eau avec des maxima à basse mer, provenant de l'érosion des matériaux dans un secteur amont proche du rejet ;

- cas 2, prise en compte des mortalités : l'effet est nettement plus sensible sur les bactéries libres pour lesquelles le T90 est relativement court. Ainsi on note qu'en morte eau les bactéries libres et liées seraient en nombre équivalent avec des variations analogues tandis qu'en vive eau l'effet des remises en suspension pendant le jusant reste très sensible.

Ces résultats supportent remarquablement la comparaison avec les observations *in situ* de bactéries « totales » (les bactéries libres et liées n'étant pas différenciées dans les comptages). Naturellement des processus d'adsorption/désorption sont susceptibles de modifier la réparti-





7. Simulation des rejets de bactéries dans l'estuaire de Morlaix. Distributions dans la baie au cours d'une marée de vive eau.

tion de ces bactéries libres et liées : faute de mesure les concernant, ils n'ont pas été introduits dans le modèle.

La figure 7 présente les répartitions de bactéries libres et liées plus en aval dans la baie de Morlaix, à pleine mer (PM) et basse mer (BM) d'une marée de vive eau. On peut remarquer qu'en l'absence de mortalité (fig. 7a) les bactéries libres sont nettement plus nombreuses que les liées, en raison d'un très faible taux de MES. Cependant lorsque les T90 sont introduits (fig. 7b) les différences sont réduites, compte tenu de la survie accrue des bactéries liées, en particulier lorsqu'elles sont déposées. Les concentrations bactériennes ainsi obtenues par simulation sont du même ordre de grandeur que les mesures, mais la mortalité semble un peu excessive. Il ne s'agit encore que d'une simulation schématique, des améliorations pouvant être attendues grâce à l'introduction d'une mortalité dépendante de la turbidité (donc fonction des MES) et de l'éclairement (reproduction du cycle nyctéméral).

## Conclusion

Le logiciel de transport des contaminants dissous et/ou particuliers que nous avons présenté résulte de l'intégration de plusieurs modèles physiques ou sédimentologiques. Par introduction aisée de lois de comportement non conservatif et d'interactions entre variables, il constitue la base d'un outil de simulation des problèmes de qualité d'eau. En outre chaque composante de ce logiciel peut évoluer au gré de l'état de l'art et en fonction des questions posées. Ainsi le calcul hydrodynamique et la résolution de l'équation de transport pourront à court terme être menés dans les trois dimensions spatiales. De même les processus sédimentaires pourront être affinés, en particulier les lois de tassement des vases. Il faut d'ailleurs rappeler que ces processus sont mal connus et qu'un important travail de réglage du modèle sédimentaire, s'appuyant sur de nombreuses mesures *in situ* et en laboratoire reste néces

saire. Ceci étant, une fois le modèle sédimentaire calibré, il devient opérationnel pour traiter le devenir des contaminants particuliers, comme l'a montré l'application au devenir des bactéries en baie de Morlaix.

*Remerciements* : Les auteurs tiennent à remercier E. Dupray, P. Bassoullet, J. L'YAVANC, A. Derrien, M. Breton, D. Guillerme et J.P. Annezo pour leurs contributions à ce travail.

## Références bibliographiques

- LE GUYADER F., 1989. *Colonisation bactérienne et implantation de E. coli dans le sédiment d'origine littorale*. Thèse de Doctorat, Université de Rennes I, UER Médicales et Pharmaceutiques.
- LE HIR P., BASSOULLET P., L'YAVANC J., 1989a. « Modelling mud transport in a macrotidal estuary » in « *Advances in Water Modelling and Measurement* », Ed. PALMER, Pub. BHRA, The Fluid Engineering Centre, Bedford, U.K.
- LE HIR P., BASSOULLET P., L'YAVANC J., 1989b. « New-developments about mud transport models : application to a macrotidal estuary ». Compte rendu de l'*International Symposium on Sediment Transport Modeling*. New Orleans, Aug. 14-18, 1989. Ed. Sam S.Y. WANG. Publication de l'ASCE.
- LE HIR P., GUILLAUD J.F., SALOMON J.C., 1989c. « Applications of a cohesive sediment model to dissolved and particulate contaminants transport ». Compte rendu du 23<sup>e</sup> congrès de l'*AIRH*, Ottawa, 21-25 août 1989.
- L'YAVANC J., BASSOULLET P., 1990. « Nouvelle approche dans l'étude de la dynamique sédimentaire des estuaires macrotidaux à faible débit fluvial ». *Colloque international « Environnement des mers épicontinentales »*. Lille, mars 1990. A paraître dans *Oceanologica Acta*.
- MEHTA A.J., 1984. Editeur de « *Estuarine Cohesive Sediment Dynamics* ». Springer Verlag, 14, 1984.
- SALOMON J.C., POMMEPUY M., 1990. « Mathematical model of bacterial contamination of the estuary of Morlaix (France) ». Pour publication dans *Water Research*.

**IX - Article 6 :**  
**A mathematical model for enteric  
bacteria in coastal areas.**

## A mathematical model for enteric bacteria in coastal areas

M. Pommepuy & J.C. Salomon  
IFREMER, Centre de Brest, Plouzané, France

**ABSTRACT :** To protect shellfishing areas from enteric bacterial pollution, comprehensive and predictive tools need to be developed. Mathematical models of bacterial contamination are built : they are based on the knowledge of bacterial mortality and on advection–dispersion laws.

Die-off rates of *Escherichia coli* were measured *in situ* ; they are in a range from 0,5 to 0,6  $10^{-3}h^{-1}$ . The high survival times are found mainly because light penetration is dampened by suspended matter.

Bacterial decay inserted in the model allows to compare the role of die-off rate versus dilution. At first physical mechanisms are more efficient than mortality ; subsequently bacterial die-off rate play an important role on water decontamination.

### INTRODUCTION

The use of models is helpful to describe bacterial contamination in coastal areas. In organizing large quantities of bacterial data, it is possible to obtain realistic tools. These model combine experimental works on bacterial survival dynamic and mathematical equations of dispersion. The result is a bacterial dispersion model able to predict the behaviour of enteric or pathogenic bacteria discharge from sewage treatment plants (STP) or rivers.

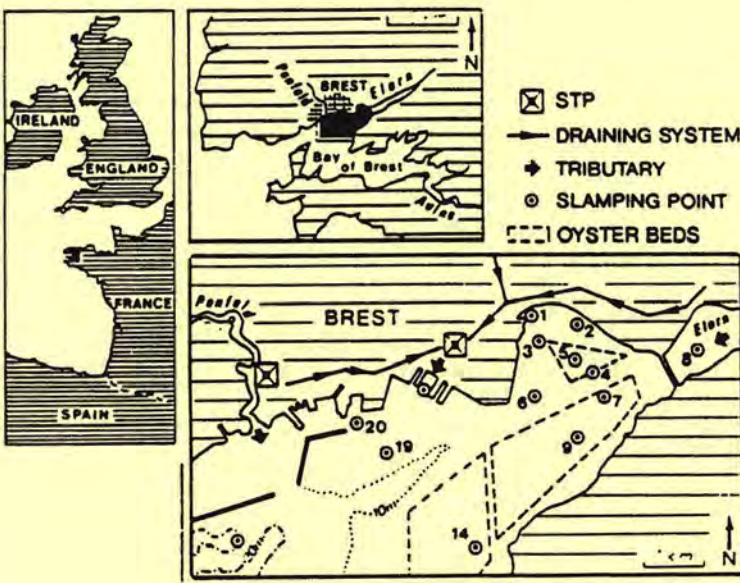


Fig. 1 Map of the Bay of Brest.

Precedent study [1] shows that in high hydrodynamic areas, physical factors as dispersion play an important role to reduce contamination ; contrario in Lagoon or stagnant coastal areas, biological die-off – due to stress by salinity, temperature, lack of nutrients... – could play a major part in bacterial decrease in seawater.

The aim of this study is to know the answer of the Baie of Brest to bacterial input and to precise the main factor (physical or biological) responsible of the behaviour of fecal contamination of the waters.

## MATERIALS AND METHODS

The bay of Brest is located on the north west coast of France (fig. 1). It is approximately 11 km wide and 27 km long [2]. There are three main tributaries : the Aulne River in the southern, the Elorn River in the northeastern and the Penfeld river in the north part of the bay - the mean annual flows are respectively  $24 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  ;  $5,65 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$  ;  $0,60 \text{ m}^3\text{s}^{-1}$ . The total area of the bay at high tide is approximately  $180 \text{ km}^2$  and the total Drainage basin has an extend of  $2\,655 \text{ km}^2$ . Average depth is 15 m with a maximum depth increasing to 40 m at the mouth. The tides are semi-diurnal with a 12 h 25 min period and amplitude which vary from 3 m during neap tide to 7 m during spring tides. Suspended matter measured in the bay are in a range from 0,5 NTU (in the west open sea) to several units NTU in the eastern part, due to river discharge.

The main fecal inputs are the sewage from the urban area of Brest and the rivers. In the north of the bay, bacterial fluxes coming from STP (physical Treatment) and the Penfeld river are estimated in a range from  $8 \cdot 10^{10}$  fecal coliforms  $\text{FC s}^{-1}$  to  $5 \cdot 10^{11}$   $\text{FC s}^{-1}$ . There are the most important sources of contamination while the Aulne River carries  $1,5 \cdot 10^8$   $\text{FC s}^{-1}$  and Elorn River about  $5 \cdot 10^7$   $\text{FC s}^{-1}$ .

### 1) Hydrodynamical model

The mathematical model for currentology and dispersion solves the classical hydrodynamical equations in two dimensions [3].

The dispersion coefficient has been evaluated both from *in situ* dye dispersion measurements and from theoretical considerations on the mesh size. It has been evaluated as  $4 \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ .

The mathematical system is solved in finite differences by an A.D.I. method wich takes into account the shoaling of lateral zones and river fluxes [4] and [1]. The grid size is 330 m and the dimensions of the resulting matrix  $127 \times 52$ .

Simulation results for currentology and dispersion are presented in [3].

### 2) Bacterial studies

#### Sampling trips

General surveys to assess the distribution, abundance and inflow of fecal coliforms in the bay and in the tributaries were carried out during different hydrodynamical conditions and seasons :

During neap tides (23-25 june 1980, 1-12 december 1980 and 26-28 fev. 1981).

During spring tides (11-13 june 1980, 20-22 november 1980 and 7-9 march 1981).

Sampling points are shown in fig. 1.

Waters were also sampled in STP and rivers in order to evaluate the fluxes. Aulne contribution was estimated from classical contamination levels of a river with an active agriculture basin ( $5 \cdot 10^3$  CF  $100 \text{ ml}^{-1}$ ).

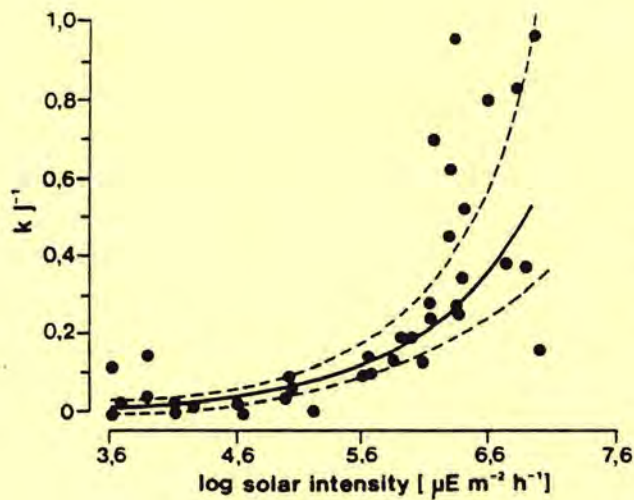


Fig. 2 Relationship between the die-off rate and the solar intensity received by *E. coli* (in Salomon et Pompepuy, 1991) [7]

Waters samples were collected in sterile bottles which were all refrigerated immediately. Incubation began 4–6 hours after the collection ; Fecal Coliforms were enumerated using standard methods : by incorporation of 1 ml of sample or dilution in Desoxycholate agar (oxid). After 24 hours incubation at 44 °C, *Enterobacteria* colonies (red colonies) were quantified. The results are expressed in CFU 100 ml<sup>-1</sup>.

### 3) Bacterial model

The behaviour of fecal bacteria depends on several factors such as temperature, PH, nutrient supply, salinity and solar intensity. From previous studies [5] it appears that solar radiations play an important role on bacterial mortality. Because of suspended mater, in Bays or estuaries the light penetration is stopped and die off rate ( $K$ ) is able to vary in a range from 0,05 j<sup>-1</sup> to 0,9 j<sup>-1</sup> to several days (fig. 2). Survival trials carried out in different turbidity and depth suggest the possibility to predict the approximate value of  $K$ , i.e. T90, in fonction of these main parameters (fig. 3). In present study various T90 were tested in the mathematical model to confirm these results (T90 time needed for 90 % of bacteria to die).

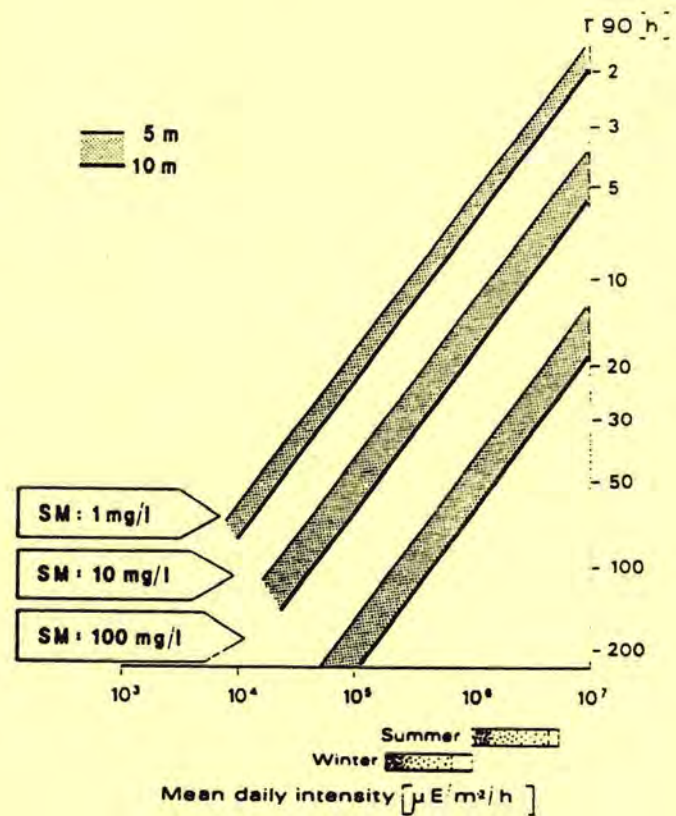


Fig. 3 Relations between depth, turbidity, sunlight intensity and T90 (in Pompepuy *et al.*, 1990).

## RESULTS

The model has been run for various external conditions (tides, solar radiation, discharged fluxes) and tuned by comparison of computed and measured concentrations in various points of the bay. Fig. 4 presents the comparison of computed values with observed ones during Feb.-March 1981.  $C_0$  is the initial concentration ( $10^7$  CF/100 ml) from raw discharge most probably due to by-pass of STP.

The points near the mouth of the bay show a decrease of concentration about 3 log. lower than  $C_0$  but computed values in the case of  $T_{90} = 10$  days, are 4 times higher than observed values. Different die-off rates were tested in order to make the simulation closer to observation. In winter,  $T_{90}$  equal to 24 hours gives the best result while 10 hours were found in summer. These results are similar to those found in previous studies [1].  $T_{90}$  in the same order of magnitude were calculated by using statistical approach [7].

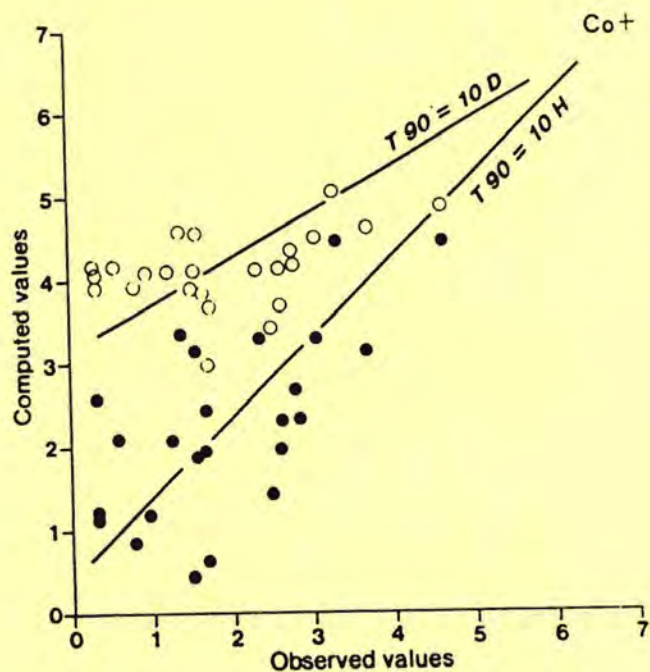


Fig. 4 Computed vs measured bacterial concentrations (expressed in  $\log_{10}$  bacteria/100 ml).  $C_0$  initial value. Bay of Brest - June 1981.

Another important possibility of model is to describe the concentrations all over the bay in different situations, on fig. 5 the spatial map shows that the main impact of STP is located in the north of the bay while concentrations decrease very fast in the mouth and in the Aulne estuary (from which contribution to pollution of the bay is very low).

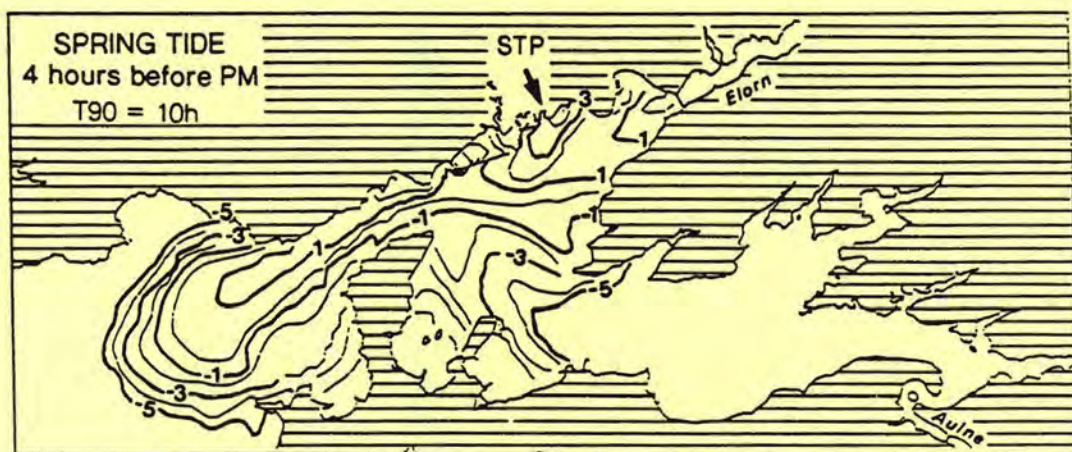


Fig. 5 Impact of STP on fecal contamination of the Bay of Brest. ( $\log_{10}$  Fecal coliforms/100 ml)

To go more deeply into the information contained in these simulations, we calculated the relative efficiency of bacterial mortality and physical dilution (Ef), and the transit time from the point of discharge ( $\tau$ ).

Ef is defined as the ratio of physical dilution (phy) versus biological decay (biol)

$$EF(x) = \text{phy}(x)/\text{biol}(x) = C_0 \cdot C(x)/C'(x)^2$$

where  $C_0$  = initial value in the effluent  
 $C(x)$  = real bacterial concentration  
 $C'(x)$  = local bacterial concentration without mortality

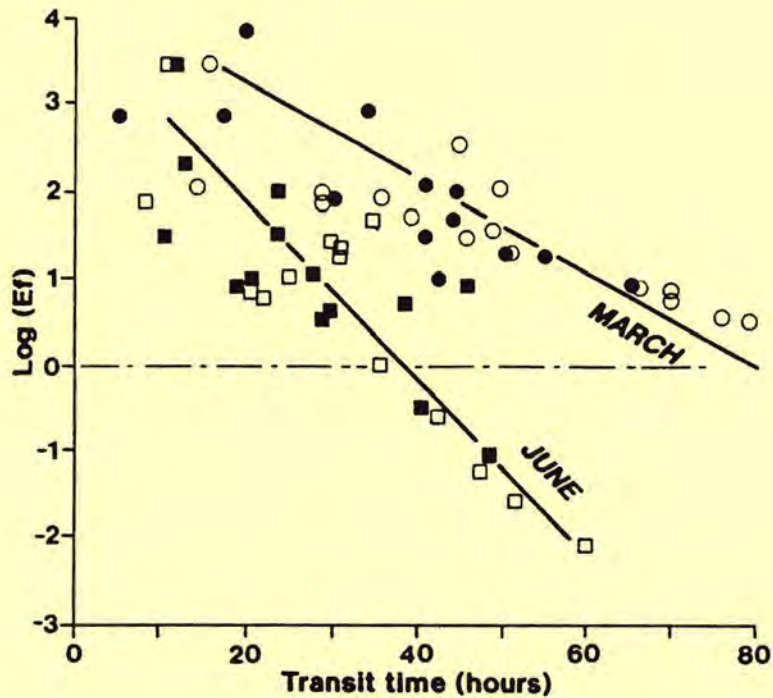


Fig. 6 Relative efficiency of physical/bacterial decay and transit time.

The transit time  $\tau$  is a function of advection and dispersion. It may be evaluated through a comparison of computed concentrations resulting from an hypothesis of no bacterial mortality and another simulation including mortality. According to the linear decay process, after an elapsed time  $t$ , bacterial concentration  $C$  can be written as :

$$C = C' 10^{\frac{-t}{T90}}$$

From this formula, the expression of  $\tau$  is obtained :

$$t = \tau = T90 (\log C - \log C')$$

The relation between Ef and  $\tau$  is presented on fig 6 for winter and summer conditions.

It shows that :

- In the outfall vicinity, where transit times are less than one day, the physical dilution is more efficient than the mortality, this being all the more pronounced since we consider points closer to the source, and bad weather conditions.

- At some distance from the outfall, the situation changes, biological mortality becomes greater than dilution.

- All physical mechanisms remaining constant, the lower  $E_f$  values in summer mean that biological mortality is about 10 to 100 times higher at that moment than in winter. This shifts the moment where biological and physical factors are equivalent from 40 hours in summer to 80 hours in winter.

More generally it quantifies the fact that for the case of the bay of Brest, as probably for many other nearly closed areas, the rate of contamination near the source is essentially dependant on the local dispersive mechanisms (not on mortality) and the contrary at some distance, where mortality is the main cause of low contamination (not the dilution).

## CONCLUSION

The performance of the model is to provide much information which is impossible to determine by measurement : synoptic views, impact of contamination in different conditions : spring or neap tides, various fluvial inputs... Another result concerns the importance of transit time on contamination by non conservative pollutant : model shows that more the transit time increases i.e. distance from sewage outfall increases, less physical effect is efficient to reduce contamination level. This is due to the fact that the bay of Brest is a closed area where the dispersive capacity is limited [3]. In this case, the decontamination by mortality of enteric bacteria can play an important role, especially faraways the outfalls, to reduce water pollution.

ACKNOWLEDGEMENTS : We thank M. Breton and A. Derrien for their cooperation and technical assistance.

## REFERENCES:

- [1] Salomon, J.C. and Pommepuy, M. (1990). *Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary (France)*. Water Research, Vol. 24, n° 8, 983-994.
- [2] Monbet, Y. (1991). *Nutrients loadings and phytoplankton Productivity in the Bay of Brest (France)*. Estuaries (sous presse).
- [3] Salomon, J.C. and Breton, M. (1991). *Numerical study of the dispersive capacity of the Bay of Brest (France) towards dissolved substances*. (Same volume).
- [4] Salomon, J.C. and Breton, M. (1990). *Etude par modèle mathématique de la dispersion de rejets dissous en rade de Brest*. IFREMER technical report, DRO/EL, 90-22, 200 p.
- [5] Chamberlin, C. and Mitchell, R. (1978). *A decay model for enteric bacteria in natural waters*. Water pollution microbiology. Ralf Mitchell Editor. Vol. 2, 325-348.
- [6] Pommepuy, M., Guillaud, J.F., Martin, Y., Dupray, E., Derrien, A., L'yavanc, J. et Cormier, M. (1990). *Le devenir des bactéries en zone littorale*. La Mer et les Rejets Urbains. Bandor, 13-15 juin 1990. IFREMER, Actes de Colloques 11, 89-100.
- [7] Le Hir, P., Chardy P., Breton, M., Thouvenin, B., Salomon, J.C. (1984). *Calcul simplifié de la dispersion des rejets en mer à marée et application au devenir des bactéries*. Soc. Hy. de Fr. XVIII Journées hydraulique de France 11, 12, 13 sept. 1984. IV.81-IV.88.
- [8] Salomon, J.C. et Pommepuy, M. (1991). *Modèle mathématique de dispersion/décroissance des bactéries rejetées dans l'estuaire de Morlaix*. Oceanologica Acta (sous presse).



## X - CONCLUSION

Le devenir des bactéries rejetées par les rivières et les stations d'épurations est dépendant d'un ensemble de facteurs tels que **l'association bactéries-particules** au moment du rejet et les conditions du milieu récepteur.

Le type de traitement des eaux appliqué dans une station d'épuration détermine la qualité de l'apport bactérien. En rade de Brest, par exemple, le rejet de la station d'épuration de la ville de Brest libère des floccs organiques dans lesquels les bactéries sont protégées. Dans ces agrégats, le polymorphisme observé reflète la grande variété des espèces bactériennes issues des stations de type "boues activées". A Morlaix et à Toulon, les bactéries associées à du matériel particulaire ne représentent que 25 % environ des bactéries dans les rejets (Dupray *et al.*, 1991). Les dysfonctionnements des stations ainsi que les variations de charge peuvent diminuer le pourcentage de bactéries libres (Bitton, 1994).

**A leur arrivée en mer**, des floculations se produisent à faible salinité (< 5 ‰). Le devenir des bactéries va dépendre alors de leur association au matériel particulaire : adsorbées à des particules minérales, elles vont décanter très rapidement, si, par contre, elles sont agglomérées dans des floccs organiques, leur temps de séjour dans la colonne d'eau sera plus long, quand aux bactéries libres elles resteront en suspension. Les études réalisées sur les sites de Morlaix et de l'ouest Cotentin illustrent les différences observées d'un site à l'autre. A Morlaix, le mélange eau de station-eau d'estuaire décante rapidement : quelques minutes pour les particules minérales peu chargées en bactéries, deux heures pour les bactéries. Les eaux du havre de la Vanlée (Ouest-Cotentin) ont un faible pouvoir de décantation. En cinq heures on n'observe aucune diminution de la charge bactérienne dans la colonne d'eau, lors des expériences faites en laboratoire. Cette différence est à imputer en partie à la charge bactérienne qui varie d'un site à l'autre :  $2 \cdot 10^5$  UFC/100 ml à Morlaix, inférieur à  $10^3$  UFC/100 ml pour les eaux du Cotentin.

**La nature et la contamination du sédiment** vont dépendre des vitesses de chute et des conditions hydrodynamiques qui règnent sur le site du rejet. Sur les côtes battues par les houles, les sédiments sont grossiers (médiane > 200  $\mu\text{m}$  et absence de particules fines < 40  $\mu\text{m}$ ) et peu contaminés. Dans les estuaires, par contre, où les particules sont piégées, le sédiment est alors formé essentiellement de particules fines et les concentrations en bactéries fécales y sont très élevées. On observe alors une corrélation significative entre les teneurs en matières organiques et la contamination fécale. Il existe donc une relation entre la nature du sédiment et la contamination fécale : plus les sédiments sont fins (argiles) plus les teneurs en bactéries seront élevées.

**L'implantation** de bactéries d'origine entérique dans le sédiment se fait en présence d'une flore autochtone qui oppose une pression de sélection. L'état d'équilibre qui s'instaure est dû à une adaptation des bactéries allochtones mais également à l'apport continu des rejets. Les expériences *in vitro* démontrent qu'une implantation ponctuelle d'*E. Coli* en présence de flore autochtone n'est pérenne qu'en présence de fortes teneurs en matière organique. En effet, la présence de matière organique dans le sédiment joue un rôle essentiel en apportant aux bactéries entériques des osmoprotecteurs (Ghoul, 1990) leur permettant de surmonter l'élévation de la pression osmotique. D'autres modes de respiration doivent également être adoptés par les coliformes thermotolérants puisqu'ils sont retrouvés en milieu

anaérobie. Dans ces écosystèmes l'apparition d'une flore au métabolisme réduit doit être également importante (Rosack et Colwell, 1987a et 1987b).

Lorsque les **conditions hydrodynamiques** s'y prêtent, les bactéries piégées dans le sédiment de surface sont remises en suspension. Elles peuvent alors contribuer notablement à la contamination de l'eau comme c'est le cas dans la rade de Brest et dans l'Elorn. Dans l'estuaire de Morlaix où les eaux surnageantes sont très contaminées, cette contribution est difficile à mesurer. La simulation par modèle mathématique a été réalisée (Le Hir *et al.*, 1990). Les résultats montrent que les contaminations dues aux rejets et aux sédiments sont du même ordre de grandeur pendant les périodes où le courant est fort : en début de flot et de jusant, en vives eaux. Par contre, pendant les étales de courant et les mortes eaux, la contribution du sédiment est faible à nulle. Ces résultats confortent ceux trouvés dans l'Elorn. Dans un estuaire, le sédiment représente une source de contamination intermittente.

L'observation au microscope à balayage, des eaux de la rade de Brest après une période de clapot (mars 1981) montre dans l'eau, différentes associations bactéries-particules. Des minéraux (quartz, feldspaths) sont peu colonisés. Les particules colloïdales organiques sont moins nombreuses que les minéraux, plus petites que celles observées dans les rejets et la flore bactérienne associée y est plus homogène. Sur ces colloïdes, les bactéries présentent une activité physiologique, on y observe des chaînettes bactériennes traduisant une multiplication et des structures d'adhérence.

**Les temps de survie observés** dans l'eau, sur une souche d'*E. Coli* sont très variables et la qualité du milieu récepteur est responsable de ces variations. Ainsi, dans les eaux très turbides, le T90 - temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne soient plus cultivables - est de l'ordre d'une semaine. Lorsque l'ensoleillement et la qualité de l'eau le permettent, la pénétration des rayons lumineux provoque des T90 très courts de quelques heures sur les sites de Toulon, la baie de Fort de France, sur l'Ouest-Cotentin. Cependant les bactéries ne perdent pas leur activité puisqu'un métabolisme actif peut être mis en évidence. La prédation par le zooplancton est alors un facteur prépondérant de disparition des bactéries (Iriberrí *et al.*, 1994, 1995). Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par différents auteurs : Bonnefond *et al.* (1991), Barcina *et al.*, (1989-1990), Mezrioni *et al.*, (1995) et Monfort et Baleux (1994), Mesplé *et al.* (1994), Troussellier *et al.* (1994).

Le rôle majeur de la lumière sur les décroissances bactériennes peut-être atténué par la présence de matières en suspension. Ces dernières jouent un rôle très important sur la survie des bactéries fécales en mer. En arrêtant les rayons lumineux, elles protègent les bactéries de l'effet bactéricide du soleil. Les études réalisées montrent par ailleurs que la présence de matière organique dans l'eau a pour conséquence d'augmenter l'halotolérance des souches d'*E. coli* et de *Salmonella*.

A partir des études faites sur les différents sites, une corrélation entre les T90 et les intensités lumineuses a été établie. Aux fortes illuminations correspondent des temps de survie très courts. A contrario la perte de cultivabilité pour de faibles ensoleillements est très faible. La corrélation trouvée en Martinique est différente de celle calculée en métropole. Les souches bactériennes utilisées étant les mêmes, leur préparation identique, les conditions locales de température et d'oligotrophie doivent vraisemblablement être en partie responsable de ce phénomène. Il est très nettement observé que, pour les bactéries non exposées à la lumière, le taux de survie est plus important dans les eaux de Morlaix ou Toulon qu'à Granville, en baie de Fort de France ou du Robert. Qui plus est, à Morlaix par exemple, les

décroissances bactériennes s'arrêtent dès l'absence de lumière, ce qui n'est pas observé en Martinique ou à Granville, où elles continuent à décroître pendant la nuit. Il serait nécessaire de mesurer plus précisément les spectres solaires pour comprendre les dommages induits par le stress lumineux et en particulier la contribution des longueurs d'onde proches du visible sur les mécanismes de l'inactivation bactérienne.

Les coefficients de décroissance d'origine biologique ainsi obtenus peuvent être ensuite comparés avec les coefficients de dilution physique afin de déterminer sur les sites littoraux les facteurs responsables de la décroissance observée. Ainsi en baie de Morlaix, les facteurs de dilution apparaissent 500 fois plus efficaces en vives eaux que les facteurs biologiques pour expliquer les concentrations trouvées.

En Méditerranée, Thouvenin (1991) indique que, si durant la remontée du panache, seul le facteur physique est dominant, il n'en est pas de même lorsque le panache se déplace en surface, le soleil joue alors un rôle très important sur la perte de cultivabilité. En baie de Fort de France, Lazure *et al.* (1995) en utilisant les T90 et les mesures faites *in situ*, ont simulé l'impact des rejets sur la qualité de l'eau. Les résultats montrent qu'a priori des T90 très courts (2 heures) appliqués pendant le temps d'efficacité de l'ensoleillement ( $\approx 8$  h) et ajoutés à des temps plus long le reste du temps sont tout à fait réalistes. La lumière peut donc jouer un rôle important et inverser le rapport dilution physique/perte de cultivabilité. Néanmoins l'effet lumière reste limité à moins d'une dizaine d'heures par jour. Les facteurs biologiques (broutage par le zooplancton) exerceraient un rôle majeur dans le cas des lagunes où la dilution physique est très faible (Trousselier *et al.*, 1992).

**CHAPITRE IV**  
**LE STRESS LIÉ AU**  
**MILIEU MARIN**

## INTRODUCTION

Les bactéries entériques rejetées en mer perdent rapidement leur pouvoir de cultiver surtout lorsque les conditions deviennent hostiles : manque d'éléments nutritifs, augmentation de la salinité, ensoleillement important... Ces dernières années, les travaux réalisés par l'équipe de R.R. Colwell ont démontré que les bactéries évoluaient en mer vers un état dit viable non cultivable (Xu *et al.*, 1982 ; Colwell *et al.*, 1985 ; Grimes *et al.*, 1986 ; Rosack et Colwell, 1987).

Depuis, de nombreuses publications ont abondé dans ce sens et en prenant pour acquis cet état de viabilité où le pouvoir de cultiver sur des milieux de référence est perdu. Aux bactéries entériques ou pathogènes pour l'homme : *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Legionella*, *Vibrio cholerae*, se sont adjoint d'autres bactéries de l'environnement qui évolueraient selon le même processus : *Vibrio salmonicida*, *Bacillus subtilis*, *Aeromonas hydrophyla*, *Vibrio vulnificus*, *Aeromonas salmonicida*... La perte de cultivabilité de *Vibrio cholerae*, par exemple, expliquerait en partie les variations d'abondance observées et aussi la distribution de cette bactérie dans les pays où la maladie est endémique (Xu *et al.*, 1982).

Différentes modifications morphologiques ou physiologiques sont observées à ce stade de non cultivabilité. Dans une revue récente, Oliver (1993) évoque les travaux et les outils mis en pratique pour étudier la formation des cellules non cultivables : mesures directes par microscopie (Direct Viable Count), cytométrie de flux utilisant divers cytochromes, micro-autoradiographie, (Reaction d'amplification génique - PCR), anticorps couplés avec la technique DVC, utilisation de substrats marqués, etc. Sans revenir sur tous les aspects évoqués, on peut néanmoins rappeler que les principales modifications observées concernent : les changements de taille aussi bien sur les vibrions (Novitsky et Morita, 1976 ; Colwell *et al.*, 1985) que sur *Salmonella* (Galdiero *et al.*, 1994) les modifications des systèmes de transport (Gauthier *et al.*, 1993 ; Linder et Oliver, 1989), de la respiration (Troussellier *et al.*, 1994 ; Smith et Mc Fetters *et al.*, 1994), l'épaississement de la membrane (Munro, 1988 ; Galdiero *et al.*, 1994), la modification de la structure de l'ADN (Moyer et Morita, 1989 ; Gauthier *et al.*, 1992 ; Hood *et al.*, 1986), la diminution du nombre de copies du génome (Troussellier *et al.*, 1994). Cependant, le contenu plasmidique semble se maintenir (Byrd et Colwell, 1990, Van Overbeek, 1990) ainsi que la virulence ou plus exactement le pouvoir pathogène potentiel (Grimes et Colwell, 1986 ; Michel et Dubois-Darnaudpeys, 1980) alors que la bactérie n'est plus cultivable.

Si la bactérie est maintenue dans le milieu qui lui est hostile, elle évolue vers un état dit de dormance puis dans un état irréversible (pré-sporulation - R.R. Colwell, Communication personnelle) qui entraînerait la mort et la lyse de la cellule.

Lorsque les conditions redeviennent favorables, on peut observer une reviviscence de la bactérie ; ainsi, différentes expérimentations ont été réalisées en laboratoire pour étudier les possibilités pour ces bactéries viables non cultivables de reprendre un métabolisme actif (Colwell *et al.*, 1985 ; Nilsson *et al.*, 1991).

**Dans la nature les bactéries entériques sont-elles capables de recultiver ?  
Peuvent-elles maintenir leur pouvoir pathogène ? Quels sont les mécanismes impliqués  
par cette évolution ? Tels sont les problèmes posés ; ceux-ci sont par ailleurs communs à**

d'autres environnements que le milieu hydrique : en industrie alimentaire par exemple on retrouve la même problématique.

Depuis une dizaine d'années des études ont été réalisées : la salinité (Solic et Krustalovic, 1992 ; Gauthier *et al.*, 1993), la température (Flint, 1987) et la lumière (Barcina *et al.*, 1989, 1990 ; Sinton *et al.*, 1994 ; Arana *et al.*, 1992, Curtis *et al.*, 1992) semblent jouer un rôle important sur la perte de cultivabilité. Par contre, selon Oliver (1993), le manque de nutriments, seul ne pourrait y suffire. En fait, ces facteurs agissent rarement de façon isolée : au manque de nutriment s'ajoute la plupart du temps une augmentation de la salinité, les deux facteurs agissent alors ensemble (Rosack et Colwell, 1986 ; Gauthier *et al.*, 1992). La température et la prédation agissent en synchronisme (Barcina *et al.*, 1991) tandis que l'apport d'élément nutritif, au contraire, servirait à la bactérie pour lutter contre les autres stress : par exemple la lumière (Gourmelon, 1991 ; Bonnefont *et al.*, 1992) ou la salinité (augmentation de l'halotolérance : Dupray *et al.*, 1995). Les résultats montrent la nécessité de travailler avec des plans d'expériences multiparamètres (Bonnefont *et al.*, 1994 ; Dupont, 1994) qui permettent d'étudier les effets antagonistes ou synchrones des différents facteurs.

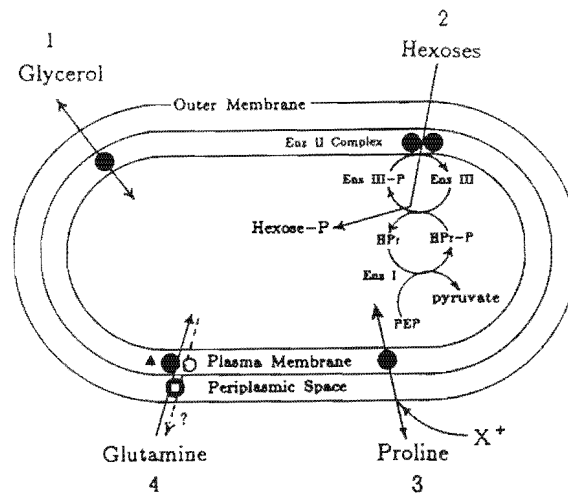
### *Le stress osmotique*

Parmi les mécanismes, le stress osmotique et l'halotolérance ont été sans aucun doute les mieux étudiés ces dernières années. Il est bien établi maintenant que les bactéries répondent au stress osmotique en augmentant les concentrations en solutés compatibles n'ayant aucun effet inhibiteur sur les processus cellulaires (Brown et Simpson, 1972). Ces solutés sont accumulés soit par synthèse endogène, soit par transport à partir du milieu ; en effet, la plupart - à l'exception de l'ion  $K^+$  et du glutamate - ne peuvent traverser rapidement la membrane sans l'aide de système de transport. Certains solutés ont un effet de stimulation du métabolisme et du taux de croissance lorsqu'ils sont ajoutés au milieu (Ghoul, 1990 ; Strøm *et al.*, 1983). Chez les entérobactéries, l'étude de l'halotolérance a donné lieu à de nombreuses publications (Le Rudulier et Brouillard, 1983). Ces travaux ont montré que la glycine-bétaïne, la chlorure, la bétaïne aldéhyde, le triméthyl aminobutyrate, la proline bétaïne, la proline provoquaient une osmorégulation ; plus récemment la diméthylthétine a été ajoutée à cette liste (Chambers *et al.*, 1987 ; Ghoul *et al.*, 1995). Munro (1989) et Ghoul (1990) ont mis en évidence les différents mécanismes d'action de ces osmoprotecteurs dans les milieux marins ; les gènes induits pour l'adaptation osmotique seraient régulés et dépendraient du niveau même du stress (Higgins *et al.*, 1987).

La plupart des réponses au stress osmotique serait la conséquence de l'accumulation d'ion  $K^+$  due à la baisse de la pression de turgescence. Cette accumulation serait régie par la force ionique ainsi créée (Epstein, 1986) ; l'augmentation de la force ionique est considérée par Higgins *et al.* (1987) comme un signal intracellulaire global qui régulerait l'expression génique (accumulation de la glycine bétaïne pour limiter la dénaturation des protéines due à la concentration d'ion  $K^+$ ...).

L'une des sources d'énergie requise lors du choc osmotique, serait le gradient électrochimique - réserve de la bactérie aussi importante que l'ATP généré - qui exercerait une force motrice protonique (FMP). Cette dernière constitue le couplage entre le transport d'électrons et la formation d'ATP ; elle est utilisée également pour le transport actif de substances.

Au système de **transport passif** s'adjoignent trois autres systèmes de transports (fig. 44) (Furlong, 1987).



**Figure 44 : principaux types de systèmes de transport chez les bactéries à gram négatif (Furlong, 1987)**

Le système de translocation de groupe (2) exigeant l'association de composés situés à la fois dans le cytoplasme et dans la membrane ; pendant ce transport il y a modification du substrat ; le gradient électrochimique (3), transport de la proline et du lactose, dépendant d'un système de co-transport de proton (principalement des ions  $H^+$  et dans une moindre mesure  $Na^+$ ). L'énergie nécessaire serait fournie par de la FMP. Le dernier système (4) "Binding proteins-dependant transport system" fait intervenir des protéines périplasmiques qui possèdent des liaisons spécifiques pour le soluté transporté (l'énergie venant de l'ATP). Ces différents systèmes peuvent être, en fait, utilisés par un nutriment donné. On ne connaît que peu de choses sur le choix de ces systèmes. Gauthier *et al.*, (1992) ont testé leur sensibilité au choc osmotique ; ainsi pour des *E. coli* cultivés sur milieu doux, le passage en eau de mer provoquerait l'inhibition de tous ces systèmes et le rejet partiel de substances intracellulaires.

Certains agents découplants sont utilisés pour étudier l'effet de l'inhibition des systèmes énergétiques sur la physiologie bactérienne ; ces agents arrêtent, par exemple, la synthèse de protéines produites par l'ATP synthétisée, sans bloquer la consommation d'oxygène : ainsi le flux d'électrons continue, mais aucun gradient  $H^+$  n'est formé et la force protonique est complètement annulée. Le CCCP (Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenyl-drazone) lorsqu'il est ajouté au milieu de croissance, dissipe la FMP. L'abolition de l'action d'un composé (par le CCCP, par exemple) suppose donc son couplage à la FMP.

Le comportement du CCCP dépend du type de la bactérie : chez les vibrions, l'accumulation des nutriments est liée à l'apparition d'un gradient électrochimique de  $Na^+$ .

Tokuda et Unemoto (1982) ont montré l'existence de deux systèmes de transport : à pH acide, la FMP permet la construction d'un gradient électrochimique de  $\text{Na}^+$  par un système antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ce système peut être bloqué par le CCCP. A pH acide, les vibrios sont donc très sensibles au CCCP. A pH alcalin un potentiel électrochimique de  $\text{Na}^+$ , insensible au CCCP, couplé à la respiration se met en place et permet l'accumulation de substrats et la synthèse d'ATP (Tokuda et Unemoto, 1985).

### *Stress oxydatif*

A leur arrivée en mer, les bactéries subissent les effets du rayonnement solaire ; ce stress ajouté à celui de la salinité des milieux oligotrophes est tel que les observations réalisées dans les zones côtières rassemblant tous ces critères défavorables à la bactérie, ont été à l'origine de la théorie du pouvoir auto-épurateur de l'eau de mer. Dans l'eau de mer, l'action essentielle de la lumière serait due aux UVA et à la lumière visible. Ainsi, Sinton *et al.* (1994) estiment que 50 % de l'inactivation des coliformes serait due à des longueurs d'ondes supérieures à 360 nm. Gameson et Gould (1985), quand à eux estiment à 50 % l'inactivation par les longueurs d'ondes supérieures à 370 nm et 25 % à celles supérieures à 400 nm. Les travaux réalisés *in situ* en flacon de verre (Bonnefont *et al.*, 1990) ou en chambre à diffusion arrêtant les UV (Pommepey *et al.*, 1990) montrent le rôle drastique de la lumière visible pénétrant dans l'eau de mer sur plusieurs mètres.

Cependant, les travaux de Piezena et Hader (1994) indiquent que les UVA pénètrent également de quelques mètres sous la surface et contribuent ainsi aux dommages cellulaires.

La présence de photosensibilisateurs (composés facilement excitable par la lumière) dans l'eau de mer tels les acides humiques a été démontrée (Cooper et Zika, 1983). De même à l'intérieur de la bactérie, les cytochromes (Chamberlin et Mitchel, 1978) et les riboflavines joueraient le rôle de photosensibilisateur et permettraient la production d'espèces oxygénées réactives (ROS : Reactive Oxygen Species) telles que le radical hydroxyle ( $\text{OH}^\bullet$ ), l'anion superoxyde ( $\text{O}_2^-$ ), l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) et le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Ces composés ainsi formés sont très toxiques pour la cellule. Cependant, *E. coli* dans le tube digestif doit lutter contre de très fortes concentrations en ROS relarguées par les macrophages (Hengge-Aronis, 1993) et est donc équipé de moyens de défense pour les détruire (catalase, superoxyde dismutase) ou pour réparer les dommages causés au niveau de l'ADN par exemple l'exonuclease III (Webb et Brown, 1976). Les espèces oxygénées réactives peuvent attaquer dans la cellule tous les composés macromoléculaires : ADN, ARN, protéines de membrane... par une variété de réactions. Ainsi au niveau membranaire, les systèmes de respiration ou de transport sont inhibés (D'Aoust *et al.*, 1980). La résistance de la bactérie sera fonction de la qualité du milieu récepteur et des sources énergétiques qui y sont disponibles.

**Comment vont agir les facteurs naturels en zone littorale sur la physiologie de la bactérie et quels seront les mécanismes de leur action ? L'objectif du travail présenté ici est de tenter de répondre à certaines de ces questions.**

**Ces résultats concernent l'effet des stress oxydatif et osmotique sur le métabolisme bactérien et le rôle de certains composés présents dans le milieu littoral -**



**matières en suspension, matière organique, osmoprotecteurs - capables de lever l'inhibition due à ces stress.**

- **Le milieu naturel : facteur de stress** ; la première étude - a pour objet de préciser les conditions de stress que subissent les bactéries *in situ*. Ce travail s'est particulièrement intéressé au rôle de la matière organique et des matières en suspension en tant que facteurs antagonistes des stress lumineux et osmotiques. En effet, ces facteurs peuvent agir soit directement en arrêtant les rayons lumineux, soit indirectement par leur effet biologique (apport de nutriments). Il était intéressant de savoir comment *in situ* ces deux modes d'action pouvaient intervenir (*article 7*).

- **La perte de cultivabilité** a fait l'objet de l'étude suivante. Ce travail a été réalisé avec *Escherichia coli* H 10407. La souche, immergée *in situ* dans des chambres à diffusion est soumise à différentes conditions naturelles (eaux claires, turbides avec ou sans ensoleillement). Les techniques de comptage direct (bactéries totales, bactéries viables) sont utilisées en parallèle des techniques par culture (bactéries cultivables) ; la comparaison des numérations ainsi obtenues permet d'observer l'évolution physiologique de la souche testée. *L'article 8* présente les résultats obtenus.

- **Le maintien du pouvoir pathogène** lors de la perte du pouvoir de cultiver a ensuite été étudié. La souche enterotoxinogène *E. coli* H 10407 a été soumise au même protocole que précédemment : séjour *in situ* dans des chambres à diffusion avec ou sans illumination. L'évaluation de la pathogénécité a été étudiée en utilisant la technique de l'anse ligaturée de lapin et en parallèle une technique GM<sub>1</sub> - ELISA - les résultats sont présentés dans *l'article 9*.

- **La lumière visible**, ayant un effet drastique sur la perte de cultivabilité de bactéries entériques rejetées en mer nous avons tenté d'en déterminer les mécanismes d'action. L'hypothèse retenue est l'implication d'espèces oxygénées réactives dans les dommages cellulaires. L'étude *in vitro* a permis de tester le rôle de l'oxygène et des ROS en utilisant des composés piégeant ces espèces toxiques : le  $\beta$ -carotène, la superoxyde dismutase, la catalase, la thiourée ainsi que la desferrioxamine  $\beta$  (un chélateur du fer). Les résultats sont présentés dans *l'article 10*.

Les études ont ensuite porté sur la modification de certains systèmes d'énergie ou d'activités enzymatiques sous l'effet des stress oxydatif et osmotique.

- **Modification des systèmes énergétiques** : Dans ce travail nous avons utilisé le CCCP - carbonyl cyanide-m-chlorophenylhydrazone - qui modifie le gradient protonique ( $H^+$ ) et découple le transport d'électrons à partir de l'ATP synthétisée. Ce composé peut transporter les protons dans la cellule sans la participation de l'ATP synthétase. La force motrice protonique est alors neutralisée et l'ATP n'est plus synthétisée. Dans l'étude reportée dans *l'article 11*, le CCCP a été utilisé pour étudier la modification du transport actif chez *E. coli* lorsque les conditions de salinité et de nutriments varient. L'apport d'osmoprotecteur en présence ou absence de CCCP et à différentes salinités a également été observé. Ces résultats sont comparés à ceux obtenus sur *Vibrios* - bactéries halophiles, où le transport d'ion  $Na^+$  est indispensable à la bactérie.

- **Modification des systèmes enzymatiques hydrolase et  $\beta$ -galactosidase chez *E. coli*.** L'assimilation de nutriments par les bactéries implique la participation de différentes enzymes parmi lesquelles les **hydrolases**. Celles-ci permettent à certains composés d'être dégradés et ainsi assimilables par la bactérie. Dans l'étude présentée ici - *article 12* - le substrat 4-méthylumbelliféryl (MU) est utilisé pour mettre en évidence la production d'hydrolase chez *E. coli* dans des conditions où la croissance n'est pas optimale.

L'expérimentation s'est déroulée *in vitro*, la bactérie étant immergée dans de l'eau de mer avec ou sans ajout (glycine-bétaïne, peptone, milieu minimum). La production d'hydrolase est mesurée par spectrofluorimétrie.

Plus spécifique des coliformes l'activité  $\beta$ -galactosidase a ensuite été étudiée en utilisant la même technique, la même souche et toujours le même protocole établissant le stress. Le substrat est cette fois-ci le 4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-galactopyranoside (MUGal) dont la dégradation par l'enzyme est mesurée par spectrofluorimétrie. L'objet de ce travail, présenté dans *l'article 13*, est de déterminer si cette enzyme - qui est à la base de la mise en évidence des coliformes dans les techniques par culture - est capable de persister pendant le stress et si sa production est corrélée avec un maintien de la viabilité de la cellule.

L'utilisation de techniques rapides enzymatiques pour le contrôle sanitaire des eaux côtières est ensuite envisagé : sur site, les techniques basées sur l'utilisation des substrats MUGal et MUGlu (4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide) sont testées ; l'utilisation de la MUGlu spécifique des coliformes thermotolérants est discutée eu égard aux observations réalisées *in vitro* sur *E. coli* stressé. *L'article 14* présente ces résultats.

**1 - ARTICLE 7 :**  
**Enteric bacteria survival factors**

## ENTERIC BACTERIA SURVIVAL FACTORS

M. Pommepuy\*, J. F. Guillaud\*, E. Dupray\*, A. Derrien\*,  
F. Le Guyader\*\* and M. Cormier\*\*\*

\* IFREMER, Centre de Brest, Direction de l'Environnement Littoral, B.P. 70, 29280  
Plouzané, France

\*\* Faculté de Pharmacie, Université de Nantes, Laboratoire de  
Virologie-Bactériologie, 1 rue Gaston Veil, B.P. 1024, 44035 Nantes Cedex, France

\*\*\* UER Rennes 1 Laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique, avenue du  
Professeur L. Bernard, 35043 Rennes, France

### ABSTRACT

In order to improve bacterial water quality of shellfish farming areas, studies were conducted in the English Channel (Morlaix) and on the Mediterranean coast (Toulon). These two areas were chosen in order to compare behaviour of fecal bacteria in two different ecosystems. In the estuary of Morlaix sediments are polluted by way of settlement, but most of the bacteria are mixed with turbid waters and are able to survive a very long time (T90 are in a range of several hours to several days). By measuring the increase in salt tolerance of the strains grown in natural organic matter, it was demonstrated that *Salmonella* can tolerate coastal water salinities. Moreover, because light penetration is prevented by suspended matter, the solar bactericidal effect is very low. On the contrary, through lack of nutrients and very high sunlight intensity, die-off rates in Mediterranean waters are very high (at the surface T90 are less than 2 hours, and several hours in deep waters). A close relationship was found between the light intensity received by bacteria and the T90. Predicted T90 must be found using these two parameters (including turbidity and deep effect on light intensity). The authors suggest that precautions must be taken to carry out impact studies depending on water quality of the area, especially in turbid areas. The knowledge of these mechanisms is very important to evaluate waste water impact on the quality of shellfish farming areas, and to improve elimination of fecal bacteria in sewage treatment plants.

### KEYWORDS

Estuaries; bacteria survival; *E. coli*; *Salmonella*; sunlight; salt-tolerance; T90; seawater; sediment.

### INTRODUCTION

The enteric bacteria dispersed in coastal marine areas are completely at the mercy of their environment. Depending on temperature, salinity, nutrients concentrations and turbidity, the behavior of these microorganisms will be radically different. Die-off processes were studied on *Escherichia coli* and *Salmonella* on characteristic sites : Morlaix estuary and West Cotentin Coast (on the English Channel) and Toulon on Mediterranean Sea (Fig. 1) ; these areas receive a large bacterial load discharged by sewage treatment plants and rivers. The purpose of this paper is to discuss the conditions under which enteric bacteria die or survive in these different environments depending on sediment characteristics or water quality - i.e. nutrient or organic matter presence and sunlight penetration.

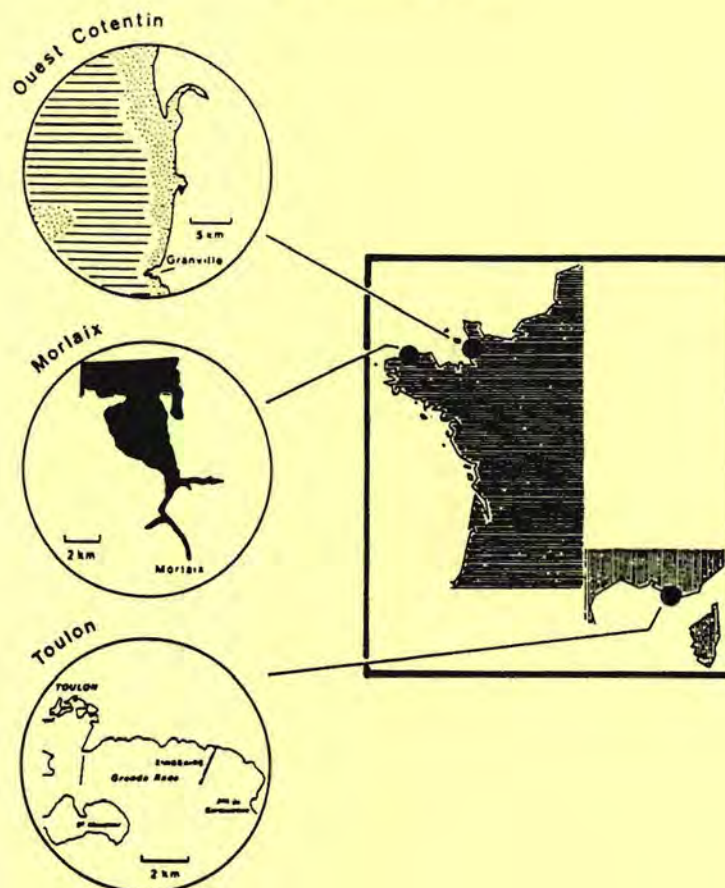


Fig. 1. Location of study areas in Mediterranean sea (Toulon : T) and English Channel (Morlaix estuary : M and West Cotentin Coast : W).

## BACTERIAL CONCENTRATIONS

Urban and farm sewage flow into coastal areas and estuaries. These waste waters, which are not always well depurated, contain many bacteria, some of which are fecal and pathogenic for man. After being discharged into the sea, some of these sewage bacteria are diluted and carried seaward.

In fact, mechanisms in estuaries are complex, due to the diversity of bacterial populations ; Plummer *et al.* (1987) clearly indicate that three groups of bacteria occur in estuarine waters : (1) free-living bacteria whose abundance is independent from turbidity ; (2) bacteria attached to permanently suspended particles in water - these are organic large particules ; (3) bacteria able to settle ; the abundance of this last group increases with turbidity.

### *Free and attached bacteria*

Studies on attached bacteria were carried out in Morlaix estuary in order to evaluate the percentage of free or non-free living bacteria in seawater under several hydrodynamical conditions (neap and spring tides) ; samples were collected in sterile bottles at the surface in order to analyse both fecal bacteria and turbidity. The group of attached bacteria was obtained using filtration on Millipore filters ( $> 3 \mu\text{m}$ ) while free bacteria were provided by the filtrate ( $< 3 \mu\text{m}$ ) and then recovered on  $0.22 \mu\text{m}$  Nucleopore filters, which were incubated at  $42^\circ\text{C}$  on Drigalski medium (Pommepuy *et al.*, 1987) ; the results are presented in figure 2 and show a relationship between the percentage of attached bacteria (adsorbed bacteria/total bacteria) and turbidity (expressed in  $\text{mg.l}^{-1}$ ). The abundance of fecal attached bacteria increases in proportion to the sea

water turbidity. The same results were found by Woon Bay Yoon and Rosson (1990) ; Goulder *et al.* (1980) demonstrated that activity of heterotrophic attached bacteria is greater than activity of free bacteria ; attachment is presented as a "strategy" of bacteria to improve metabolism and to protect themselves from zooplankton grazing.

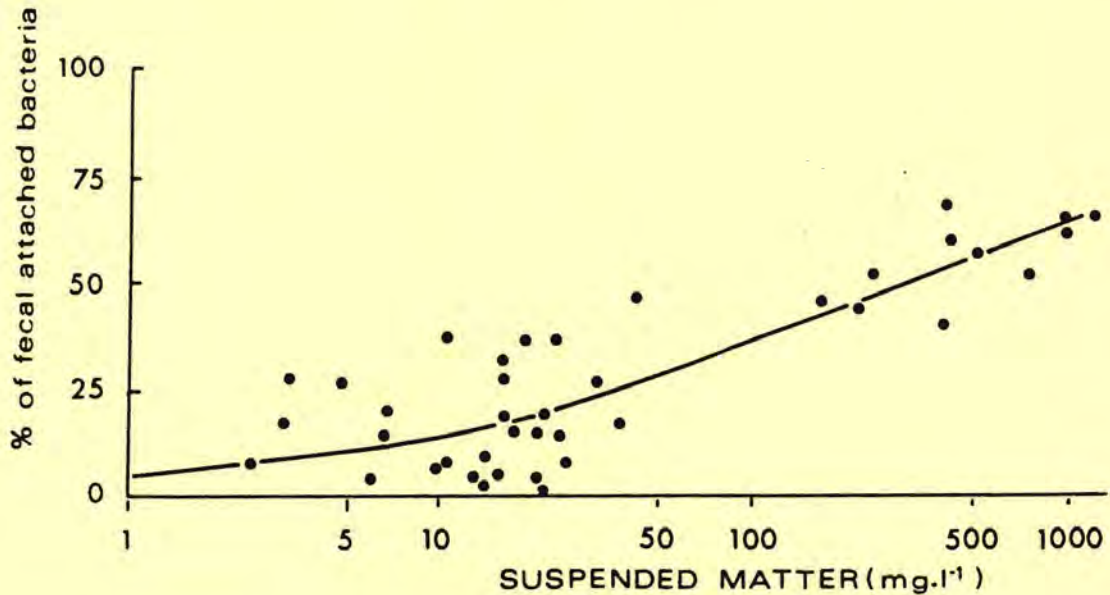


Fig. 2. Relationship between suspended matter ( $\text{mg l}^{-1}$ ) and percentage of fecal attached bacteria. Estuary of Morlaix - Spring tides (June 1987 - October 1987 - March 1988).

Under turbulent flow conditions a zone of relatively still water exists near the bottom (Characklis, 1981) ; in this viscous sublayer bacteria must penetrate in order to be deposited (Marshall, 1985) ; these conditions occur in estuaries and bays.

#### *Fecal contamination in sediments and overlaying waters*

Relationships between water and sediment concentrations may be calculated using equivalent units (concentrations are expressed for 100 ml in water and 100 g in wet sediment) ; sampling trips were carried out in June and October (1987) during neap tide and spring tide ; sediments were collected at low tide directly on the surface (top centimeter) in sterile boxes and waters were sampled at low and high tide in sterile bottles. Fecal coliform were analysed using standard methods (filtration or dilution, incubation at  $44.5\text{ }^{\circ}\text{C}$  on desoxycholate agar). Results (mean and standard deviation) are shown in figure 3 : each point represents the mean from several analyses.

A significant difference is observed between sediment and water concentrations. In any case fecal coliforms present higher concentrations (1 or 2 log) in the sediment than in the water. These results are in conformity with studies by Erkenbrecher (1981). Sediment fecal coliform concentrations regularly and slowly decrease from upstream ( $> 10^6$  UFC/100 g) - i.e. near sewage treatment plant discharge - to downstream ( $\sim 10^2$  UFC/100 g) ; while irregular variations are observed in water. The mean slope in estuarine waters is slightly higher than in sediment due to dilution and bacterial mortality rates.

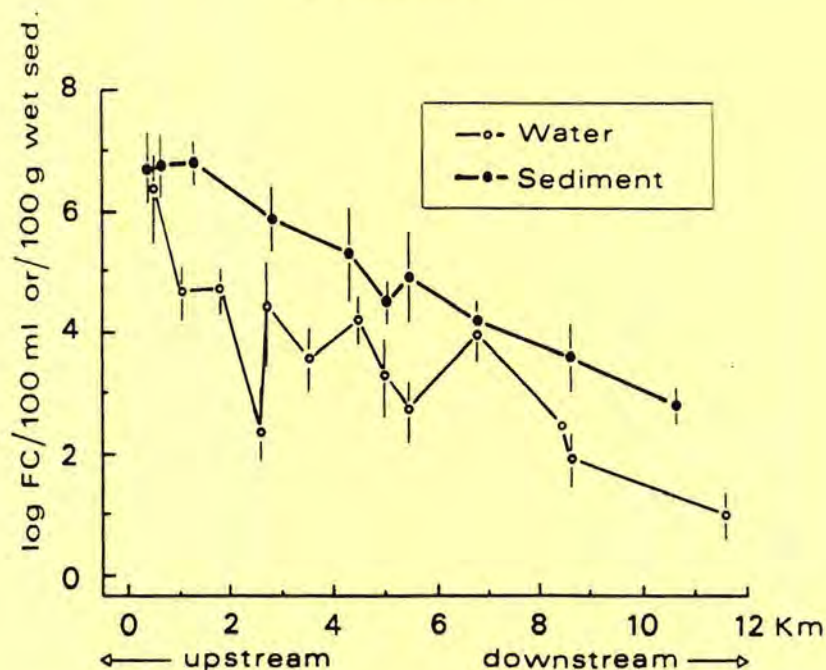


Fig. 3. Evolution of fecal coliform concentration in sediment (●), and in water (○), in Morlaix estuary (mean and standard error).

## SURVIVAL IN SEDIMENTS

### *Behavior of fecal bacteria in sediment*

In spite of its high concentration of organic matter, sediment is a limited energy and nutrient environment for microorganisms; in fact a large part of organic matter is refractory and bacteria cannot always utilize the labile part. Great spatial and temporal variations are observed in terms of nutrient element contributions; organisms which survive are those which are minimally active, adapted to low available nutrient concentrations, and those capable of very rapid organic matter uptake during short periods of nutrient abundance, and able to survive in inactive states during the long intervening periods (Nedwell and Gray, 1987).

Different alternative strategies may be adopted (Brisou and Denis, 1978). Few bacteria are able to form spores. When external conditions are not highly lethal, microorganisms use different mechanisms to enable themselves to survive. Thus, most adhere to the surface (Janasch and Pritchard, 1972). As demonstrated by Brown *et al.* (1977), bacteria can remain active when nutrient concentrations are very low, which they could not do in the same environment if they were non-adherent; this also enables them to buffer nutrient compounds more effectively and to be more efficient.

An estuarine survival model for *Vibrio cholerae* has been proposed by Colwell (1983). Survival mechanisms are dependent on organic matter concentrations and available substrates, and require important physiological and structural transformations; in this case we also observe the appearance of a small-sized cell (*Microvibrio*).

Other steps have also been demonstrated in studies on the survival of *Escherichia coli* (Rosack and Colwell, 1987). In the first "viable" stages (Table I), the bacterium has a metabolism which enables it to be recultured by "soft" methods (preculturing); subsequently, cells are no longer culturable but they continue to be able

to use exogenous materials and to be metabolically active. Munro *et al.* (1987) observed structural modifications along with enzymatic developments ; the bacteria are considered to be "asleep". In the final stages before death, we can still observe the intact cell by epifluorescence microscopy (Acridine Orange Count).

Direct microscopic examination reveals that such cells account for a large part of the microflora ; the total flora count, as observed by epifluorescence, is 1000 to 10000-fold greater in number compared to the viable heterotrophic flora (Pommepuy *et al.*, 1990).

The survival of bacterial sediment populations can depend on their ability to store energy reserves. The presence of osmoprotectors (glycine-betaine, trehalose, amino acids) may also help to increase survival rates of fecal bacteria in salt environments. Ghoul *et al.* (1989, 1990) observed that when *Escherichia coli* are put into muddy sediments, they are able to intracellularly store exogenous betaine and thus increase their salt-tolerance.

#### *Apparent mortality (T90) in sediment*

Many authors have studied survival times of enteric microorganisms in sediment. Sediment protects bacteria from solar radiation, in addition to procuring osmoprotectors and nutrient elements (Gerba and MacLeod, 1976). Survival times are very long for fecal bacteria in sediment. They can vary from several days to several weeks.

The apparent mortality (T90 - time needed for 90 % of bacteria to be unable to cultivate) in sediment, was calculated by Le Guyader (1989) and varies from 6 to 20 days for *E. coli* ; some other groups of bacteria, such as *Salmonella* can survive several weeks in sediments (Gudding and Krodstad, 1975); the same mortality rates were calculated for fecal streptococci.

TABLE 1 Characterization of cells in survival stages of progressive dormancy (Rosack and Colwell, 1987).

Method of enumeration or detection	Survival at the following stage in the continuum						
	Culturable	Recoverable	Growth responsive	Metabolically active	Dormant	Intact	Dead
Acridine orange direct count	+	+	+	+	+	+	-
Animal-passage recovery	+	+	+	+	+	-	-
Substrate uptake	+	+	+	+	-	-	-
Direct viable count	+	+	+	-	-	-	-
Acclimatization, plate count	+	+	-	-	-	-	-
Standard plate count	+	-	-	-	-	-	-
	VIALE		SOMNICELL				
	VIVIFORM						
	INCREASING TIME IN SURVIVAL CONDITIONS						

The difference of apparent mortality may be observed in figure 4 between thermotolerant or fecal coliforms (CF) and fecal streptococci (SF).



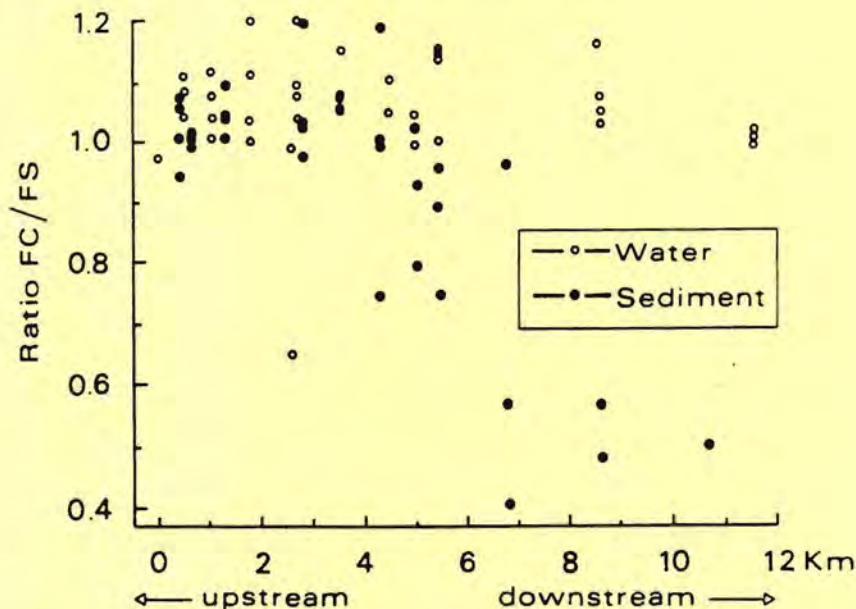


Fig. 4. Evolution of the ratio Fecal coliform/Fecal streptococci (FC/FS) in sediment (●), and water (O), in Morlaix estuary (June and October 1987 - Neap and spring tides).

In sea water where the transit time is very short and often less than one day (Salomon and Pommepuy, 1990), the ratio is slightly higher than 1, while in sediment it decreases from 1 upstream to 0.4 downstream. Upriver from the estuary the bacteria settle, the stable ratio of around 1 is due to recent contamination; downstream far from the pollution source - it seems that the ratio decrease in sediment must be due to a loss of cultivability of CF greater than that of SF in old polluted sediment. This interpretation is in agreement with results obtained by Pommepuy *et al.* (1990) on the same estuary, where bacterial concentrations function of depth in sediments showed that in deep and old contaminated sediment S.F. did not decrease as quickly as C.F. Same results of persistence of fecal streptococci in sediments were found in previous studies from Delattre (1988).

### SURVIVAL IN THE WATER COLUMN

The survival mechanisms of enteric bacteria in the water column have been the topic of many studies; the main factors involved in increasing bacterial survival in the coastal zone are the supply of organic matter as nutrients or osmoprotectors, and the reduction of light's lethal effect by turbidity (Martin and Bonnefont, 1986; Crane and Moore, 1986). Temperature also influences the increase or decrease of mortality in estuaries. Rhodes and Kator (1988) working on survival of *E. coli* and *Salmonella spp.* demonstrated that *Salmonella spp.* populations exhibited less mortality and stress than did *E. coli* at low temperatures (< 10 °C).

#### *The role of organic matter on the salt-tolerance*

Allochthonous enteric bacteria when entering the marine environment through waste-waters run-off, are subjected to an osmotic shock. To avoid dehydration, cells take up molecules (osmoprotectors) which act as osmotic balancing agents. It has been demonstrated that several compounds can be accumulated intracellularly by *Enterobacteriaceae* (*E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*...): glycine-betaine (Csonka, 1981), K<sup>+</sup> ions and glutamate (Measures, 1975), trehalose (Strom *et al.*, 1986) for the most important.

The ability of bacteria to induce such a mechanism may influence their later survival. Nevertheless, these mechanisms need energy, either for the membrane transport systems activity (K<sup>+</sup>, glycine-betaine,

proline) or for the biosynthesis of osmoprotectors (trehalose, glutamate). In environments with large amounts of organic matter, bacteria could find both nutrients and osmoprotectors. Under this hypothesis, we studied increase of the salt-tolerance of *Salmonella* induced by estuarine waters. 18 strains of *Salmonella* were grown in sterile estuarine water (sampled in the Morlaix estuary), added to the mineral compounds of a minimal medium M63, at serial NaCl concentrations. Medium M63 made with distilled water was used as the control. We measured growth in each case, after 5 days at 15 °C, and 1 day at 37 °C. The difference showed the increase of the salt-tolerance induced by organic matter. The same experiment was carried out with filtered (0.22 µm) waters, in order to determine the respective roles of dissolved and particulate organic matter. Figure 5 shows that the greatest amount (23.5 mg l<sup>-1</sup> : water A) yielded a 10 g l<sup>-1</sup> NaCl increase of salt-tolerance for 89 % of the strains (at 37 °C) and for 72 % (at 15 °C). Whereas the second tested water (12.4 mg l<sup>-1</sup> : water B) allowed the same increase for only 22 % of the strains. These results are in good agreement with our previous study (Pommepeuy *et al.*, 1991).

The dissolved organic matter appeared to be the most effective (fig. 5), most likely because it is the most easily assimilated, either at 37 °C or at 15 °C. Even if a large amount of environmental organic matter increases the salt-tolerance of allochthonous bacteria, it must be kept in mind that its composition and nature are the most important factors.

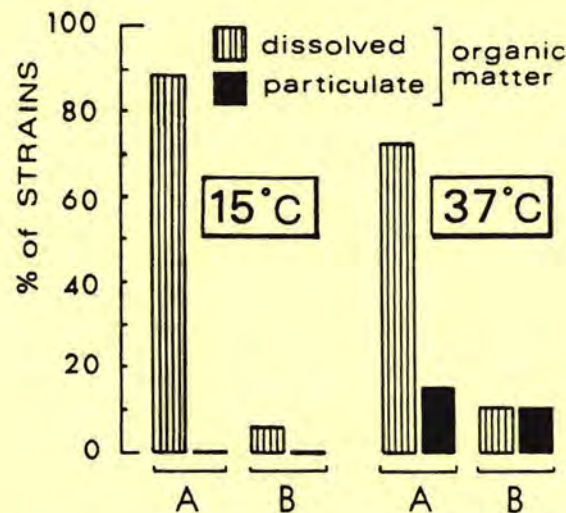


Fig. 5. Percentage of *Salmonella* strains showing a 10 g l<sup>-1</sup> NaCl increase of their salt-tolerance when grown with the organic matter of two different estuarine waters (A and B).

#### *The role of light attenuation*

For a long time, light has been recognized as a die-off factor for enteric bacteria in sea-water (Gameson and Gould, 1975) ; however in the coastal zone, light attenuation by turbidity is responsible for an increase in bacterial survival.

In order to evaluate this phenomenon, field measurements of light attenuation and bacterial survival were carried out in the English Channel (Morlaix estuary and West-Cotentin coast) and in the Mediterranean Sea (Bay of Toulon - Bonnefont *et al.*, 1990).

Light intensities were measured at different depths with a submersible quantum sensor (LICOR) in the wave length band from 400 to 700 nm ; the vertical attenuation coefficients were calculated according to the Lambert law :  $I = I_0 e^{-kz}$  (where  $I_0$  is light intensity at the water surface,  $I$  is light intensity at depth  $z$ , and  $k$  is the attenuation coefficient).

The part played by dissolved and particulate matter in light attenuation was evaluated by laboratory measurements of light transmission with a spectrophotometer UVIKON 810 (wave length band : 400 to 700 nm). The attenuation coefficients were calculated for raw water samples ( $k_r$ ) and for filtered water samples through a 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter ( $k_f$ ) ; the difference between the two measures gives the attenuation for suspended matter ( $k_s = k_r - k_f$ ).

Field bacteria survival experiments were carried out using quartz chambers (volume : 600 ml) closed by 0.45  $\mu\text{m}$  Millipore membranes. For full details of sampling sites and bacterial method see Pommeputy *et al.* (1990). One ml of *E. coli* suspension was initially introduced into the chambers, which were located at different depths in the water column. Aliquots were periodically withdrawn and numerations were carried out using a standard membrane filter technique with incubation on Drigalski agar medium (Pommeputy *et al.*, 1987). A simple first-order model was used ( $dc/dt = -\mu c$ ) to estimate the bacterial disappearance rate ( $\mu$  in  $\text{h}^{-1}$ ) and  $T_{90}$ , which is the time (in h) needed for 90 % of bacteria unrecoverable by culture ; it is closely linked to  $\mu$  by the equation  $T_{90} = 2.3/\mu$ .

Results concerning field measurements of visible light attenuation confirm that there is a good relationship between suspended matter concentrations and light attenuation coefficients (fig. 6) ; this figure shows that in turbid estuarine waters ( $\text{SM} = 100 \text{ mg.l}^{-1}$ ) light transmission through the water column could be reduced by a factor greater than 10, in comparison to clear coastal waters ( $\text{SM}$  between 1 and 5  $\text{mg.l}^{-1}$ ).

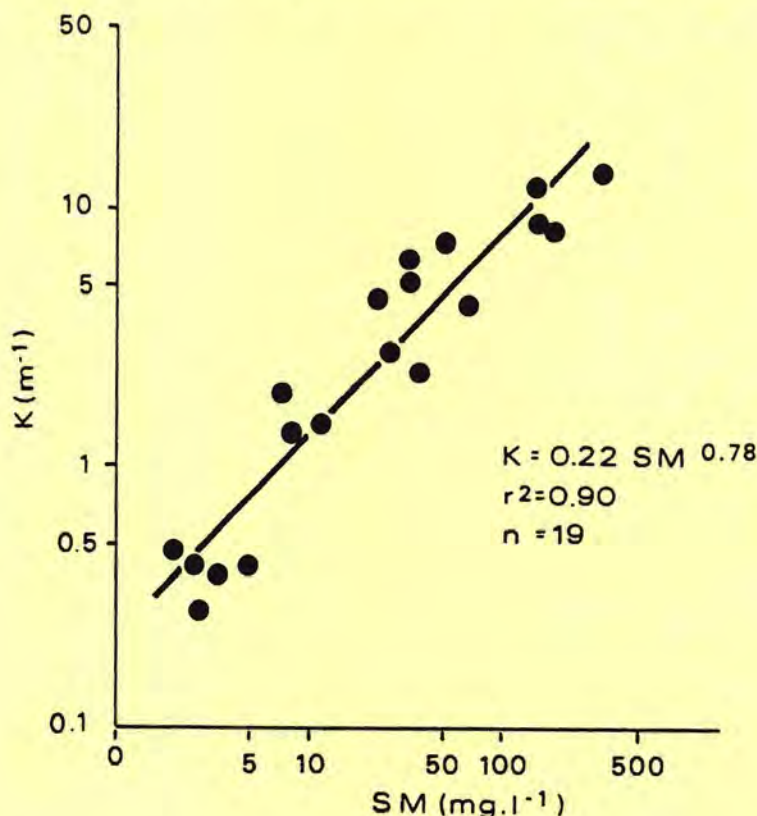


Fig. 6. Relationships between attenuation coefficient ( $k$ ) and suspended matters (SM) in Morlaix estuary.

The laboratory evaluation of the percentage  $P$  of light attenuation by suspended matter ( $P \% = 100 k_s/k_r$ ) shows that in estuarine waters of Morlaix, the particulate matter is responsible for about 90 % of the light attenuation when suspended matter concentration is greater than 10  $\text{mg.l}^{-1}$  (fig. 7). In seawater, where suspended matter concentration is less than 5  $\text{mg.l}^{-1}$ , this percentage  $P$  is still between 60 and 80 % ; in the fresh riverine water, dissolved organic matter also contributes to light attenuation and the proportion  $P$  of attenuation by suspended matter is about 73 %.

These results show that, in the coastal zone, the main factor of light attenuation is particulate matter, resuspended by waves or tidal currents.

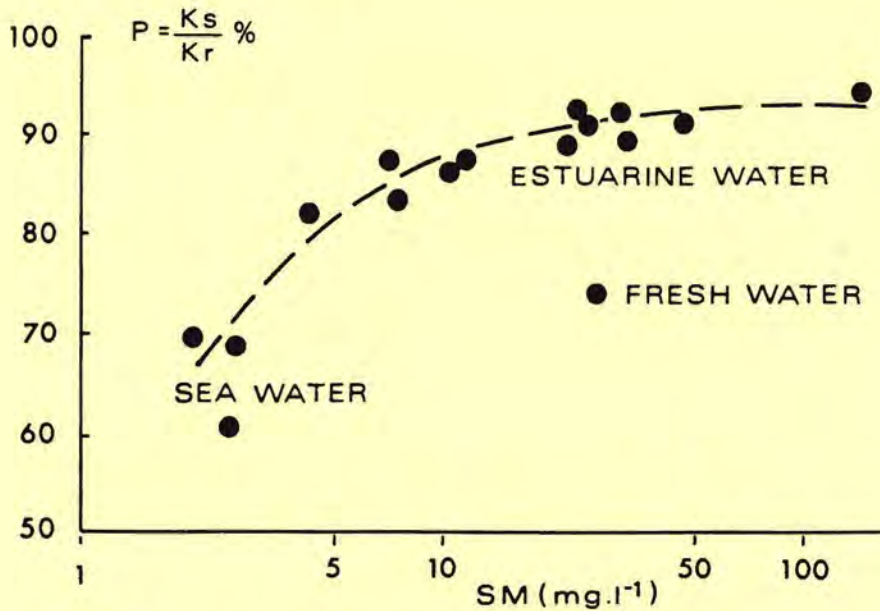


Fig. 7. Percentage of light attenuation by suspended matter - Morlaix estuary.

Results of bacteria survival experiments carried out in the English Channel and on Mediterranean coasts enable the calculation of a relationship between T90 and light energy received by bacteria at different depths in the water column (fig. 8). This relation is close to the one found by Bellair *et al.* (1977) and it shows that T90 increases when light energy is weak; this process seems to be the same in the two kinds of coastal zones.

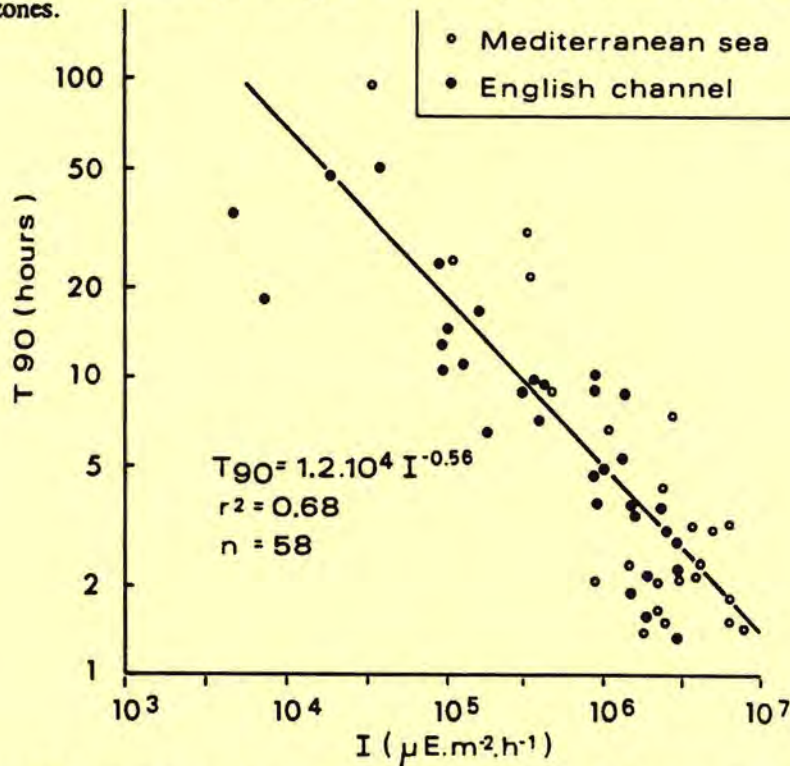


Fig. 8. Relationship between T90 and light energy in the coastal areas.

Nevertheless in the Mediterranean environment, the clearness of water induces, during sunny day, T90 values between 1 and 5 h for subsurface waters ; in the English channel, for the same conditions of incident light and depth, T90 can be about 50 h because of high turbidity of water, especially in an estuarine environment.

This study leads us to take account of turbidity conditions for the estimation of bacterial survival and impact assesment in case of waste-water disposal in the coastal zones (Pommepuy *et al.*, 1991).

### CONCLUSION

The behavior of fecal bacteria is closely dependent on the environment's water or sediment quality. In coastal areas, fecal bacteria and pathogenic bacteria as *Salmonella*, are able to find necessary elements for life : nutrients and osmotic compounds enable them to endure high salinity. On the other hand, suspended matter drastically impairs the visual clarity of water and therefore, by light scattering, protects bacteria from a bactericidal sunlight effect.

On Mediterranean coasts, oligotrophic water and high solar radiation due to the climate greatly diminish the survival time of fecal bacteria in surface water : T90 are very short (< 2 hours) at the surface ; but in deep waters, in the same region, where the wastewaters plume is trapped under the thermocline, the T90 could be longer (several tens of hours).

In the English Channel, waters and sediments are rich in organic matter ; in addition the cloudy system and high turbidity significantly increase fecal bacterial survival : T90 may be very long, from several tens to several hundreds of hours.

### REFERENCES

- Bellair, J.T., Parr-Smith, G.A. and Wallis, I.G. (1977). Significance of diurnal variations in fecal coliform die-off rates in the design of ocean outfalls. *Journal WPCF*, 77, 9, 2022-2030.
- Bonnefont, J.L., Martin, Y.P. & Guinnet, B. (1990). Etude expérimentale de la décroissance des bactéries fécales en milieu marin, quantification, facteurs impliqués. *Wat. Research*, 24, n° 3, 267-273.
- Brisou, J.F. & Denis, F.A. (1978). Hygiène de l'environnement maritime. Masson (Eds) Paris. 218 p.
- Brown, C.M., Eilwood, D.C. and Hunter, J.R. (1977). Growth of bacteria at surfaces : influence of nutrient concentration. *FEMS microbiology Letters*, 1, 163-166.
- Characklis, W.G. (1981) Microbiol fouling : a process analysis. In : Fouling of heat transfer equipment. E.F.C. Somerscales and J.G. Knudsen (Eds). Hemisphere, Washington D.C, 251-291.
- Colwell, R.R. (1983). Vibrios in the environment. In : R.L. Metcalf and W.S. Turm (Eds.). A. Volume in Environmental Science and Technology. A Wiley Series of Texts and Monographs.
- Crane, S.R. and Moore J.A. (1986). Modeling enteric bacterial die-off : a review. *Water, Air and Soil Pollution*, 27, 411-439.
- Csonka, L.N. (1981). Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.*, 182, 82-86.
- Delattre, J.M. (1988). Dragages et microbiologie des vases portuaires. Journées des "Cellules Pollutions Marines". Les Sables d'Olonne, 26, 27, 28 avril 1988.
- Erkenbrecher, C.W. (1981). Sediment bacterial indicators in an urban shellfishing subestuary of the lower Chesapeake bay. *Appl. Env. Microb.*, 42, n° 3, 484-492.
- Gameson, A.L.H. and Gould, D.J. (1975). Effect of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria. In : *Discharge of sewage from sea outfalls*. Ed. ALH Gameson. Pergamon Press. N.Y.
- Gerba, C.P. and Mac Leod, J.S. (1976). Effect of sediments on the survival of *E. coli* in marine waters. *Appl. Env. Microbiol.*, 32, 114-120.
- Ghoul, M., Bernard, T. and Cormier, M. (1990). Evidence that *Escherichia coli* accumulates Glycine Betaine from marine sediments. *Appl. En. Microbiol.* 56, n° 2, 551-554.

- Ghoul, M., Dupray, E., Bernard, T., Pommepuy, M. et Cormier, M. (1989). Marine sediments and halotolerance of *E. coli*. Fifth International Symposium on Microbial, Kyoto, 1989, 27 Aug. 1 Sept.
- Goulder, R., Bent, E.T. and Boak, A.C. (1980). Attachment to suspended solids as a strategy of estuarine bacteria. In : Feeding and survival strategies of estuarine organisms. Jones N.V. and Wolff W.J. (Eds.)
- Gudding, R. and Krodstad, O. (1975). The persistence of *E. coli* and *S. typhimurium* in fine grained soil. *Acta. Agric. Scand.*, 25, 285-288.
- Jannasch, M.W. and Pritchard, P.H. (1972). The role of inert particulate matter in the activity of aquatic microorganisms. *Mémoire Institut Italiano di Idrobiologia*, 29 supplément, 289-303.
- Le Guyader, F. (1989). Colonisation bactérienne et implantation de *E. coli* dans le sédiment d'origine littorale. Thèse de doctorat, Université de Rennes 1, 136 p.
- Le Rudulier, D. and Bouillard, L. (1983). Glycine-betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Env. Microb.*, 46, 152-159.
- Marschall, K.C. (1985). Mechanism of bacterial adhesion at solid-water interfaces. In : *Bacterial adhesion*. D.C. Savage and M. Fletcher (Eds). Plenum Press, New-York, 133-161.
- Martin, Y. and Bonnefont, J.L. (1986). Conditions de décroissance en milieu marin des bactéries fécales des eaux usées urbaines. *Oceanis* 12, Fasc. 6, 403-418.
- Measures, J.C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation of nonhalophilic bacteria. *Nature*, 257, 398-400.
- Milne, D.P., Curran, J.C. and Wilson L. (1986). Effects of sedimentation on removal of faecal coliform bacteria from effluents in estuarine water. *Wat. Res.*, 20, n° 12, 1493-1496.
- Munro, P.M., Gauthier, M.J. and Laumond, F. (1987). Changes in *E. coli* starved in seawater or grown in seawater - waste water mixtures. *Appl. Env. Microbiol.*, 53, 1476-1481.
- Nedwell, D.B. and Gray, T.R. (1987). Soils and sediments as matrices for microbial growth in ecology of microbial communities. Symposium 41. M. Fletcher, T.R. Gray and J.G. Gones. (Eds). Cambridge University Press, 22-55.
- Plummer, D.M., Owens, N.J.P. and Herbert, R.A. (1987). Bacteria-particle interactions in turbid estuarine environments. *Continental Shelf Research*, Vol. 7, n° 11/12, 1429-1433.
- Pommepuy, M., Guillaud, J.F., Le Guyader, F., Dupray, E., Cormier M. (1990). Le devenir de la charge bactériologique des sédiments dragués. Actes of International Seminar on the Environmental Aspects of Dredging Activities (Nantes, 27 nov.-1 déc.), 79-92.
- Pommepuy, M., Guillaud, J.F., Martin, Y., Dupray, E., Derrien, A., L'Yavanc, J., Cormier, M. (1991). Le devenir des bactéries en zone Littorale. IFREMER Actes de Colloques 11 "La mer et les rejets urbains". Bendor 13-15 juin 1990.
- Rhodes, M.W. and Kator M. (1988). Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella spp.* in estuarine environments. *Appl. Env. Microb.*, 54, n° 12, 2902-2907.
- Roszak, D.B. and Colwell, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Reviews*, 51, n° 3, 365-379.
- Salomon, J.C. and Pommepuy, M. (1990). Mathematical model of bacterial contamination of the estuary of Morlaix (France). *Wat. Res.*, 24, 983-994.
- Strom, A.R., Falkenberg, P. and Landfald, B. (1986). Genetics of osmoregulation in *Escherichia coli* : uptake and biosynthesis of organic osmolytes. *FEMS Microb. Rev.*, 39, 79-86.
- Woon Bay Yoon and Rosson, R.A. (1990). Improved method of enumeration of attached bacteria for study of fluctuation in the abundance of attached and free-living bacteria in response to diel variation in seawater turbidity. *Applied Env. Microbiol.*, 56, n° 3, 595-600.

## **11 - Article 8 :**

**Use of the direct viable count (DVC) for  
the assessment of survival of *E. coli* in  
marine environments**

## USE OF THE DIRECT VIABLE COUNT (D.V.C.) FOR THE ASSESSMENT OF SURVIVAL OF *E. COLI* IN MARINE ENVIRONMENTS

E. Dupray\*, M. Pommepuy\*, A. Derrien\*, M. P. Caprais\*  
and M. Cormier\*\*

\* *Laboratoire de Microbiologie, IFREMER, Centre de Brest, BP 70, 29280 Plouzané, France*

\*\* *Laboratoire de Microbiologie, Pharmaceutique, UER Médicales et Pharmaceutiques, Avenue du Prof. L. Bernard, 35043 Rennes Cedex, France*

### ABSTRACT

The survival of the enterotoxigenic *Escherichia coli* H 10407 was observed in different marine seawaters, both *in situ* and *in vitro* by use of dialysis chambers and microcosms, exposed and not exposed to light. Survival was monitored during several days by measurement of plate counts (culturable bacteria), direct viable counts with yeast extract and nalidixic acid (DVC : viable bacteria), and acridine orange direct counts (total bacteria).

Without light, culturable *E. coli* counts decreased slowly (1.5 log unit), whereas viable and total bacteria counts remained almost the same through 8 days. When light stress emphasized the sea-water stress, the difference between culturable and viable counts increased from the very first two days (4 log units). In all the experiments, the number of viable bacteria remained very high. On the other hand, one experiment using dialysis chambers held in a turbid and brackish estuarine water showed no marked decrease in the initial counts. This better survival was probably due to the presence of organic matter. So culturability and viability of *E. coli* can change according to its environment. And because of the consequences for sanitary monitoring of seawaters, it must be kept in mind that viability of *E. coli* can be preserved within several days, in drastic conditions.

### KEYWORDS

*E. coli*; seawater; survival; solar light; estuarine water; viability.

### INTRODUCTION

The behaviour of enteric bacteria discharged in the environment by sewage treatment plants is of sanitary importance. When exposed to nutritional or environmental stresses (salinity, temperature...), these bacteria can reduce their metabolism to different degrees (Roszak and Colwell, 1987a), and evolve towards death through different stages of viability. Different techniques can be used to monitor the survival of allochthonous bacteria in hostile environments : measurement of the metabolism, of the enzymatic activity, rate of substrates uptake and respiration (in Roszak and Colwell, 1987b). A simple and original method was developed by Kogure *et al.* (1979) to estimate the count of viable bacteria in seawater. The samples are incubated with yeast extract (providing nutrients) for a short period of time, and then nalidixic acid is added, promoting growth with inhibition of the cell division. The microscopic examination of the acridine orange



stained samples shows elongated bacteria (the viable ones), versus the small dead bacteria. Nevertheless, the effectiveness of this technique is limited to the gram-negative bacteria.

This viable count of bacteria is very often higher than the culturable count, and this phenomenon of viable but no more culturable bacteria has been described in seawater (Xu *et al.*, 1982; Grimes and Colwell, 1986), in river water (Roszak *et al.*, 1984), and in drinking water (Byrd *et al.*, 1991). In the study reported here, we tested the ability of *E. coli* to survive in four different marine environments by employing the DVC technique, the culture on agar plate and the epifluorescence technique. Experiments were carried out using both seawater microcosms and diffusion chambers held in three different locations of the French Atlantic coast.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strain.** The test strain was the enterotoxigenic *E. coli* H 10407 from Evans' isolated (kindly provided by Pr. Joly, Univ. Clermont-Ferrand, France). The strain was cultured in a tryptic-soy broth (OXOID), for 18 h at 37 °C, and then washed three times in sterile saline solution (0.9 %). The final suspension was inoculated either into the microcosms, or into the diffusion chambers.

**Microcosms.** Two microcosms were prepared using 4 liters-flasks containing 2 liters of filtered (0.22 µm) natural seawater sampled on the north coast of Brittany (Bay of Morlaix, France). After inoculation with *E. coli*, they were maintained in the dark, at 15 °C, with gentle agitation. The results presented are the mean of the enumerations on the 2 microcosms.

**Diffusion chambers.** The technique has been previously described in Salomon and Pommepuy (1990). Three experiments were carried out: in the Bay of Morlaix (Brittany, France), in a small tidal estuary, the Dourduff (Brittany, France), and near Granville, in the west Cotentin coast (France). The characteristics of the water in each site are reported in table 1. The diffusion chambers were immersed at approximately 0.3 m depth, in order to establish the sunlight effect. A dark control chamber was also used in the west-Cotentin experiment.

TABLE 1 Characteristics of the *in situ* experiments with diffusion chambers

	Temperature °C	Salinity ‰	Turbidity mg/l	Dissolved organic carbon mg/l
Bay of Morlaix	9	34	2	0.5
Dourduff estuary	8	0 → 15	10 → 50	5
West Cotentin	12	34	1.5	ND*

ND\* = not determined.

**Determination of bacterial counts.** Culturable bacteria were recovered on Drigalski agar (OXOID), incubated 18 h at 37 °C. The results are expressed as Units Forming Colony (UFC). Viable bacteria were enumerated using the Direct Viable Count (DVC) (Kogure *et al.*, 1979): yeast extract (0.025 % final concentration) and nalidixic acid (0.14 % final concentration) were added to the sample. After incubation, the bacteria were recovered by filtration on 0.22 µm filters (Nuclepore), and stained with acridine orange. The filters were examined by epifluorescence microscopy. Total bacteria were enumerated by the acridine orange direct count (AODC) method (Hobbie *et al.*, 1977)

## RESULTS AND DISCUSSION

**Seawater in the dark:** when exposed to natural sterile seawater, in the dark, the population of *E. coli* declined slowly (fig. 1). Culturable counts displayed the largest decrease (2.5 log units within 14 days), whereas viable cell counts measured by the DVC method were almost 1 log unit higher. The total count, including culturable, viable and intact dead bacteria, remained constant throughout the experiment. The stresses which occurred in this case were osmotic and nutritional ones, but they might allow a good survival of *E. coli*.

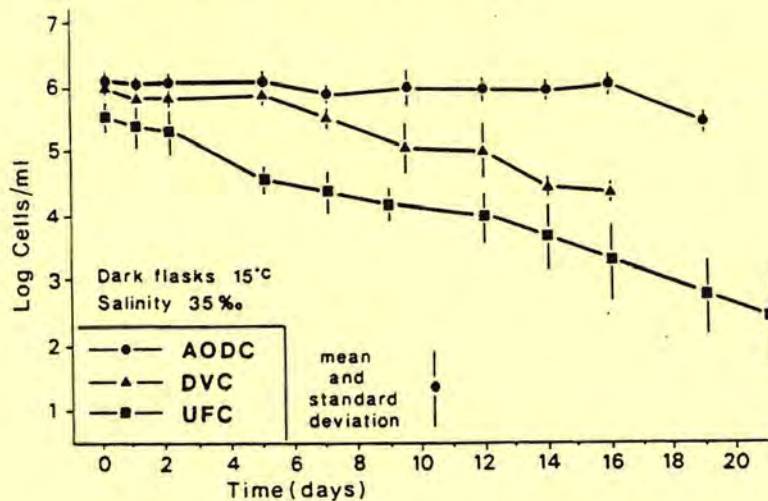


Fig. 1. Survival of *E. coli* in sterile seawater microcosms (AODC : total count ; DVC : viable count ; UFC : culturable count).

These results are in good agreement with those of Roszak and Colwell (1987a), who worked on the same strain of *E. coli*. But we will see in the next experiments that the survival of *E. coli* can greatly vary depending on the quality of the seawater. Comparisons with other investigations are quite difficult and must be very careful.

**Seawater and solar light :** the diffusion chambers used in *in situ* experiments were illuminated by natural solar light. The results of two experiments are presented in fig. 2. The culturable counts of *E. coli* dramatically decreased within a few days. A plateau was observed during the night, but as soon as the sun rose, the bacterial population declined.

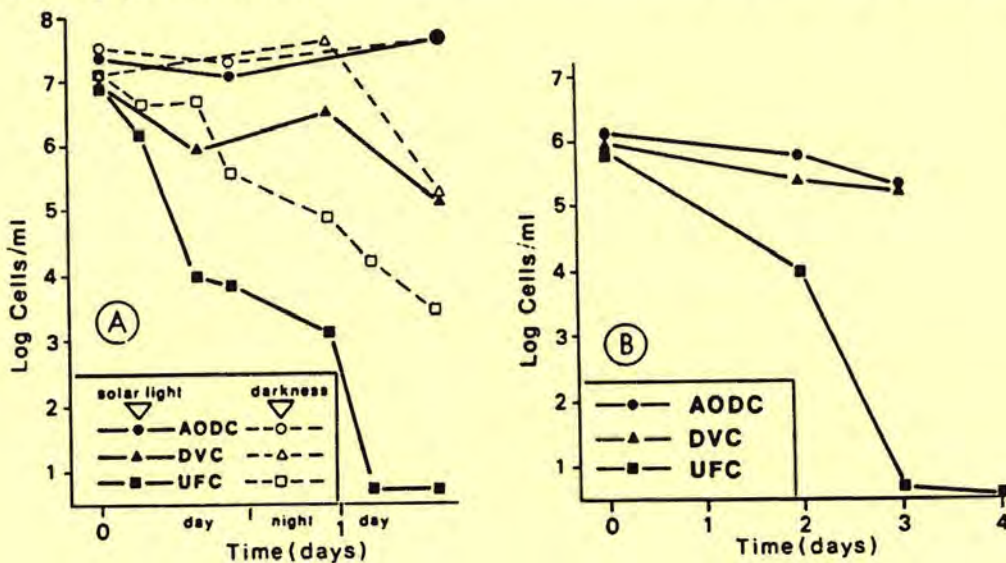


Fig. 2. Survival of *E. coli* in diffusion chambers held on the west Cotentin coast (A) and in the bay of Morlaix (B).

The difference between culturable counts in the illuminated chamber and in the dark one was about 3 log units after 35 h of exposure. The intrinsic seawater stress occurred in the dark chamber. It is interesting to

note that the viable counts showed only a slight decrease, in both chambers, and that the total counts were constant, indicating that dead bacteria were not disintegrated. Thus, when the light stress emphasized the seawater stress, *E. coli* dropped to non-culturability within a few hours. Previous studies have shown such a phenomenon induced by the solar light (Chamberlin and Mitchell, 1978; Fujioka *et al.*, 1981; Mc Cambridge and Mc Meekin, 1981), but only a few have demonstrated that bacterial viability remained. However, Barcina *et al.* (1990) showed that  $^{14}\text{C}$ -glucose uptake still occurred when *E. coli* was exposed to seawater.

**Estuarine water:** this fourth experiment was located in a small tidal estuary. The survival of *E. coli* in this brackish water was quite different from those in seawater (fig. 3).

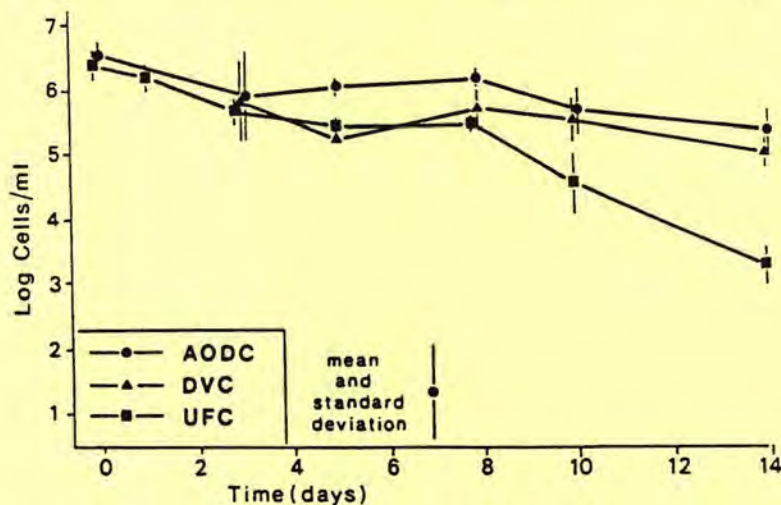


Fig. 3. Survival of *E. coli* in diffusion chambers held in the Dourduff estuary.

The initial count remained constant for 8 days, either for culturable, viable or total cells. Then, only plate counts exhibited a slight decrease (2.5 log units at day 14). Turbidity is likely responsible for this good survival, both stopping sunlight and supplying organic matter and nutrients which could explain the high rate of culturable bacteria. Such a difference between clear and turbid waters has been described by Pommepuy *et al.* (1992).

### CONCLUSION

The results presented here confirm that the survival of *E. coli* discharged in marine coastal areas can be very different depending on the characteristics of the environment. The culturability can be dramatically reduced, especially when solar light penetrates the water. But in the four marine environments tested, the viability of *E. coli*, measured by the DVC method, remained at a very high level. The persistence of this viability, even when bacteria become non-recoverable on classic agar plates, is important for sanitary examinations of seawater. Bacterial enumeration by standard methods can yield false counts and the question is still set: is the potential pathogenicity preserved?

### REFERENCES

- Barcina, I., Gonzalez, J.M., Iriberry, J. and Egea, L. (1990). Survival strategy of *E. coli* and *E. faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 189-198.
- Byrd, J.J., Xu, H.S. and Colwell, R.R. (1991). Viable but non culturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 875-878.

- Chamberlin, C.E. and Mitchell, R. (1978). A decay model for enteric bacteria in natural waters. In : Water Pollution Microbiology, R. Mitchell (eds.), New-York, vol. 2, 325-348.
- Fujioka, R.S., Hashimoto, H.H., Siwak, E.B. and Young, R.H.F. (1981). Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 690-696.
- Grimes, D.J. and Colwell, R.R. (1986). Viability and virulence of *E. coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. FEMS Microbiol. Letters, **34**, 164-165.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. (1977). Use of Nuclepore filters for counting bacteria by epifluorescence microscopy. Appl. Environ. Microbiol., **33**, 1225-1228.
- Kogure, K., Simidu, V. and Taga, N. (1979). A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. Can. J. Microbiol., **25**, 415-420.
- Mc Cambridge, J. and Mc Meekin, T.A. (1981). Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of fecal and other bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 1083-1087.
- Pommepuy, M., Guillaud, J.F., Dupray, E., Derrien, A., Le Guyader, F. and Cormier, M. (1992). Enteric bacteria survival factors. Wat. Sci. Tech., **25** (12), 93-103.
- Roszak, D.B., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. (1984). Viable but nonrecoverable stage of *S. enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol., **30**, 334-338.
- Roszak, D.B. and Colwell, R.R. (1987a). Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 2889-2893.
- Roszak, D.B. and Colwell, R.R. (1987b). Survival strategies of bacteria in the natural environment. Microbiol. Rev., **51**, 365-379.
- Salomon, J.C. and Pommepuy, M. (1990). Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary (France). Wat. Res., **24**, 983-994.
- Xu, H.S., Roberts, N., Singleton, F.L., Attwell, R.W., Grimes, D.J. and Colwell, R.R. (1982). Survival and viability of non culturable *E. coli* and *V. cholerae* in the estuarine and marine environment. Microb. Ecol., **8**, 313-323.

**III - Article 9 :**

**Retention of enteropathogenicity by viable  
but nonculturable *Escherichia coli* exposed  
to seawater and sunlight**

**RETENTION OF ENTEROPATHOGENICITY BY  
VIABLE BUT NON CULTURABLE *ESCHERICHIA COLI* EXPOSED TO  
SEAWATER AND SUNLIGHT**

Pommepuy M.<sup>1\*</sup>, M. Butin<sup>2</sup>, A. Derrien<sup>1</sup>, M. Gourmelon<sup>1</sup>  
R.R. Colwell<sup>3</sup> and M. Cormier<sup>2</sup>

<sup>1</sup> IFREMER Laboratoire de Microbiologie, DEL, BP 70, 29280 Plouzané France ; <sup>2</sup> Faculté de pharmacie, Université de Rennes, Av. du Prof. L. Bernard, 35043 Rennes, France ; <sup>3</sup> University of Maryland Biotechnology Institute, 4321 Hartwick Rd., Room 550, College Park, MD 20740, USA.

Running title: Enterogenicity of *E. coli* in seawater.

Accepted in: Applied and Environmental Microbiology (June 1995).

\* Corresponding author: phone 33.98.22.43.39 - Fax: 33.98.22.45.94  
E. Mail address: pommepuy@ifremer.fr

## ABSTRACT

The effect of natural sunlight on culturability and persistence of pathogenicity of *Escherichia coli* was examined in the field, i.e., in Morlaix Estuary, France, using an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli* H10407. Results showed that *E. coli* responds to the estuarine diurnal solar cycle by entering the viable but nonculturable state upon exposure to sunlight. That is, DVC counts remained stable without significant change, but the *E. coli* cells remained fully culturable only in control chambers in the dark, i.e., without solar irradiation,. The effect of sunlight on the pathogenicity of *E. coli* H10407 was studied, using both the rabbit intestinal loop assay (RILA) and GM1-ELISA, a sensitive procedure for testing for production of enterotoxin. Results of the GM1-ELISA demonstrated that strains of *E. coli*, after exposure to sunlight and entering the viable but nonculturable state, retained pathogenicity, producing enterotoxin. The GM1-ELISA is concluded to be more sensitive than the rabbit intestinal loop assay for analysis of enterotoxin in natural water samples.

## INTRODUCTION

Recently, evidence for retention of viability of human pathogens entering the aquatic environment despite inability to be cultured, has accumulated (18). The assumption has been that human pathogens and indicator organisms "die-off" (4), however it has been shown that such cells undergoing "die-off" remain intact and can retain plasmids associated with virulence (3, 8), enteropathogenicity (5, 10) and other functions (21) as well. Because of the increasing use of estuaries, coastal waters, and the open ocean as a repository for domestic wastes, the question with respect to the safety of such practices can be raised, especially in light of the ability of pathogens entering seawater to retain viability (7). Direct detection of *Salmonella* in waste water and estuarine samples from which *Salmonella* could not be isolated in culture (13), indicates a closer examination of the persistence of pathogens in the marine environment is warranted and further, that methods for their detection, other than plate counts, should be employed. Long term survival of indicator organisms, e.g. *Clostridium perfringens* (2, 15) at a New York City offshore site, where sewage sludge is discharged from barges towed to a deep ocean dump site, has been demonstrated (2). Thus, potential virulence of human pathogenic bacteria and viruses persisting in the ocean becomes relevant (17, 24).

The objective of the study reported here was to examine the effects of sunlight, under normal diurnal cycles, on pathogenicity of *E. coli*, in view of the currently accepted notion that exposure to sunlight and elevated salinity of seawater offers a "purification" procedure, as shown by Barcina *et al.* (1) and Davies *et al.*. The persistence of *E. coli* pathogenicity has previously been reported to occur after exposure in seawater (5, 10) as well as fresh water (22), but not yet reported after exposure to both seawater and sunlight.

## MATERIALS AND METHODS

### *Bacterial Strains and media*

*Escherichia coli* strains H10407 (LT, ST, CFA/I) (7) and HB101 were provided by B. Joly, Faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand, France. Exponential phase cultures were prepared in 100 ml Trypticase Soy Broth (TSB) BBL, Cockeysville, MD) incubated for 24 hr at 37 °C. After harvesting by centrifugation, the cells were washed three times in autoclaved salt solution (9 g/l NaCl). Culturable counts were obtained by plating appropriate dilutions on Drigalski agar (Oxoid, UK) and incubating the plates for 24 hr at 37 °C. Estimates of viable cells were also made by direct counts of seawater samples (see below), to which were added 0.025 % (W/V) yeast extract (Merck, Darmstadt, Germany) and 0.012 % nalidixic acid (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), following the method of Kogure *et al.* (15).

For GM1-ELISA analyses, Mundell's Casamino Acids Medium (MCA) (16) was employed.

### *Antiserum*

Antiserum to *V. cholerae* toxin was produced, as described by Svennerholm *et al.* (24). Adult rabbits (Fauve de Bourgogne, France) received three subcutaneous immunizations of 25 mg of purified cholera toxin (CT) at two week intervals, with the initial two immunizations employing Freund complete adjuvant (FCA) as diluent. Intracardiac puncture was performed one week after the last injection.



The serum was freeze-dried in portions and stored at - 20 °C until needed, when it was dissolved in saline prior to use.

### *Microcosm experiments*

Experiments were carried out using one-liter flasks, containing *ca.* 800 ml samples of water collected at high tide from the surface water of the Morlaix Estuary (34.8 ‰ salinity). The seawater samples were sterilized by passage twice through 0.22 µm pore size, 47 mm diameter membrane filters (Millipore Corporation, Bedford, MA). *E. coli* H10407 was inoculated into each flask to a concentration of *ca.* 10<sup>6</sup> cells/ml. Three of the flasks were exposed to sunlight in a plexiglass water bath at 16 ± 2 °C and three other flasks were also placed in the waterbath, but in the dark, i.e., covered with sterile aluminum foil. After incubation for 3, 6, 9, 22, 26, 32 and 46 h *ca.* 10 ml volumes were removed from each flask for bacterial counts, using the methods described above.

Field studies were also carried out in the Morlaix Estuary, France, during June, 1988, using membrane chambers, as described by Fliermans and Gordon (9). The 600 ml membrane chambers were washed with 95 % (v/v) ethanol and air-dried, after which vacuum was applied. The chambers were filled with filter-sterilized seawater and equilibrated immediately after addition of the seawater, by submersion at the test site. At the Morlaix estuary site where the experiments were done, the water temperature (average) was 15 °C during the night and 16 °C during the day and the salinity was 35 ± 0.5 ‰.

Both quartz and plexiglass chambers were submerged 0.3 m below the surface, supported by flotation buoys. Bottom experiments were conducted using four plexiglass chambers suspended 0.5 m from the bottom in water of *ca.* 9 ± 3 m depth.

The entire assembly was lowered into the Morlaix Estuary at the test site, but immediately prior to submersion, the chambers were inoculated with 1 ml of a suspension of *Escherichia coli* H10407 to a final concentration of 2.5 x 10<sup>6</sup> cells/ml.

For bacterial enumerations, samples were collected immediately after inoculation, and at 16, 30, 40, 53, and 57 hr, from the bottom chambers, and at 3, 6, 9, 12, and 34 hr from the surface chambers. The samples (10 ml) were collected using a sterile 25 ml syringe.

Upon termination of each experiment carried out in the field, *ca.* 200 ml of sample was removed from the chambers for the rabbit intestinal loop assay, as follows. All samples used in the experiments were transported to the laboratory on ice, i.e. at *ca.* 4 °C, with total time elapsing from collection to analysis being 6 hr or less. In the laboratory, rabbit loops were inoculated with 1.0 ml of sample, without concentration, as follows. Sample 1 comprised sterile seawater in an uninoculated surface chamber, sample 2 was seawater from the bottom chamber, and sample 3 seawater from a surface chamber. Sample 1 was a 1/1000 saline dilution of broth used in the experiments, serving as a control.

### *Light irradiance*

Light irradiance was measured using a submersible quantum sensor (LI-COR), permitting detection of radiation in the 400-700 nm range. Light irradiance was measured in the field, just below the surface and just above the bottom, at the time of sample collection. In the laboratory studies, light irradiance was monitored in the uninoculated flask serving as control.

### ***Bacterial enumeration***

Culturable bacteria were enumerated, as described above. In addition, acridine orange direct counts (AODC) were performed (11), as well as direct counts of viable cells (DVC) (14). For DVC, cells were incubated in the presence of yeast extract and nalidixic acid, and subsequently stained, using acridine orange for counting by epifluorescent microscopy, as described above. Only those cells demonstrating elongation and a reddish-orange fluorescence were counted. DVC and AODC values were calculated for each sample, each value representing the mean of 250 cells or 50 fields.

The counts from spread plates, prepared in duplicate, were arithmetically averaged. When several flasks or chambers were used in an experiment, mean and standard error were calculated for the flask or chamber replicates.

### ***Rabbit intestinal loop assay***

Ligated intestinal loops were prepared and inoculated, using male Fauve de Bourgogne rabbits weighing an average of 2.0 kg. The rabbits were maintained without food for 48 h prior to surgery. Employing aseptic techniques and general anesthesia (ethyl carbamate), a midline incision of *ca.* 15 cm was made along the abdomen, through muscle and peritoneum. The ileum was externalized and four test loops, beginning just above the stomach and 10 cm in length, were tied and separated by three control loops 5 cm in length. The inoculum, 1.0 ml volume, was injected into test loops adjacent to the tie nearest to the appendix, with the second tie isolating the site of inoculation.

The abdominal cavity was filled with sterile NaCl solution (0.9 % w/v) to prevent desiccation during surgery. Temperature (39 °C) and anesthesia were carefully controlled during incubation. Rabbits were sacrificed after 7 hr, the abdomen reopened, externalized, and examined for fluid accumulation (weight/length). A sample of fluid was collected from each loop and tested directly, using GM1-ELISA and again after addition of 1-7ml Casamino Acids Medium (16), following incubation for 24 hr at 37 °C, with shaking.

### ***GM1-ELISA procedures***

Microtiter ELISA plates (Sterilin, Teddington, England) were coated with 0.2 ml per well of 2 µg/ml ganglioside (GM1) in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated at room temperature (*ca.* 20 °C) for 18 hr. The coated plates were stored at 4 °C for up to 1 month before use. After washing 3 times in PBS, the remaining binding sites were blocked by incubating the plates with 1 % (w/v) bovine serum albumin (BSA) in PBS at 37 °C for 1 hr (0.2 ml/well). The plates were washed 3 times with PBS containing 0.2 % (v/v) Tween 20, after which the samples were added (0.2 ml/well) and incubated for 90 mn at 37 °C. After a second washing procedure using PBS-Tween 20, 0.2 ml of rabbit serum (anti-cholera toxin (CT) diluted 1: 1000 in a solution of PBS-Tween - 0.5 % BSA) was incubated in wells under the same conditions. After a final washing with PBS-Tween, 0.1 ml of p-nitrophenyl phosphate (pNPP) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) diluted 1 mg/ml in substrate buffer was added to all wells and incubated 45 mn. at room temperature. Optical densities (OD) were measured using a spectrophotometer at a wavelength of 405 nm.

## RESULTS AND DISCUSSION

The effect of solar irradiation on the viability, i.e., platability, of *E. coli*, as measured in microcosms and in membrane chambers in the field is shown in Figs. 1 and 2. The measurements graphically displayed in Figs. 1A and 2A represent light intensity expressed as  $\mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ , measured in the laboratory or in the field, the latter just below the surface.

*E. coli* cells exposed to measured quantities of sunlight showed stable DVC and AODC counts, but plate counts (culturable cells) decreased from  $2 \times 10^6$  cells/ml to no detectable culturable cells after exposure for 26 hr (Fig. 1B). Plate counts of cells incubated in the dark did not decrease (fig. 1C). However, as soon as exposure of these cells to light occurred, the plate counts decreased, but, in both cases, the AODC and DVC did not change significantly. Plate counts of samples of surface water in chambers suspended in the Morlaix Estuary on June 20, 1988, showed a rapid decrease with exposure to sunlight (Fig. 2B) whereas plate counts for samples from chambers incubated at the bottom remained stable, i.e., the number of culturable bacteria did not change significantly (Fig. 2C).

Light intensity during the day was significant, both in June and October ( $> 1000 \mu\text{Em}^{-2}\text{S}^{-1}$ ), for surface samples. In the field, as previously reported (17), light intensity just above the bottom was significantly less ( $< 100 \mu\text{E m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) with suspended and/or dissolved organic matter contributing to light absorption and, therefore, stability of the plate counts because of decreased light penetration.

### *Rabbit intestinal loops*

Results of analyses of fluid accumulation in the rabbit loops are given in Table 1. Fluid accumulation associated with seawater was sufficiently extensive that it masked toxigenic activity of the cells, a phenomenon reported by Johnson and Calia (12) to occur in experiments carried out using *Vibrio parahaemolyticus* suspended in seawater.

### GM1-ELISA

Fluid in loops of the rabbit (R2) was examined by GM1-ELISA, as described in the Materials and Methods, and results are given in Table 2. In the direct assays, samples 2, 3 and 4, were tested after the *E. coli* strain had been incubated in the loops for 7 hr, yielded positive results in GM1-ELISA, whereas the sterile sample (1) was negative. Assays done after loop contents had been cultured in MCA broth for 24 hr at  $37^\circ\text{C}$ , with shaking, showed only sample 2 yielding a positive result.

The seawater control (sample 1) produced very slight, but measurable fluid accumulation in rabbit intestinal loops. In the study reported here, inter-loop leakage contamination did not occur and was not, therefore, responsible for the observed fluid accumulation in the loops. Indeed, examination by GM1-ELISA of the interloops immediately upon inoculation and after inoculation were negative for *E. coli* H10407. Thus the effect of seawater is concluded to account for the very slight accumulation of fluid (12), although temperature may also have an effect (see below).

*E. coli* H10407, after exposure to seawater, i.e. samples 2 (culturable) and 3 (non culturable) was able to produce toxine (LT) in rabbit intestinal loops, confirmed by GM1-ELISA. See

Table 2. Thus it is concluded that *E. coli* exposed to seawater retains the ability to produce enterotoxin, whether culturable or nonculturable.

Whether nonculturable *E. coli* cells producing enterotoxin represent only a few active cells or a total population of slowly metabolizing cells is addressed as follows. If a few actively metabolizing cells were present, they should have been recoverable on Drigalski's medium but were not. Roszak and Colwell (19) using radioautography, demonstrated that metabolic activity can be observed for cells incubated with radiolabelled substrate and such activity was not the response of only a few actively metabolizing cells amongst a viable but nonculturable population but, instead, that of the majority of cells. Similarly, in this study, the DVC data support the interpretation that the bulk of the cells were metabolically active and, therefore, capable of producing enterotoxin.

*E. coli* H10407 was dominant among the intestinal microorganisms, in the inoculated rabbit loops, determined by GM1-ELISA after incubation. It is important to note that the intestinal flora of the rabbit prior to preparation of loops and inoculation with *E. coli* H10407 was tested and found negative for enterotoxigenic *E. coli*. Only toxin produced by the inoculated cells was detected by GM1-ELISA. Furthermore, in the case of sample 3, the loop fluid tested by GM1-ELISA was positive for toxin, indicating that *E. coli* in the viable but nonculturable state retained pathogenicity. However, *E. coli* H10407 in the viable but non-culturable state did not revert to culturability in numbers sufficient to dominate the culturable intestinal flora after incubation for 7 hr, i.e., to be detectable by plating on selective media. The saline suspension of *E. coli* H10407 cells (sample 4) incubated for 3 days at 20 °C, a lower temperature employed to approximate more closely environmental conditions of the Morlaix estuary, produced detectible LT, but little fluid accumulation. Similar results were observed by Singh *et al.* (22) for cells suspended in drinking water. However, in this study, toxin was produced by nonculturable *E. coli* cells suspended in physiological saline after the cell suspension had been incubated for 3 days at 20 °C.

Based on results of these and earlier studies (10), it is concluded that enteropathogenic *E. coli* discharged into seawater in estuaries and coastal waters can retain enteropathogenicity. Since results of studies employing *Helicobacter pylori* indicate that cells of *H. pylori* exposed to river water in laboratory microcosms for up to two years can retain viability and selected properties associated with pathogenesis (21), the phenomenon reported here is concluded not to be associated only with *E. coli*. Furthermore, the results reported here are compatible with findings of Barcina *et al.* (1) and Davies and Evison (6) who carried out laboratory experiments with natural and artificial light. In this study, field experiments were done in parallel with laboratory experiments showing effects of exposure of *E. coli* H10407 to natural sunlight in seawater and conversion of cells to the viable but nonculturable state, with retention of enterotoxigenicity, were the same as *in situ*, i.e., would occur upon discharge to an estuary of run-off or sewage containing enterotoxigenic *E. coli*.

The "die-off" ascribed to natural sunlight (4) more appropriately may be viewed also as inducing the viable but nonculturable state in many, if not all, cells, rather than "die-off" or death of all cells.

Bacteriological methods employed in the analysis of public health safety of natural waters, especially seawater, must be reassessed if potentially pathogenic bacteria can, not only survive, but retain enterotoxigenicity when not detectible by standard bacteriological culture methods. In addition, accumulation of viable but nonculturable *E. coli* H10407 by shellfish in such waters may pose a potentially serious problem, a possibility that merits further research. It has

frequently been observed that shellfish can contain high culturable fecal coliform counts when the surrounding seawater is sufficiently low in coliform count to be considered safe for shellfish harvesting. Halotolerance of *E. coli* and reduction of light penetration when particulate matter is present have been shown to be responsible for *E. coli* continuing to be culturable for days, weeks, or longer (17, 18, 20). When ingested by shellfish, the *E. coli* and related bacteria may retain culturability when the same bacteria in the surrounding seawater exposed to sunlight may be viable but non-culturable, leading to a disparity between the shellfish and water culturable counts. In light of these considerations, the "die-off" calculation employed by sanitary engineers for measuring the quality of seawater at sewage outfalls may be too simple a measurement, at least in the context of public health. At the minimum, reevaluation of assumptions made in such calculations is needed and detection methods, other than culturing, are needed for accurate measurement of the potential pathogens and/or "indicator" organisms that may be present.

### ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Dr Sam W. Joseph for this critical review of the manuscript. Support of the Thrasher Research Fund and the National Atmospheric and Oceanic Administration (NOAA Grant No. NA16RU0264-01) is gratefully acknowledged.

### BIBLIOGRAPHY

1. **Barcina, I., J.M. Gonzalez, J. Iriberry and L. Egea.** 1990. Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 189-198.
2. **Bothner, M.H., H. Takda, I.T. Knight, R.T. Hill, B. Butman, J.W. Farrington, R.R. Colwell, and J.F. Grassle.** 1992. Sewage contamination in sediments beneath a deep-ocean dump site off New York. *Marine Environ. Res.*, 38: 43-59.
3. **Byrd, J.J. and R.R. Colwell.** 1990. Maintenance of plasmids pBA 322 and pUC 8 in noncultivable *Escherichia coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2104-2107.
4. **Chamberlin, C.E. and R. Mitchell.** 1978. A decay model for enteric bacteria in natural waters. In *Water Pollution Microbiology*. Vol 2. Ed. Mitchell, R. p. 325-368. New York: Wiley.
5. **Colwell, R.R., P.R. Brayton, D.J. Grimes, D.R. Roszak, S.A. Huq and L.M. Palmer.** 1985. Viable, but non culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *Bio Technology*. 3: 817-820.
6. **Davies, C.M. and L.M. Eviron.** 1991. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 265-274.
7. **Desmonts, C., J. Minet, R.R. Colwell and M. Cormier.** 1990. Fluorescent antibody method useful for detecting viable but non culturable *Salmonella spp.* in chlorinated waste water. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1448-1452.

8. **Evans, D.G., R.P. Silver, D.J. Evans, Jr., D.G. Chase and S.L. Gozbach.** 1975. Plasmid-controlled colonization factor associated with virulence in *Escherichia coli* enterotoxigenic for humans. *Infect. Immun.* 12: 656-667.
9. **Fliermans, C.B. and R.W. Gorden.** 1977. Modification of membrane diffusion chambers for deep water studies. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 207-210.
10. **Grimes, D.J., R.W. Attwell, P.R. Brayton, L. M. Palmer, D.M. Rollins, D.B. Roszak, F.L. Singleton, M.L. Tamplin and R.R. Colwell.** 1986. The fate of enteric pathogenic bacteria in the estuarine and marine environment. *Microbiol. Sciences.* 3: 326-329.
11. **Hobbie, J.E., R.J. Daley and S. Jasper.** 1977. Use of nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225-1228.
12. **Johnson, D.E. and F.M. Calia.** 1976. False positive rabbit ileal loop reactions attributed to *Vibrio parahaemolyticus* broth filtrate. *J. Infect. Dis.* 33: 436.
13. **Knight, I.T., S. Shults, C.W. Kaspar, and R.R. Colwell.** 1990. Direct detection of *Salmonella spp.* in estuaries by using a DNA probe. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1059-1066.
14. **Kogure, K., U. Simidu and N. Taga.** 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25: 415-420.
15. **Labelle, R.L. and C.P. Gerba.** 1980. Influence of estuarine sediment on virus survival under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 749-755.
16. **Mundell, D.H., C.R. Antelmo and R.M. Wishnow.** 1976. Factors influencing heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.* 16: 383-388.
17. **Pommepuy, M., J.F. Guillaud, Y. Martin, E., Dupray, A. Derrien, J. L'Yavanc and M. Cormier.** 1990. Le devenir des bactéries en zone littorale. La mer et les Rejets Urbains. Bandor, 13-15, June, 1990. IFREMER, Actes de Colloques 11, 89-100.
18. **Pommepuy, M., J.F. Guillaud, E. Dupray, A. Derrien, F. Le Guyader and M. Cormier.** 1992. Enteric bacteria survival factors. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 12: 93-103.
19. **Roszak, D.B. and R.R. Colwell.** 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2889-2893.
20. **Salomon J.C. and M. Pommepuy.** 1990. Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix Estuary (France). *Water Research.* 24: 983-996.
21. **Shahamat, M.C., C. Paszko-Kolva, U. Mai, H. Yamamoto and R.R. Colwell.** 1992. Selected tryopreservatives for long term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. *J. Clin. Path.* 45: 735-736.

22. **Singh, A.R., R. Yeager and G.A. Mc Feters.** 1986. Assessment of *in vivo* revival, growth and pathogenicity of *Escherichia coli* strains after copper and chlorine-induced injury. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 832-837.
23. **Singleton, F.L., R.W. Attwell, M.S. Jangi and R.R. Colwell.** 1982. Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of *Vibrio cholerae* in aquatic microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1080-1085.
24. **Svennerholm, A.M., M. Wikatröm, M. Luidblad and J. Holmgren.** 1986. Monoclonal antibodies to *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins: neutralizing activity and differentiation of human and toxigenic Lts and cholera toxin. *Med. Biol.* 64: 23-30.
25. **Xu, H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, P.J. Grimes and R.R. Colwell.** 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microbiol. Ecology.* 8: 313-323.

**LEGEND FOR FIGURES****Fig. 1**

Effect of solar radiation on *E. coli* H10407 in filtered surface seawater. (A) light intensity. AODC (▲), DVC (■) and plate counts (●) were calculated for samples collected from flasks incubated in the light (B) or flasks incubated in the dark (C). Standard deviations are indicated by bars.

**Fig. 2**

Effect of solar irradiation on *E. coli* H10407 in membrane chambers. In the Bay of Morlaix (A) light intensity was measured just below the surface (□), AODC (▲) and plate counts (●) were calculated for samples collected from quartz (—) or plexiglass (---) chambers : (B) surface chamber and (C) bottom chamber. Standard deviations are indicated by bars.



Table 1. Fluid accumulation in rabbit loops.<sup>1</sup>

Sample	Treatment	Loop No. (sequence) <sup>2</sup>	Fluid Accumulation	Loop	Fluid Accumulation
1	Seawater without <u>E. Coli</u>	3	0.91 (weak +)	2	0.91 (weak +)
2	<u>E. Coli</u> H10407 LT <sup>+</sup> in bottom seawater chamber	4	0.87 (weak +)	1	1.20 (+)
3	<u>E. Coli</u> H10407 LT <sup>+</sup> in surface seawater chamber	1	0.84 (weak +)	3	0.76 (weak +)
4	<u>E. Coli</u> H10407 LT <sup>+</sup> incubated for 3 days in physiological saline at 20C	2	0.43 (-)	4	0.51 (weak +)

<sup>1</sup> Fluid accumulation is the ratio: weight (g)/length (cm)

<sup>2</sup> Loop number 1 was located just below the stomach

Table 2. Detection of toxin by GM1-ELISA<sup>1</sup>

Sample No.	Treatment	Fluid in loop After 7 Hr.	Fluid in loop after inoculation of loop contents into GM-01 ELISA broth and incubation for 24 h at 37C
1	Seawater without <u>E. coli</u>	0.034 -	0.000 -
2	<u>E. coli</u> H10407 LT <sup>+</sup> in bottom seawater chamber	1.310 +	>2.000 +
3	<u>E. coli</u> H10407 LT <sup>+</sup> in surface seawater chamber	0.139 +	0.000 -
4	<u>E. coli</u> H10407 LT <sup>+</sup> incubated for 3 days at 20C in physiological saline	0.234 +	ND <sup>2</sup>
<u>E. coli</u> HB101 LT <sup>-</sup>	NA <sup>3</sup>	NA	0.029
<u>E. coli</u> H10407 LT <sup>+</sup>	NA	NA	>2.000 +

1

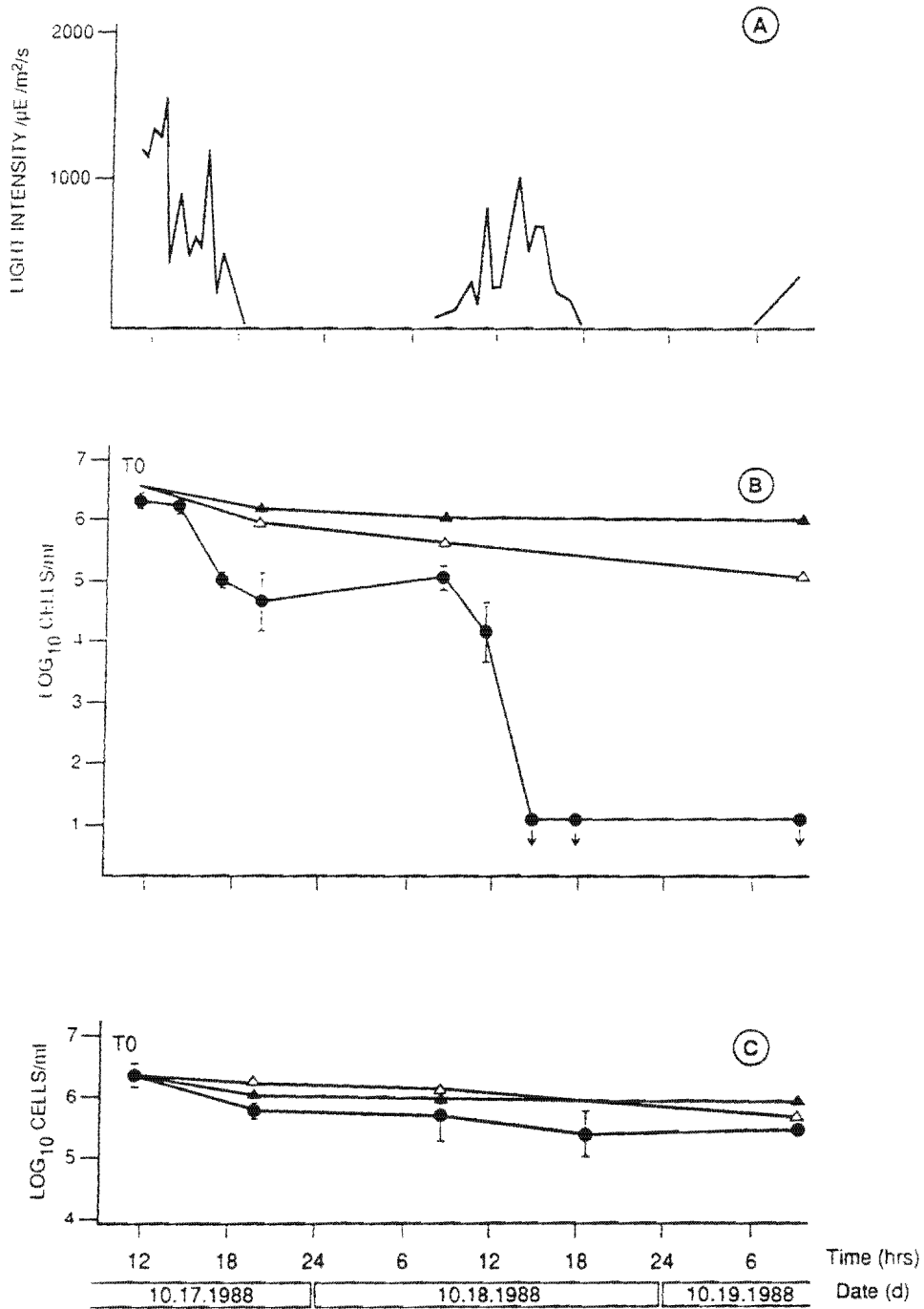
Values represent OD readings for each sample after subtraction of MCA OD. Positive reaction threshold was estimated as 0.100.

2

(ND): not determined

3

(NA): not applicable, i.e., control



**Fig.1**

Effect of solar radiation on *E.coli* H 10407 in filtered seawater. (A) Light intensity. AODC(▲), DVC (△) and plate counts (●) were calculated for samples collected from flasks incubated in the light ( B ) or flasks incubated in the dark ( C). Standard deviations are indicated by bars.

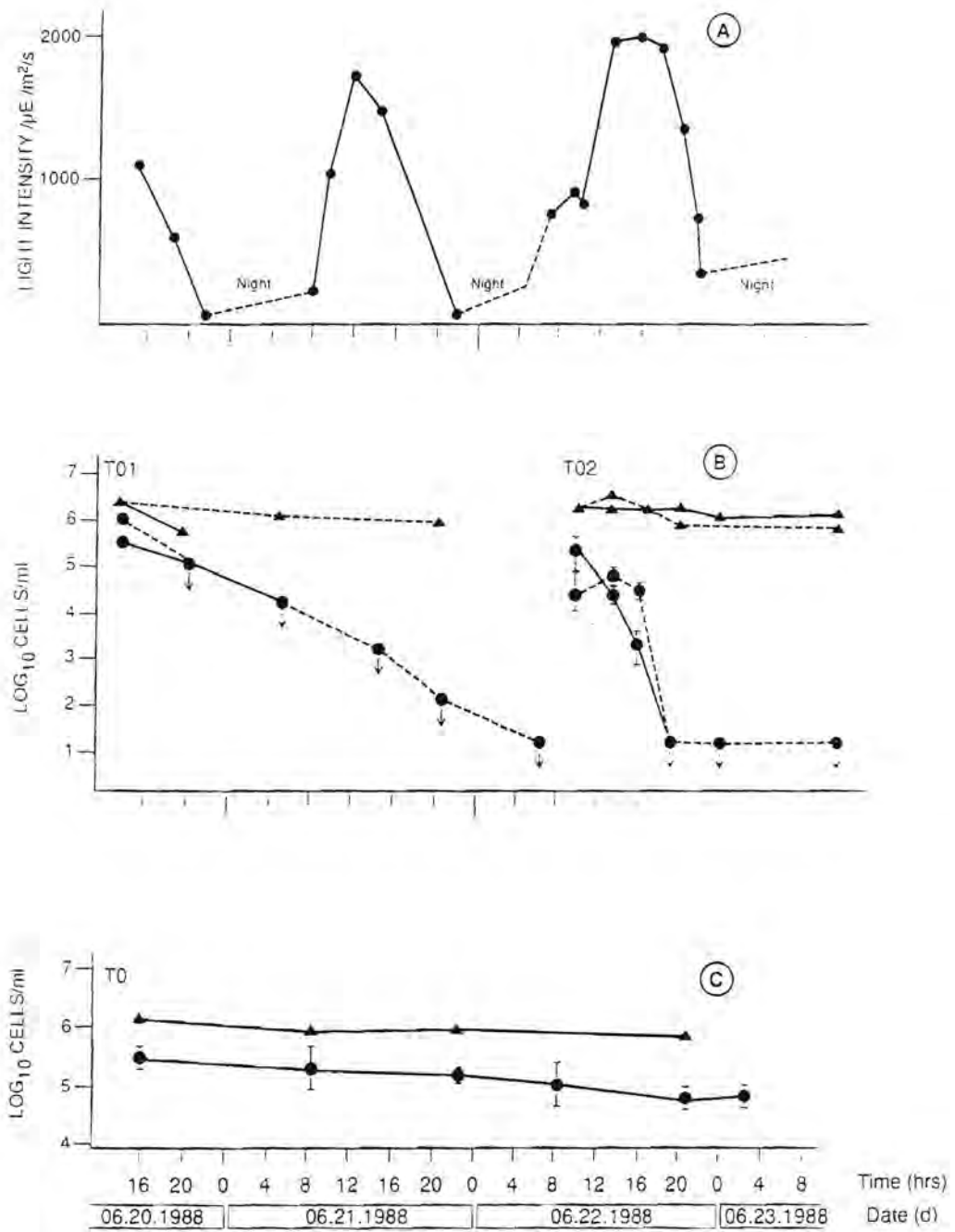


Fig.2

Effect of solar radiation on *E. coli* H 10407 in membrane chambers- Baie of Morlaix. (A) Light intensity was measured just below the surface. AODC(▲), and plate counts (●) were calculated for samples collected from quartz (→) or plexiglass (---) chambers : ( B ) surface chamber and (C) bottom chamber. Standard deviations are indicated by bars.

**IV Article 10 :**

**Visible light damage to *Escherichia coli* in  
seawater : oxidative stress hypothesis**

## Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis

Michèle Gourmelon, J. Cillard<sup>1</sup> and M. Pommepuy

Laboratoire de Microbiologie, IFREMER, DEL, Plouzané, and <sup>1</sup>Laboratoire de Biologie Cellulaire et Végétale INSERM U49, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Rennes, France

4637/07/93: accepted 3 February 1994

M. GOURMELON, J. CILLARD AND M. POMMEPUY. 1994. The effect of visible light on *Escherichia coli* H10407 in seawater microcosms was investigated. Light damage was estimated by loss of colony-forming ability. Illumination of *E. coli* suspended in oligotrophic seawater with visible light at an intensity of about 40 klux caused a drastic decrease of culturable bacteria which turned to a viable but non-culturable state. In seawater *E. coli* exhibited weak metabolic activity as estimated by <sup>3</sup>H methyl-thymidine incorporation in the cell. Visible light did not significantly alter this metabolic activity and did not involve detectable oxidation of lipid membranes as evaluated by gas chromatography analysis of fatty acids. The involvement of oxygen and reactive oxygen species in phototoxicity was studied. A decrease of the toxic effect was observed when *E. coli* was exposed to visible light under anaerobic conditions. Scavengers of reactive oxygen species exhibited variable protective effects.  $\beta$ -Carotene, a singlet oxygen scavenger, and superoxide dismutase were equally ineffective. On the other hand, catalase, which eliminates hydrogen peroxide and thiourea, a hydroxyl radical scavenger, showed a net protection. In addition desferrioxamine B, an iron chelator, was also effective in reducing phototoxicity, probably by preventing hydroxyl radical generation by decomposition of hydrogen peroxide in the presence of iron (Fenton reaction). Therefore, hydrogen peroxide and hydroxyl radical seem to be reactive intermediates of oxygen-dependent (type II) photosensitized reactions.

### INTRODUCTION

Enterobacteria discharged to seawater are known to be responsible for many health and economic problems and for this reason, different factors which reduce the numbers of *Escherichia coli* in seawater have been investigated, including: pH, salinity, nutrient deficiencies (Carlucci and Pramer 1960), competition with other bacteria (Jannasch 1988), temperature (McFeters and Stuart 1972), antibiotic effect of seawater (Aubert *et al.* 1974), predation (Enzinger and Cooper 1976) and sunlight (Fujioka *et al.* 1981). The last factor seems to be the most important (Chamberlin and Mitchell 1978) and visible light may be more active in reducing coliform numbers than u.v. light (Bonfont *et al.* 1990; Pommepuy *et al.* 1991). Some recent results (Barcina *et al.* 1990; Davies and Evinson 1991) show a loss of colony-forming ability of *E. coli* after illumination in seawater. Many references report coliform decay in seawater as

a result of exposure to visible light but there are no reports on how visible light acts on enteric bacteria in this natural water. The goal and originality of the present work was therefore to elucidate the mechanism of phototoxicity on *E. coli* in natural seawater. This toxic effect of visible light appears to be due to a photo-oxidation phenomenon. Two major classes of photo-oxidative reactions may occur (Foote 1976):

- Type I photosensitization is characterized by electron transfer to/from the excited sensitizer resulting in a free radical pathway (Vidoczy 1992).
- Type II photosensitization is characterized by energy transfer from the excited sensitizer (Vidoczy 1992). Type II reactions include the reaction of the triplet state sensitizer with ground state oxygen <sup>3</sup>O<sub>2</sub> to produce singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Al-Nabulsi and Gutierrez 1992).

Some authors have suggested a possible photo-oxidation process either by exogenous photosensitizers such as humic substances in seawater (Cooper and Zika 1983) or endogenous sensitizers localized in the bacterial cell (Chamberlin

Correspondence to: Michèle Gourmelon, Laboratoire de Microbiologie, IFREMER, DEL, BP 70, 29280 Plouzané, France.

and Mitchell 1978). Exposure to visible light could result in production of reactive oxygen species (ROS) such as singlet oxygen, superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and the hydroxyl radical ( $^{\circ}OH$ ). These ROS have been shown to cause damage to proteins, lipids and nucleic acids (Storz *et al.* 1990; Farr and Kogoma 1991).

## MATERIALS AND METHODS

### Seawater preparation

Seawater (35‰ salinity) was collected from surface water at Argenton (Finistère, France). It was filtered through 0.2  $\mu m$  pore size membrane filters (Sterivex, Millipore) and sterilized at 120°C for 20 min. The concentration of dissolved organic carbon (DOC) in the sterilized seawater was 2.5 mg l<sup>-1</sup>.

### Inocula preparation

*Escherichia coli* H10407 was kindly provided by B. Joly (Faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand, France). It was grown in Trypticase Soy Broth (TSB, BBL) at 37°C. Cells from the exponential phase were harvested by centrifugation (3500 rev min<sup>-1</sup> for 15 min at 15°C) and washed twice in heat-sterilized saline water (9 g l<sup>-1</sup> NaCl).

### Microcosm experiments

Experiments were carried out in 1 l borosilicate Duran glass flasks (external diam. 101 mm, height 225 mm) containing 800 ml of sterile seawater, or in test tubes with 20 ml of seawater and inoculated with *E. coli* H10407 at a concentration of approximately 10<sup>7</sup> cells ml<sup>-1</sup>. Samples were placed in an incubator (Luminincube II, Analis, Belgium) at 20°C and exposed to artificial continuous visible light provided by two sets of six 20 W neon fluorescent daylight lamps (Claude, Paris, France) located in the front and back of the incubator. Samples were placed 15 cm from the neon lamps and illuminated at an intensity of approximately 40 klux measured with a Licor Li 1000 Data Logger with a 193SA spherical quantum sensor bulb (Licor, Lincoln, NE, USA). Half of the samples were covered with aluminium foil for dark incubation. All the samples were continuously shaken at 200 rev min<sup>-1</sup> during the experiment.

### Addition of reactive oxygen species scavengers

The following scavengers were added to the cell suspensions: thiourea, sodium benzoate, dimethylsulphoxide (DMSO), histidine (Prolabo, Paris, France). Each of these

compounds were dissolved directly in the bacterial suspension to give a final concentration of 100 mmol l<sup>-1</sup>.  $\beta$ -Carotene (Sigma) was dissolved in 200  $\mu l$  of ethanol before it was added to samples to give a final concentration of 0.1 mmol l<sup>-1</sup>. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (Boehringer Mannheim) was tested at a concentration of 1 mmol l<sup>-1</sup>. Desferrioxamine B (DFO) (Ciba-Geigy) was tested at concentrations of 1, 50 and 500  $\mu mol$  l<sup>-1</sup>, respectively. Cu-Zn superoxide dismutase (SOD) from bovine erythrocytes and bovine liver catalase (CAT) (Sigma) were added at concentrations of 55 U ml<sup>-1</sup> and 220 U ml<sup>-1</sup>, respectively. Denatured controls for these enzymes were prepared by heating at 95°C in a borate buffer pH 9 for 1 h.

### Anaerobic experiments

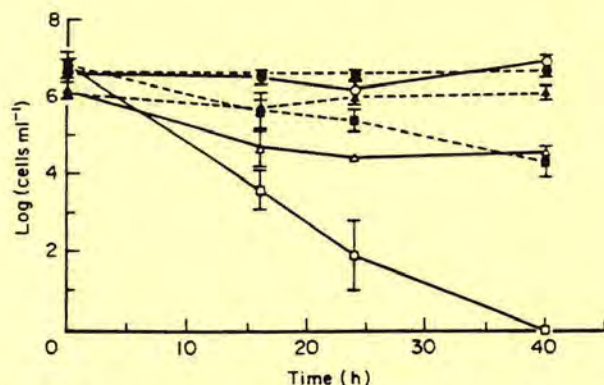
The flasks with sterilized seawater were inoculated with *E. coli* in an anaerobic store (Bubble system, La Caldhène, France) under an atmosphere composed of nitrogen (90%), hydrogen (5%) and carbon dioxide (5%). The flasks were then sealed with rubber stoppers and samples for analysis were periodically withdrawn with a sterile syringe.

### Bacterial enumeration

Culturable bacteria were recovered on Trypticase Soy Agar (AES Laboratoire, France) after incubation at 37°C for 24 h. Total bacteria were determined by acridine orange direct count (AODC) performed as described by Hobbie *et al.* (1977). Viable bacteria were measured by direct count of viable cells (DVC) carried out as described by Kogure *et al.* (1979). For DVC the subsamples were incubated with 0.025% yeast extract (Merck) and 0.012% nalidixic acid (Sigma) and then filtered through 0.2  $\mu m$  pore size polycarbonate filters (Nuclepore) which had been previously immersed for several hours in an Irgalan black solution (Ciba-Geigy). Bacteria recovered on the filter were then stained with acridine orange (BioMérieux) and examined by epifluorescence microscopy (Jenamed C Zeiss, Jena, Germany) at a magnification of 1000 $\times$  with an oil immersion objective (100 $\times$ ). Only cells demonstrating elongation and reddish-orange fluorescence were counted. Each DVC or AODC value represented the mean of 250 cells or 50 fields.

### <sup>3</sup>H methyl-thymidine incorporation

The metabolic activity was estimated according to the method described by Robarts *et al.* (1986) and Robarts and Wick (1989). Twenty ml of the *E. coli* suspension in seawater were collected and <sup>3</sup>H methyl-thymidine (48 Curie mmol<sup>-1</sup>) was periodically added to each sample to give a



**Fig. 1** Effect of visible light on *Escherichia coli* in seawater. Acridine orange direct count (○, ●), direct count of viable cells (△, ▲), cfu enumerations (□, ■) are carried out in light-exposed flasks (solid lines; open symbols) and dark flasks (dashed lines; closed symbols). Mean of three experiments  $\pm$  S.E.

final concentration of  $20 \text{ nmol l}^{-1}$ . Two different incubation times at  $20^\circ\text{C}$  were tested (30 and 60 min) and the 30 min time was selected for all experiments because a longer incubation time most likely corresponded to a saturation phase. All experiments were done with duplicate samples. Labelled samples were divided into three fractions:

- (i) Total incorporated  $^3\text{H}$  methyl-thymidine was determined by direct filtration on  $0.2 \mu\text{m}$  pore size Durapore GV (Millipore) filters after washing with 10 ml of ice-cold filtered seawater. Filters were dried and placed in scintillation vials with Dunagel (Baker) scintillator. The radioactivity of the samples was estimated with a Beckman LS 5000 E counter with, as reference,  $20 \text{ nmol l}^{-1}$  of the initial  $^3\text{H}$  methyl-thymidine solution directly set on a filter. The incubation times used in this method were too short to allow RNA labelling and therefore RNA synthesis was not evaluated (Robarts *et al.* 1986; Moriarty 1986).
- (ii) Labelled neosynthesized DNA and proteins were evaluated by addition of  $5 \text{ mol l}^{-1}$  NaOH (0.2 ml) to 3 ml of sample. The macromolecules were then precipitated by addition of ice-chilled trichloroacetic acid (TCA) to give a final concentration of 10% and allowed to react for 30 min at  $4^\circ\text{C}$  to insure total precipitation. Proteins and DNA were then collected on  $0.2 \mu\text{m}$  pore size filters and washed with ice-cold ethanol (80%).
- (iii) Proteins and DNA were separated by treatment of a sample with TCA (10%) in a boiling water bath to destroy the DNA. Proteins were recovered on a filter ( $0.2 \mu\text{m}$ ) and washed with ethanol as described above. DNA was calculated by difference of radioactivities of DNA and proteins (ii) and proteins alone (iii).

Results are expressed in percentage of radioactivity (disintegrations per min) recovered in each component (total bacteria, DNA and proteins) relative to the radioactivity of the initial  $^3\text{H}$  methyl-thymidine added.

#### Fatty acid assays

Bacteria were harvested by centrifugation at  $8000 \text{ rev min}^{-1}$  for 15 min, washed in distilled water and freeze-dried. Lipids were extracted from bacterial cells by a modification of the method of Bligh and Dyer (1959). Twenty mg of cells (dry wt) were stirred for 4 h in 57 ml of methanol-dichloromethane-distilled water (2:1:0.8 v/v) at room temperature. Total lipids were separated into different classes by chromatography on a silicic acid (1 g) column. Neutral lipids were eluted with dichloromethane (10 ml), glycolipids with acetone (10 ml) and phospholipids with methanol (10 ml). Only fatty acids from the phospholipid fraction were studied. Fatty acid methyl esters (FAME) were obtained by the acid methanolysis method. The methanolic phase was evaporated under a nitrogen gas stream. The dry residue was dissolved in 2 ml of methanol-hydrochloric acid-dichloromethane (10:1:1 v/v) with 25 ng of the nonadecanoic acid  $\text{C}_{19}:0$  as internal standard (Sigma) and heated at  $100^\circ\text{C}$  for 1 h. Samples were purified by thin-layer chromatography (HPTLC, Merck). Separation into individual FAME was carried out on a fused silica capillary non-polar column ( $50 \text{ m} \times 0.25 \text{ mm i.d.}$ ) coated with CPSIL 5CB (Chrompack, The Netherlands). Gas chromatography (GC) was performed on a Carlo Erba 4160 (Milan, Italy) equipped with an 'on-column' injector and a flame ionization detector.

The temperature programming was as follows:  $50^\circ\text{C}$  (2 min), ramp to  $140^\circ\text{C}$  at  $15^\circ\text{C min}^{-1}$ , ramp to  $280^\circ\text{C}$  at  $2^\circ\text{C min}^{-1}$  and  $280^\circ\text{C}$  (10 min).

Certain identifications were also confirmed by GC/MS with Nermag (Argenteuil, France) R10-10C with electron ionization (EI).

#### Total protein assays

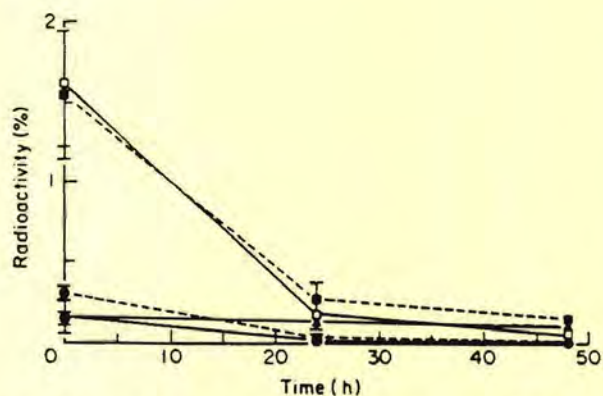
Total proteins were assayed by the method of Lowry *et al.* (1951) with bovine serum albumin as standard.

## RESULTS

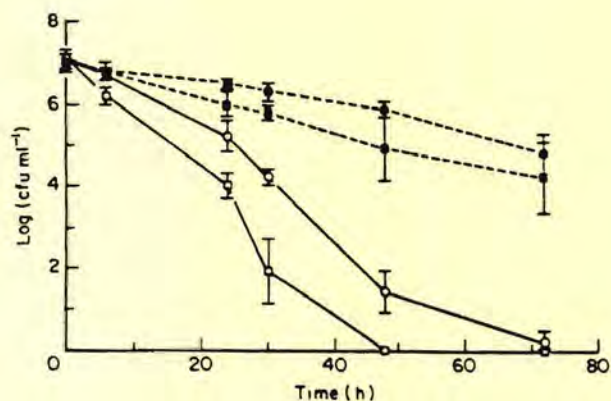
#### Toxic effects of light on *Escherichia coli* in seawater

**Bacterial enumerations.** Enumerations of *E. coli* suspended in seawater showed that, in the dark, *E. coli* remained viable and culturable during at least 40 h (Fig. 1).





**Fig. 2** Effect of visible light on total  $^3\text{H}$  methyl-thymidine incorporation, DNA and protein synthesis in *Escherichia coli* in seawater. Flasks were incubated under illumination (solid lines; open symbols) or in the dark (dashed lines; closed symbols). Percentage of radioactivity recovered in total bacteria ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ) in DNA ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), in proteins ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) relative to the radioactivity of initial  $^3\text{H}$  methyl-thymidine added. Mean of three experiments  $\pm$  S.E.



**Fig. 3** Effect of oxygen on *Escherichia coli* enumerations in seawater. *Escherichia coli* was suspended in deprived oxygen seawater ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) or in normal oxygenated seawater ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ). Samples were incubated either under illumination (solid lines; open symbols) or in the dark (dashed lines; closed symbols). Mean of three experiments  $\pm$  S.E.

When exposed to visible light a rapid decrease of colony-forming ability was observed whereas the viability was only slightly reduced. In addition, total bacteria and their microscopic aspect remained unchanged without any obvious lysis.

*Evolution of the metabolic activity of Escherichia coli in seawater.* In seawater *E. coli* exhibited weak incorporation of  $^3\text{H}$  methyl-thymidine as weak uptake of this compound into DNA and proteins. When *E. coli* was kept in seawater for prolonged times (24–48 h) a drastic decrease in its metabolic activity was observed independent of its illumination with visible light (Fig. 2).

*Effect of visible light on fatty acid profile.* The fatty acid (FA) composition of *E. coli* determined in nutritive media (TSB) showed the typical profile as reported previously (Wilkinson 1988). Fatty acids were distributed among saturated FA (lauric acid  $\text{C}_{12}:0$ , myristic acid  $\text{C}_{14}:0$ , palmitic acid  $\text{C}_{16}:0$ , stearic acid  $\text{C}_{18}:0$ ), mono-unsaturated FA (palmitoleic acid  $\text{C}_{16}:1\omega7$ , *cis*-vaccenic acid  $\text{C}_{18}:1\omega7$ ) and cyclopropane acids (*cis*-9,10 methylenehexadecanoic acid  $\text{C}_{17}:0$  and *cis*-11,12-methyleneoctadecanoic acid  $\text{C}_{19}:0$ ) (Table 1). An increase of the cyclopropane acids and a decrease of the mono-unsaturated FA were observed both in illuminated and non-illuminated samples when *E. coli* was suspended in seawater. This phenomenon could be associated with a response to stress provoked by the salinity and oligotrophy of seawater. McGarrity and Armstrong (1981) have shown that high concentrations of NaCl in the medium increased the level of cyclopropane acids. No significant change in FA distribution was observed after illumination of *E. coli* in seawater (Table 1).

*Effect of visible light on total proteins.* The total proteins of *E. coli* grown in TSB were 52 mg per 100 mg dry weight. *Escherichia coli* in seawater exhibited a large drop (40% within 72 h) in the level of proteins with and without illumination.

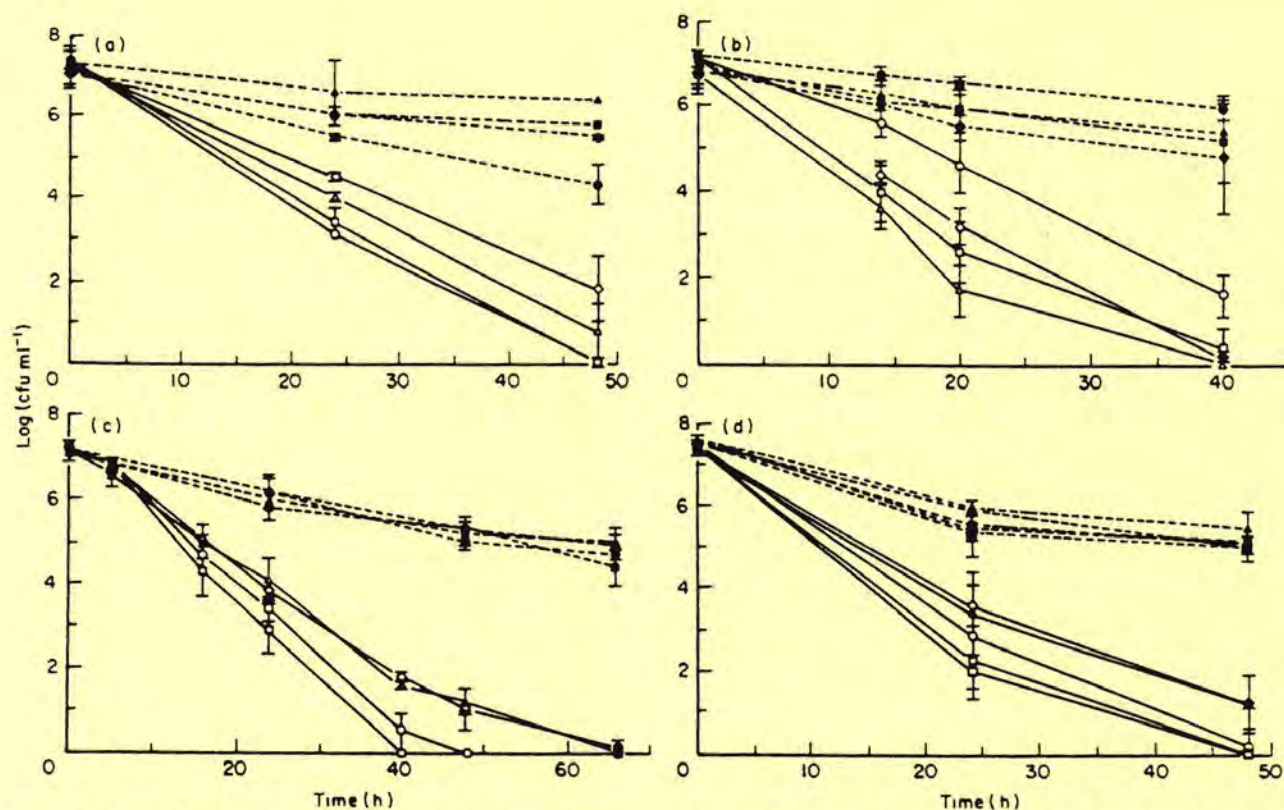
**Table 1** Fatty acid composition of *Escherichia coli* at exponential growth stage in nutritive media (TSB) or after 72 h of incubation in seawater either exposed to visible light (S light) or incubated in the dark (S dark)

	Saturated FA				Mono-unsaturated FA		Cyclopropane acids	
	$\text{C}_{12}:0$	$\text{C}_{14}:0$	$\text{C}_{16}:0$	$\text{C}_{18}:0$	$\text{C}_{16}:1$	$\text{C}_{18}:1$	$\text{C}_{17}:0\Delta$	$\text{C}_{19}:0\Delta$
TSB	$0.2 \pm 0.05$	$4.9 \pm 0.3$	$56.7 \pm 2.6$	$0.6 \pm 0.1$	$7.6 \pm 0.6$	$16.4 \pm 0.6$	$11.6 \pm 1.6$	$1.9 \pm 0.6$
S light*	$0.1 \pm 0.05$	$5.4 \pm 1.3$	$57.8 \pm 2.8$	$0.7 \pm 0$	$4.7 \pm 1$	$12.8 \pm 2.1$	$14.7 \pm 1.3$	$3.8 \pm 1$
S dark†	$0.1 \pm 0.05$	$4.9 \pm 1.4$	$58.1 \pm 1.1$	$0.9 \pm 0.1$	$5.1 \pm 1.3$	$13.4 \pm 2.1$	$13.9 \pm 0.9$	$3.9 \pm 0.6$

\* Seawater light.

† Seawater dark.

Results are expressed as mean of three experiments  $\pm$  S.E.



**Fig. 4** (a) Effect of singlet oxygen scavengers on *Escherichia coli* enumerations in seawater. Samples were incubated either under illumination (solid lines; open symbols) or in the dark (dashed lines; closed symbols) without scavengers ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ), with  $\beta$ -carotene  $0.1 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), histidine  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ), or NADPH  $1 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ). Mean of three experiments  $\pm$  s.e. (b) Effect of hydroxyl radical scavengers on *E. coli* enumerations in seawater. Samples were incubated either under illumination (solid lines; open symbols) or in the dark (dashed lines; closed symbols) without scavengers ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ), with thiourea  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), sodium benzoate  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ), or DMSO  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ). Mean of three experiments  $\pm$  s.e. (c) Effect of desferrioxamine B (DFO) on *E. coli* enumerations in seawater. Samples were incubated either under illumination (solid lines; open symbols) or in the dark (dashed lines; closed symbols) without DFO ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ), with DFO  $1 \mu\text{mol l}^{-1}$  ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), DFO  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$  ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ), or DFO  $500 \mu\text{mol l}^{-1}$  ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ). Mean of three experiments  $\pm$  s.e. (d) Effect of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) on *E. coli* enumerations in seawater. Samples were incubated either under illumination (solid lines; open symbols) or in the dark (dashed lines; closed symbols) without enzymes ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ), with SOD ( $55 \text{ UI ml}^{-1}$ ) ( $\circ$ ,  $\bullet$ ), CAT ( $220 \text{ UI ml}^{-1}$ ) ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ), SOD ( $55 \text{ UI ml}^{-1}$ ) + CAT ( $220 \text{ UI ml}^{-1}$ ) ( $\diamond$ ,  $\blacklozenge$ ), or denatured SOD + denatured CAT ( $\square$ ,  $\blacksquare$ ). Mean of three experiments  $\pm$  s.e.

#### Approach to determining the mechanism of phototoxicity

When *E. coli*, a facultative anaerobic bacterium, was maintained under anaerobic conditions, the phototoxic effect of visible light was reduced (Fig. 3). More precisely, the loss of colony-forming ability was less in anaerobiosis than in aerobiosis, although the protection was not as complete as in the dark. A photodynamic effect involving oxygen therefore seems to participate in the phototoxicity. In addition, type I photo-oxidation reactions which do not necessarily require oxygen could also occur, which might explain the partial protection observed under anaerobic conditions. Therefore the formation of ROS could be evoked. In order

to determine the presumed role of ROS in phototoxicity, various scavengers were tested:

- singlet oxygen quenchers:  $\beta$ -carotene was ineffective in reducing phototoxicity whereas histidine and especially NADPH exhibited a low degree of protection (Fig. 4a).
- hydroxyl radical scavengers: only thiourea afforded a net protective effect against visible light. Sodium benzoate and DMSO failed to reduce phototoxicity (Fig. 4b).
- iron chelator: desferrioxamine B was able to reduce the deleterious effect of light. Increasing its concentration increased its effectiveness and maximum efficiency was observed with concentrations equal or superior to  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$  (Fig. 4c).

- enzyme scavengers: SOD was without any effect whereas CAT showed a weak protection. The association of SOD and CAT did not significantly increase the protective effect (Fig. 4d).

## DISCUSSION

Visible light has a toxic effect on *E. coli* in seawater which is expressed by a rapid decrease of colony-forming ability; the viability was not significantly reduced. A toxic effect of visible light on *E. coli* in seawater has been reported (Barcina *et al.* 1990; Salomon and Pommepuy 1990; Davies and Evinson 1991; Pommepuy *et al.* 1991). Pommepuy *et al.* (1991) studied the phototoxicity of natural visible light on *E. coli* in the sea and found a good correlation between toxicity and illumination intensity. Phototoxicity is usually estimated by T90 (Bonfont *et al.* 1990) which is the time required to observe a 90% loss of culturable bacteria.

In the experiments described here, T90 for *E. coli* in seawater exposed to visible light at an intensity of 40 klux was found to be 6 h. These results are in good agreement with previous reports (Salomon and Pommepuy 1990; Pommepuy *et al.* 1991).

Natural seawater, however, also has a toxic effect on enteric bacteria independent of light exposure. Bacteria are transformed into a viable but non-culturable state (Roszak and Colwell 1987). They lose their ability to grow on agar plates (classical enumeration technique) but maintain cellular integrity, are viable (they can assimilate yeast extract) and sometimes retain their virulence (Grimes and Colwell 1986).

Nevertheless, in the experiments described here, *E. coli* suspended in seawater in the dark remained viable and culturable during at least 40 h, but the metabolic activity was greatly modified. Proteins and DNA synthesis were slowed down and total <sup>3</sup>H methyl-thymidine incorporation was markedly reduced. Seawater also resulted in a drastic decrease in total protein content. Similar results have been reported for *E. coli* in seawater (Munro 1988; Gauthier and Pietri 1989). According to these authors, *E. coli* in an oligotrophic media without a carbon supply rapidly degrades its own proteins to survive. Visible light did not cause a further detectable decrease in metabolic activity and total protein content of *E. coli* in seawater. Some specific proteins, however, can be damaged by visible light. Davies and Lin (1988) showed that *E. coli* possesses a proteolytic defence system which allows degradation of damaged proteins following oxidative stress. Other biomolecules can be damaged by oxidative stress such as membrane lipids. The FA composition of *E. coli* was evaluated with and without illumination in order to detect a possible lipid peroxidation process induced by visible light. The usual indicator for lipid peroxidation, i.e. formation of malondialdehyde (a by-

product of lipid peroxides), cannot be used as *E. coli* does not have the polyunsaturated FA necessary for malondialdehyde production. No significant change in the FA profile could be detected after illumination of *E. coli*. In particular, mono-unsaturated FA, which should be more sensitive to oxidation, exhibited no appreciable decrease. Unfortunately, weak variations in FA contents cannot be detected by the gas chromatographic analysis of FA.

The toxic effect of visible light seems to involve oxygen since, under anaerobic conditions, damage (estimated as the loss of colony-forming ability of *E. coli*) was reduced, although not completely eliminated. Photo-oxidative stress could also occur due to absorption of visible light by exogenous or endogenous photosensitizers which become electronically excited and react with oxygen to form ROS as reactive intermediates (type II reactions). The excited state energy is transferred from sensitizer to oxygen to produce singlet oxygen. Singlet oxygen is 1000 to 10 000 times more reactive than triplet state oxygen and can react directly with most biomolecules. Singlet oxygen could be generated in seawater by exogenous photosensitizers such as humic substances and chlorophyll (Chamberlin and Mitchell 1978; Cooper and Zika 1983) or inside the cell by endogenous photosensitizers (Chamberlin and Mitchell 1978) such as flavins, NADH, cytochromes. Three <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quenchers were tested:  $\beta$ -carotene, histidine, NADPH.  $\beta$ -Carotene, a well known <sup>1</sup>O<sub>2</sub> quencher, proved to be quite ineffective, perhaps because of its imperfect dispersion in seawater. The two other quenchers exhibited only a weak protective effect. Singlet oxygen therefore either appears not involved in the phototoxicity or the quenchers were unable to reach the sites of <sup>1</sup>O<sub>2</sub> generation, as this highly reactive species will react near its sites of production. Other ROS species could be formed by electron transfer as reactive intermediates of photosensitized reactions, especially superoxide anion, hydrogen peroxide and hydroxyl radical (Martin *et al.* 1988). The lack of SOD efficiency, a specific O<sub>2</sub><sup>-</sup> scavenger, which was most likely unable to enter into the bacteria should indicate that no O<sub>2</sub><sup>-</sup> was formed extracellularly from the exogenous photosensitizer. In addition, O<sub>2</sub><sup>-</sup> is unable to pass directly through *E. coli* membranes (Hassan and Fridovich 1979). Intracellular production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in illuminated bacteria, however, cannot be excluded. Hydrogen peroxide could arise from dismutation of intracellular O<sub>2</sub><sup>-</sup> catalysed by endogenous SOD. Unlike O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can diffuse through the membranes and be found at the extracellular level. Indeed, weak protection was observed by addition of exogenous catalase. If H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is formed, its toxic effect is mediated through <sup>o</sup>OH production *via* the Fenton reaction. Hydroxyl radical scavengers such as thiourea exhibited good protective action whereas DMSO and sodium benzoate were quite ineffective. Martin *et al.* (1988) have studied the toxic effect of visible light mediated by

- en milieu marin. Thèse de Doctorat de l'Université d' Aix-Marseille II, France.
- Pommepuy, M., Guillaud, J.F., Martin, Y., Dupray, E., Derrien, A., L'Yavanc, J. and Cormier, M. (1991) Le devenir des bactéries en zone littorale. In *La mer et les Rejets Urbains* ed. Guillaud, J.F. and Romaña, L.A. pp. 89–100. Plouzané: IFREMER.
- Robarts, R.D. and Wicks, R.J. (1989) (Methyl-<sup>3</sup>H) thymidine macromolecular incorporation and lipid labeling. Their significance to DNA labeling during measurements of aquatic bacterial growth rate. *Limnology and Oceanography* 1, 213–222.
- Robarts, R.D., Wicks, R.J. and Septon, L.M. (1986) Spatial and temporal variations in bacterial macromolecule labeling with (methyl-<sup>3</sup>H) thymidine in a hypertrophic lake. *Applied and Environmental Microbiology* 52, 1368–1373.
- Roszak, D.B. and Colwell, R.R. (1987) Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 2889–2893.
- Salomon, J.C. and Pommepuy, M. (1990) Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix Estuary (France). *Water Research* 24, 983–996.
- Storz, G., Tartaglia, L.A., Farr, S.B. and Ames, B.N. (1990) Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends in Genetics* 6, 363–368.
- Vidoczy, T. (1992) Type I and type II photosensitized reactions: reasons for dispute. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology* 14, 139–150.
- Wilkinson, S.G. (1988) Gram-negative bacteria. In *Microbial Lipids* ed. Rattedge, C. and Wilkinson, S.G. Vol. 1, pp. 299–488. London: Academic Press.

exogenous dyes on *E. coli* in nutrient broth. They noted that these scavengers used at the same concentrations as in the present experiment reduced phototoxicity. Production of  $^{\circ}\text{OH}$  involves the decomposition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  by iron, and the iron chelator DFO did indeed reduce the toxic effect of light.

From these observations it may therefore be inferred that there is a possible involvement of some ROS, especially  $\text{H}_2\text{O}_2$  and  $^{\circ}\text{OH}$ , although none of the scavengers tested afforded complete protection to illuminated bacteria. One hypothesis could be that a fraction of the ROS escaped the scavengers and injured biomolecules lacking an effective repair process. *Escherichia coli* in seawater does in fact undergo osmotic and oligotrophic stress which limits the synthesis of the oxidative stress inducible proteins involved in defence and repair functions.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to J.C. Caprais for his technical assistance for fatty acids analysis and G. Cahet who kindly performed the  $^3\text{H}$  methyl-thymidine technique. They would also like to thank Professor P. Cillard and Professor M. Cormier for their comments and encouragement.

#### REFERENCES

- Al-Nabulsi, I. and Gutierrez, P.L. (1992) Photosensitization of MCF-7 cells with diaziquone using visible light: correlation with DNA strand breaks and free radical production. *Photochemistry and Photobiology* 56, 201–209.
- Aubert, M., Pesando, D. and Gauthier, M. (1974) Effect of antibiotics in a marine environment. In *Discharge Sewage from Sea Outfalls* ed. Gameson, A.L.H. pp. 191–196. Oxford: Pergamon Press.
- Barcina, I., Gonzalez, J.M., Iriberry, J. and Egea, L. (1990) Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. *Journal of Applied Bacteriology* 68, 189–198.
- Bligh, E.G. and Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37, 912–917.
- Bonnefont, J.L., Martin, Y.P. and Guiennet, B. (1990) Etude expérimentale de la décroissance des bactéries fécales en milieu marin. Quantification, facteurs impliqués. *Water Research* 24, 267–273.
- Carlucci, A.F. and Pramer, D. (1960) An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater. II. Salinity, pH and nutrients. *Applied Microbiology* 8, 247–250.
- Chamberlin, C.E. and Mitchell, R. (1978) A decay model for enteric bacteria in natural waters. In *Water Pollution Microbiology* ed. Mitchell, R. pp. 325–348. New York: Wiley-Interscience.
- Cooper, W.J. and Zika, R.G. (1983) Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface and ground waters exposed to sunlight. *Science* 220, 711–712.
- Davies, C.M. and Evinson, L.M. (1991) Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *Journal of Applied Bacteriology* 70, 265–274.
- Davies, K.J.A. and Lin, S.W. (1988) Degradation of oxidatively denatured proteins in *Escherichia coli*. *Free Radical Biology and Medicine* 5, 215–223.
- Enzinger, R.M. and Cooper, R.C. (1976) Role of bacteria and protozoa in the removal of *Escherichia coli* from estuarine waters. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 758–763.
- Farr, S.B. and Kogoma, K. (1991) Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiological Reviews* 55, 561–585.
- Foote, C.S. (1976) Photosensitized oxidation and singlet oxygen: consequences in biological systems. In *Free Radicals in Biology* ed. Pryor, W.A. Vol. 2, pp. 85–134. New York: Academic Press.
- Fujioka, R.S., Hashimoto, H.M., Siwak, E.B. and Young, R.H.F. (1981) Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 41, 690–696.
- Gauthier, M. and Pietri, C. (1989) Devenir des bactéries et virus entériques en mer. In *Micro-organismes dans les Écosystèmes Océaniques* ed. Bianchi, M., Marty, D., Bertrand, J.C., Caumette, P. and Gauthier, M. pp. 325–327. Paris: Masson.
- Grimes, D.J. and Colwell, R.R. (1986) Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semi-tropical ocean water. *FEMS Microbiology Letters* 34, 161–165.
- Hassan, H.M. and Fridovich, I. (1979) Paraquat and *Escherichia coli*, mechanism of production of extracellular superoxide radical. *Journal of Biological Chemistry* 254, 10846–10852.
- Hobbie, J.E., Daley, R.J. and Jasper, S. (1977) Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 33, 1225–1228.
- Jannasch, H. W. (1988) Competitive elimination of Enterobacteriaceae from seawater. *Applied and Environmental Microbiology* 16, 1616–1618.
- Kogure, K., Simidu, V. and Taga, N. (1979) A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* 25, 415–420.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265–275.
- Martin, J.P., Burch, J. and Burch, P.E. (1988) Oxygen radicals are generated by dye-mediated intracellular photooxidations. In *Oxy-radicals in Molecular Biology and Pathology* ed. Cerutti, P.A., Fridovich, I. and McCord, J.M. pp. 393–404. New York: Liss.
- McFeters, G.A. and Stuart, D.G. (1972) Survival of coliforms in natural water field and laboratory studies with membrane filter chambers. *Applied Microbiology* 24, 805–811.
- McGarrity, J.T. and Armstrong, J.B. (1981) The effect of temperature and other growth conditions on the fatty acid composition of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology* 27, 835–840.
- Moriarty, D.J.W. (1986) Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic acid synthesis. *Advances in Microbiological Ecology* 9, 245–292.
- Munro, P. (1988) Modifications somatiques et adaptation d'*E. coli*

**V - Article 11 :**  
**Effect of carbonyl cyanide**  
**m-chlorophenylhydrazine on**  
***Escherichia coli* halotolerance.**

## Effect of Carbonyl Cyanide *m*-Chlorophenylhydrazine on *Escherichia coli* Halotolerance

MOSTEFA GHOUL,<sup>1\*</sup> MONIQUE POMMEPUY,<sup>2</sup> AGNES MOILLO-BATT,<sup>1</sup> AND MICHEL CORMIER<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratoire de Microbiologie Pharmaceutique, Université de Rennes I, Campus de Villejean, 35043 Rennes Cedex, and  
<sup>2</sup>Laboratoire de Bactériologie, IFREMER, DERO-EL, Centre de Brest BP 337, 29273 Brest Cedex, France

Received 26 October 1988/Accepted 18 January 1989

The growth-inhibitory effect of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP) was less on members of the family *Enterobacteriaceae* (halotolerant organisms) than it was on species of *Vibrio* (moderately halophilic organisms). When sodium chloride concentration increased from 0.5 to 0.85 M, this effect was more pronounced for *Escherichia coli*; it remained relatively stable for *Vibrio* spp. The effect of carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine was antagonized by the addition of glycine betaine or proline or by growth in a rich medium.

Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazine (CCCP) is an H<sup>+</sup> ionophore which dissipates the H<sup>+</sup> gradient and thus uncouples electron transport from ATP synthesis. It can transport protons into the cell without the participation of ATP synthase (16). Therefore, the proton motive force (PMF) is cancelled out, and ATP can no longer be synthesized (1). Cellular respiration continues and may even be stimulated (9). CCCP is frequently used in the study of the active transport of substances. Studies have been carried out on halotolerant bacteria, such as *Escherichia coli* (7, 8) and *Klebsiella* sp. (3), halophilic bacteria, such as *Vibrio alginolyticus* (17, 18) and *Vibrio parahaemolyticus*, and moderately halophilic bacteria, such as *Vibrio costicola* (6) (for a review, see reference 3). Reactions to CCCP are varied; each type of bacterium according to its mode of energy transport (respiratory Na<sup>+</sup> pump, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport, etc.) shows a different response to concentrations of CCCP, this response being linked to pH (12, 18). Circulation of Na<sup>+</sup> ions across the membrane is essential for the different physiological functions of marine and halophilic bacteria (3). In halotolerant bacteria, the presence of Na<sup>+</sup> is not crucial, but growth can take place at a certain concentration of sodium chloride (NaCl) between 0.5 and 0.68 M in minimal medium. Compatible osmoprotectors, such as glycine betaine (GB) and proline (Pro) (10, 11), allow the bacteria to support even stronger concentrations of NaCl. Uptake of these substances occurs by active transport (4, 14).

We have studied the influence of CCCP on halotolerant (*Enterobacteriaceae*) and halophilic (*Vibrio* spp.) strains. Salt tolerance of the organisms and MIC of CCCP on the organisms were determined. A minimal medium supplemented with and without an osmoprotector and a complex medium were prepared at pH 7.2. Salt concentrations ranging from 0 to 1.2 M were used. All strains (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella* spp., *V. parahaemolyticus*, and *V. alginolyticus*) were of marine environmental origin.

The bacteria were incubated aerobically in 5 ml of Trypticase (BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Md.) soy broth (TSB) (A.E.S. Laboratoire, Combourg, France) at 37°C for 18 h. They were then washed three times with 10 ml of saline water (0.9% [wt/vol] NaCl in distilled water). A volume of 5 µl of washed cells was used to inoculate

U-bottom, 96-well polystyrene microdilution plates, for a total volume of 200 µl, to determine either the maximum NaCl tolerance or the MIC in a liquid medium. The cultures were then incubated at 37°C for 24 h. Bacterial growth was evaluated by visual assessment of turbidity. To determine the MIC on a solid medium, a drop of culture incubated aerobically in TSB for 18 h at 37°C was transferred via a multipronged replicator onto agar.

Minimal medium M63 (2) with 10 mM of glucose as the carbon and energy source was used. As indicated below, 1 mM of the osmoprotectors GB (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) or Pro (E. Merck AG, Darmstadt, Federal Republic of Germany) was added to the M63 after sterilization by passage through a membrane filter (0.22-µm pore size; Millipore Corp., Bedford, Mass.). TSB was used as the complex medium, and Trypticase-agar was the solid medium. The osmotic strengths of these media were increased by the addition of NaCl at the following concentrations: 0.085, 0.5, 0.68, 0.85, 1.02, and 1.20 M. The final pH of these media before sterilization was 7.2. Bacteria were incubated in the presence of CCCP (Sigma) dissolved in dimethyl sulfoxide at the following concentrations: 0, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 50, 60, 80, and 100 µM. Blanks consisting of bacterial culture in the presence of dimethyl sulfoxide or each concentration of salt were included in each experiment. MICs were determined by duplicate tests. Comparison of a large number of strains was made possible by replication plating on solid media. Readings were taken after 18 h of incubation.

The MIC of CCCP for *E. coli* ZB400 on M63 containing 0.5 M NaCl was 10 µM, whereas *V. alginolyticus* and *V.*

TABLE 1. MIC of CCCP for *E. coli*, *V. alginolyticus*, and *V. parahaemolyticus* in TSB at different salt concentrations

[NaCl] (M) in TSB	MIC of CCCP (µM) for:			
	<i>E. coli</i> ZB 400	<i>E. coli</i> ZB 401	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
0.085	>100	>100	5	5
0.50	40	50	2.5	2.5
0.68	20	40	2.5	2.5
0.85	20	20	1.25	2.5
1.02	20	20	1.25	0.625
1.20	—	—	0.312	0.312

—, No growth.

\* Corresponding author.

TABLE 2. Percentage of strains resistant to CCCP on Trypticase-agar at different salt concentrations

[NaCl] (M)	[CCCP] ( $\mu$ M)	Growth* of strains (n = no. of strains tested)											
		<i>V. alginolyticus</i> and <i>V. parahaemolyticus</i> (n = 24)			<i>E. coli</i> (n = 27)			<i>K. oxytoca</i> and <i>K. pneumoniae</i> (n = 18)			<i>Salmonella</i> spp. (n = 20)		
		NG	PI	No G	NG	PI	No G	NG	PI	No G	NG	PI	No G
0.5	2.5	100			100			100			100		
	5	66.7	8.3	25	100			100			100		
	10			100	100			100			100		
	15				100			100			100		
	20				100			100			100		
	30				100			100			100		
	40				100			100			100		
	50				96.2		3.7	94.4		5.5	100		
	60				70.3	22.2	7.4	72.2	11.1	16.6	45	30	25
	80				66.6	11.1	22.2	55.5	5.55	38.8	20	35	45
100				48.2	27.6	24.1	38.8	11.1	50	20	80		
0.68	2.5	100			100			100					
	5	66.7			100			100			100		
	10				100			100			100		
	15				100			100	100				
	20				100		88.8	11.1	95	5			
	30				96.2	3.7	55.5	33.3	11.1	50	30	20	
	40				62.9	22.2	14.8	44.4	5.5	50	30	20	50
	50				40.7	40.7	18.5	38.8		61.1	20	80	
0.85	2.5	100	100	100						100			
	5	20.8	12.5	54.1	100	100				100			
	10			100	80	20	72.2	16.6	11.1	100			
	20				59.2	25.2	14.8	44.4	33.3	22.2	20	25	55
	30				24.1	41.3	34.4	22.2		77.7	20	80	

\* NG, Normal growth; PI, partially inhibited; No G, no growth.

*parahaemolyticus* were inhibited by lower concentrations of CCCP (ca. 2.5 and 0.650  $\mu$ M).

In a complex liquid medium at 0.085 M NaCl, the MIC of CCCP was higher than 100  $\mu$ M for *E. coli* ZB400 and *E. coli* ZB401 and 5  $\mu$ M for the *Vibrio* species (Table 1). On Trypticase-agar, the results (Table 2) show that the members of *Enterobacteriaceae* were resistant to CCCP. *E. coli* and the *Klebsiella* species were more resistant than *Salmonella* spp. With 0.5 M NaCl and 100  $\mu$ M CCCP, 48.2% normal

growth was observed for *E. coli* and 38.8% for the *Klebsiella* species. Under identical conditions, no growth was observed for *Salmonella* spp. Furthermore, resistance to CCCP appears to be dependent on salt concentration. The *Vibrio* species were very sensitive to concentrations lower than 10  $\mu$ M CCCP, whatever the salt content used.

The effect of CCCP on a population of *E. coli* (Fig. 1) shows that a concentration of 20  $\mu$ M CCCP reduced the number of strains which grew in M63, M63 + GB, and M63

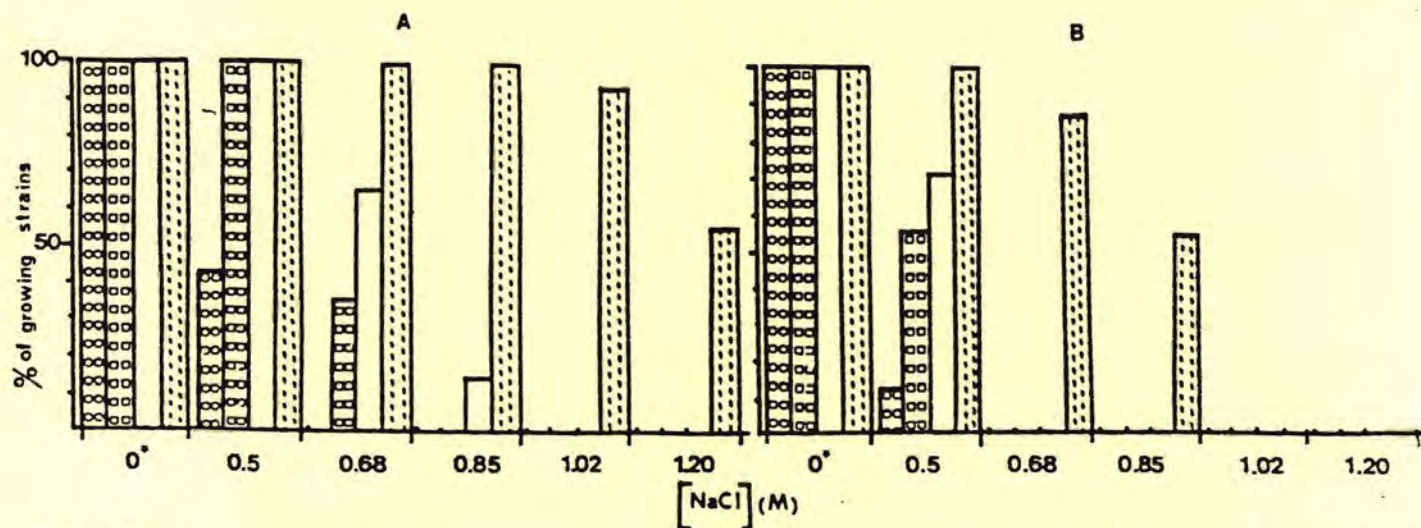


FIG. 1. Growth percentage of *E. coli* of marine origin (16 strains) at different NaCl concentrations in the absence (A) or presence (B) of 20  $\mu$ M CCCP. Media: [hatched] M63; [white] M63 + GB (1 mM); [dotted] M63 + Pro (1 mM); [cross-hatched] TSB; [star] TSB containing 5 g/l NaCl.



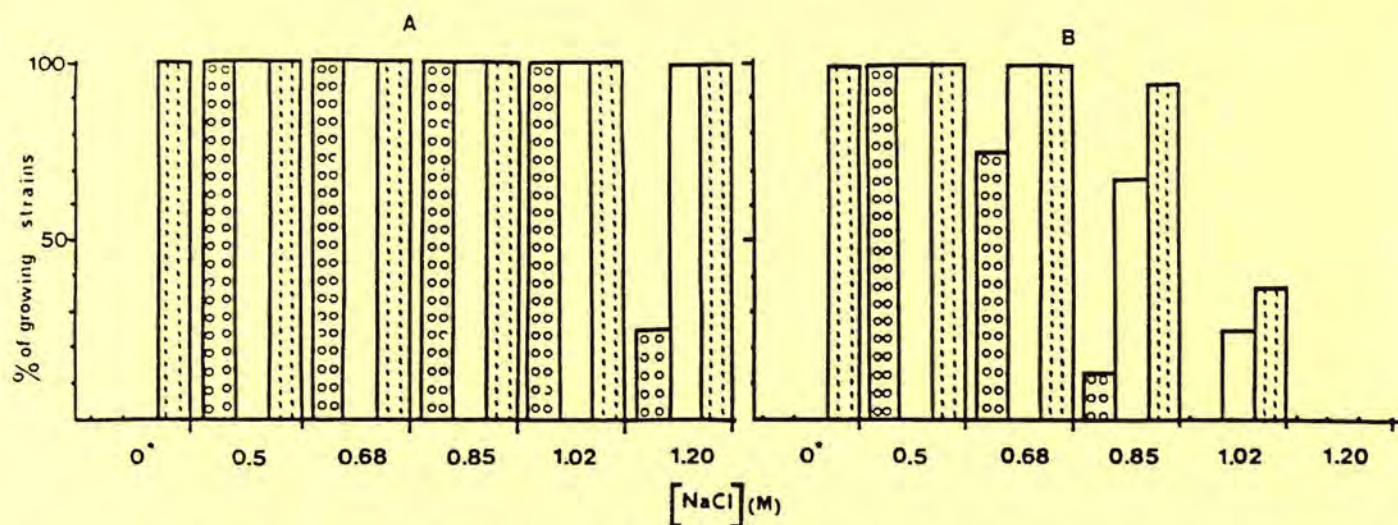


FIG. 2. Growth percentage of 16 *Vibrio* strains of marine origin (*V. alginolyticus*, eight strains; *V. parahaemolyticus*, eight strains) at different salt concentrations in the absence (A) or presence (B) of 1.25  $\mu\text{M}$  CCCP. Media:  $\square$ , M63;  $\square$ , M63 + GB (1 mM);  $\square$ , TSB;  $\star$ , TSB containing 5 g of NaCl per liter.

+ Pro containing 0.5 M NaCl. Total inhibition occurred at a salt concentration of 0.68 M. However, *E. coli* strains showed higher resistance in a complex medium. On the other hand, no growth was observed with a *Vibrio* population exposed to 10  $\mu\text{M}$  CCCP. Therefore, 1.25  $\mu\text{M}$  CCCP was used. Partial inhibition was already noted in M63 at 0.68 M NaCl and 0.85 M for rich medium. Inhibition in M63 + GB was intermediate (Fig. 2).

In summary, resistance of *E. coli* to CCCP was dependent on the nature of the medium. MICs in the region of 50  $\mu\text{M}$  in M63 and in excess of 100  $\mu\text{M}$  in TSB for a salt concentration of 0.085 M were obtained. These results are in agreement with those of Kinoshita et al. (8).

In a rich medium, the MIC fell sharply as salt concentration rose, reaching only 20  $\mu\text{M}$  between 0.68 and 1.02 M NaCl (Table 1). In *E. coli*, it is the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport which functions, and cells can thus grow in the absence of PMF when glucose is used as an energy source (8). This accounts for the high MICs observed in particular at low salt concentrations. Our results can be interpreted as a combination of the effects of CCCP and osmotic stress to prevent growth; when the salt concentration is high, glycolytic energy no longer suffices to allow cells to resist.

On the contrary, for *Vibrio* strains, the type of growth medium, rich or minimal, seems to have no influence on the inhibitory action of CCCP; in both cases, the strains were highly sensitive. At pH 7.2, the MIC was on the order of 2.5  $\mu\text{M}$  CCCP. These results agree with those of Tokuda and Unemoto (18). At this pH, sensitivity to CCCP was fairly high, since it is the  $\text{H}^+$  pump which functions and not the  $\text{Na}^+$  pump, whose maximum activity occurs at pH 8.5, thus rendering the *Vibrio* species resistant to CCCP (18). Furthermore, it is interesting that this inhibition was independent of salt concentration.

To observe the phenomenon of inhibition by CCCP on a population of *E. coli* (Fig. 1B) and *Vibrio* spp. (Fig. 2B), cells were grown at a subinhibitory concentration (20 and 1.25  $\mu\text{M}$ , respectively). Halotolerant strains of *E. coli* were sensitive to 20  $\mu\text{M}$  CCCP during growth in M63. They showed much stronger resistance when the M63 contained an osmoprotector, GB or Pro, which does not undergo any metabolic pathway under these conditions (4, 5, 10, 14). This resistance was particularly notable in a rich medium. Indeed,

in this case, more than 50% of strains grew in the presence of 20  $\mu\text{M}$  CCCP at a salt concentration of 0.85 M. Thus, it can be observed that the presence of osmoprotectors and nutrients in the TSB increased the resistance of *E. coli* to CCCP. Roth et al. (15) reported that in NaCl-upshocked cells, GB stimulates ATP production via an increase in glucose transport. However, this resistance is dependent upon the NaCl concentration (Fig. 1B). Inhibition in M63 is due to partial dissipation of the PMF by 20  $\mu\text{M}$  CCCP (8). The cell can no longer provide enough energy to combat the osmotic stress induced by the salt; glycolytic energy alone is thus insufficient. In M63 with added GB or Pro, or in TSB, the inhibition observed is due to slowing down of the active transport of compatible substances, which reduces the osmoprotective effect (4, 13, 14). At high salt concentrations, osmotic stress is so great that even the slightest partial inhibition of PMF, induced by a reduction in energy supply, prevents growth of the cell.

For *Vibrio* spp. in a rich medium and in M63 + GB, the percentages of growing strains fell at high salt concentrations, as can be expected if the active transport of compatible factors of TSB and GB is partially inhibited by CCCP. In M63 the fall in these percentages is noticeable. This can be attributed to the absence of osmoprotectors. Given the slowing down of cellular energetic processes, the cells can no longer resist the osmotic stress induced by the NaCl. At a concentration of 10  $\mu\text{M}$ , CCCP had a toxic effect on cells whatever the medium used.

In all cases, osmotic stress caused by salt combined with inhibition, even partial, of the PMF to slow the growth of the bacteria.

We are indebted to R. R. Colwell for helpful discussion and for reviewing the manuscript, and we thank D. McKeown for revising the English in this article.

#### LITERATURE CITED

1. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and J. D. Watson. 1986. Conversion de l'énergie: mitochondries et chloroplastes, p. 508. In *Biologie moléculaire de la cellule*. Flammarion-Médecine Sciences, Paris.
2. Cohen, G. N., and H. V. Rickenberg. 1956. Concentration spécifique réversible des amino acides chez *E. coli*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 91:963-720.

3. Dimroth, P. 1987. Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol. Rev.* 51:320-340.
4. Duniap, V. J., and L. N. Csonka. 1985. Osmotic regulation of L-proline transport in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 163:296-304.
5. Grothe, S., R. L. Krogsrud, D. J. McLellan, J. L. Milner, and J. M. Wood. 1986. Proline transport and osmotic stress response in *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* 166:253-259.
6. Hamaide, F., D. J. Kushner, and G. D. Sprott. 1983. Proton motive force and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in a moderate halophile. *J. Bacteriol.* 156:537-544.
7. Ito, M., Y. Ohnishi, S. Itoh, and M. Nishimura. 1983. Carbonyl cyanide-*m*-chlorophenyl hydrazone-resistant *Escherichia coli* mutant that exhibits a temperature-sensitive Unc phenotype. *J. Bacteriol.* 153:310-315.
8. Kinoshita, N., T. Unemoto, and H. Kobayashi. 1984. Proton motive force is not obligatory for growth of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 160:1047-1077.
9. Lehninger, A. L. 1972. Le transport d'électrons et la phosphorylation oxydative, p. 384. In *Biochimie*. Flammarion-Médecine Sciences, Paris.
10. Le Rudulier, D., and L. Bouillard. 1983. Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:152-159.
11. Le Rudulier, D., A. R. Strom, A. M. Dandekar, L. T. Smith, and R. C. Valentine. 1984. Molecular biology of osmoregulation. *Science* 224:1064-1068.
12. McLeod, R. A., G. A. Wisse, and F. L. Stejskal. 1988. Sensitivity of some marine bacteria, a moderate halophile, and *Escherichia coli* to uncouplers at alkaline pH. *J. Bacteriol.* 170:4330-4337.
13. Peleg, E., A. Tietz, and I. Friedberg. 1980. Effects of salts and ionophores on proline transport in a moderately halophilic halotolerant bacterium. *Biochim. Biophys. Acta* 596:118-128.
14. Perroud, B., and D. Le Rudulier. 1985. Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* 161:393-401.
15. Roth, W. G., M. P. Leckie, and D. N. Dietzler. 1988. Restoration of colony-forming activity in osmotically stressed *E. coli* by betaine. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:3142-3146.
16. Schlegel, H. G. 1986. General microbiology, p. 261. Cambridge University Press, Cambridge.
17. Tokuda, H., and T. Unemoto. 1982. Characterization of the respiration dependent  $\text{Na}^+$  pump in the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *J. Biol. Chem.* 257:10007-10014.
18. Tokuda, H., and T. Unemoto. 1983. Growth of a marine *Vibrio alginolyticus* and moderately halophilic *V. costicola* becomes uncoupler resistant when the respiration-dependent  $\text{Na}^+$  pump functions. *J. Bacteriol.* 156:636-643.
19. Tsuchiya, T., and S. Shinoda. 1985. Respiration-driven  $\text{Na}^+$  pump and  $\text{Na}^+$  circulation in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 162:794-798.

**VI - Article 12 :**  
**Production of 4-Methylumbelliferyl**  
**Heptanoate Hydrolase by**  
***Escherichia coli* exposed to seawater.**

## Production of 4-Methylumbelliferyl Heptanoate Hydrolase by *Escherichia coli* Exposed to Seawater

L. FIKSDAL,<sup>1\*</sup> M. POMMEPUY,<sup>2</sup> A. DERRIEN,<sup>2</sup> AND M. CORMIER<sup>3</sup>

Department of Hydraulic and Sanitary Engineering, University of Trondheim, 7034-NTH Trondheim, Norway,<sup>1</sup> and IFREMER, Centre de Brest, 29263 Plouzané,<sup>2</sup> and Laboratoire de Bacteriologie, UER des Sciences Médicales et Pharmaceutiques, 35043 Rennes,<sup>3</sup> France

Received 13 March 1989/Accepted 22 June 1989

The production of an enzyme, 4-methylumbelliferyl heptanoate hydrolase, in *Escherichia coli* exposed to enriched and nonenriched seawater was studied. In all media, except for seawater with no or very small amounts of organic material and seawater enriched with peptone, 4-methylumbelliferyl heptanoate hydrolase activity increased by 2 to 3 orders of magnitude within 2 days. Increased enzyme activity was assumed to be related to cells not undergoing lysis but adapting to conditions of nutrient limitation.

Nutrient limitation, temperature, and salinity create conditions that are not optimal for growth of enteric bacteria in natural seawater. Bacteria which are sublethally stressed may evolve toward a viable but not culturable stage (23) and will exist for different periods of time as cultivable or noncultivable cells. The assimilation of nutrients by cultivable bacteria includes the participation of different enzymes, among them hydrolases, by which substrates become accessible to cells. During conversion of living biomass to nonliving organic material, autolytic bacterial enzymes, such as hydrolases, participate in the breakdown of cellular compounds. These enzymes may create conditions for cryptic growth when a portion of a microbial population lyses, releasing products of lysis and leakage which support growth of survivors (18).

Bacterial enzymes acting on 4-methylumbelliferyl (MU) compounds have been used in clinical enzyme assays (7, 22), to identify fecal coliforms (2, 5, 19), and to measure exoenzymatic activity in natural waters (11). It is not known to what extent MU substrates represent naturally occurring substances in seawater or whether the specificity of the enzyme acting on the substrate has a broad or narrow spectrum. Some naturally occurring substrates have, however, been shown to produce competitive inhibition of the enzymatic decomposition of MU phosphate, MU-leucine, MU- $\alpha$ -D-glucopyranoside, and MU- $\beta$ -D-glucopyranoside in seawater (11).

The work presented here is a study of the production of an enzyme, 4-methylumbelliferyl heptanoate hydrolase (MUHase), in *Escherichia coli* (H10407 from the isolates of Evans et al. [4], provided by B. Joly, Université de Clermont-Ferrand, France) under conditions not optimal for growth.

*E. coli* was maintained in the lyophilized state; working stock cultures were maintained on Tryptone soy agar (Oxoid Ltd.). The following sterile filtered (0.22- $\mu$ m-pore-size, 47-mm-diameter membrane filter [Millipore Corp.]) media were used: seawater (SW), 35‰ salinity; UV-irradiated (24 h at 254 nm) seawater (UVSW); seawater with glycine betaine (1.0 mM; SWGB); seawater with peptone (10 g/liter; SWP); and minimum medium (M63) containing (per liter of distilled H<sub>2</sub>O) 13.6 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2 g of MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 2 g of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.001 g of FeSO<sub>4</sub>, and 1.8 g of glucose (pH 7.2).

A 2.2-liter volume of each medium was inoculated to a concentration of approximately 10<sup>6</sup> CFU/ml with cells previously grown in 100 ml of Tryptone soy broth (Oxoid) and was washed three times with saline after centrifugation (4°C, 15 min, 1,900 × g). The cultures were incubated at 15°C in the dark with gentle stirring.

Cultivable bacteria were recovered on Drigalski agar (Oxoid) at 37°C; colonies (CFU) were counted after 1 day on triplicate plates, and the counts were averaged.

Total acridine orange direct counts (AODC) were obtained by staining cells with acridine orange (10). Direct viable counts (DVC) were obtained by incubating cells first with yeast extract and then with nalidixic acid (12). AODC and DVC values represent the mean count of 200 cells or 20 microscopic fields of view.

The MUHase assay was done by filtering 50 ml of culture through a 0.22- $\mu$ m-pore-size, 47-mm-diameter membrane filter (Millipore). The filter was then aseptically placed in a 250-ml flask containing 20 ml of sterile phosphate-buffered saline, pH 7.2. MU heptanoate (Sigma Chemical Co.) was added, at a final concentration equal to 0.05 mg/ml, to each flask and to a sterile control flask containing 20 ml of phosphate-buffered saline, as previously described (2). The flasks were incubated in a shaking water bath at 20°C, and the fluorescence intensity was measured every 5 min for 20 min with a model 430 spectrofluorometer (Turner) (2). Calibration was established with solutions of MU (Sigma) in phosphate-buffered saline. The enzymatic activity, measured as the rate of production of MU (micromolar per minute), was determined by least squares regression. The sensitivity limit as defined by the rate of MU heptanoate autohydrolysis was 0.002  $\mu$ M/min. One unit of MUHase activity was defined as the amount of enzyme releasing 1  $\mu$ mol of MU from the substrate per min at 20°C.

*E. coli* exposed to SW or SWGB showed either a rapid (experiments done in January 1988) or a slow (experiments done in May 1988) decrease in cultivable cells (CFU) during the period of exposure, 23 and 21 days, respectively (Fig. 1a). Decay coefficients for the CFU counts in SW and SWGB media can be determined by assuming a first-order decrease,  $k = -0.18$  (SW, January),  $-0.03$  (SW, May), and  $-0.06$  (SWGB, May) CFU per day. In the first experimental period, AODC remained constant while DVC decreased, although at a lower rate ( $k = -0.11$ ) than CFU (Fig. 2). The MUHase activity of *E. coli* exposed to SW or SWGB

\* Corresponding author.

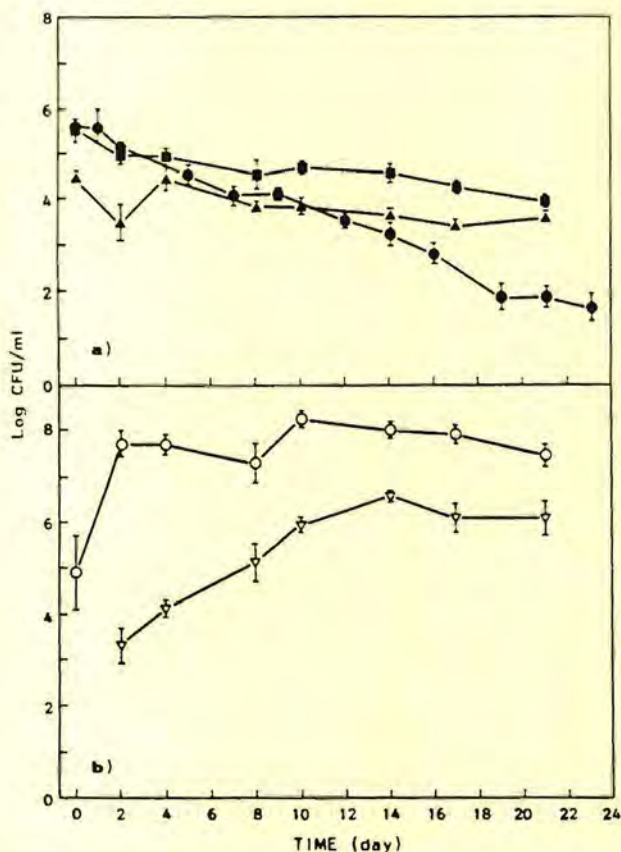


FIG. 1. Growth and survival of *E. coli* in the following non-enriched (a) and enriched (b) seawater media: SW collected in January (●) and May (▲), SWGB (■), M63 (▽), and SWP (○). SWGB, M63, and SWP were made from seawater collected in May. Bars represent standard deviations from three CFU enumerations.

increased rapidly the first 2 days and then at a lower rate to a level of approximately  $5 \times 10^{-8}$  U per cell (Fig. 3a).

In more nutrient-rich media, the number of cultivable cells increased rapidly in the presence of peptone (SWP) and at a lower rate in minimum medium (M63) (Fig. 1b). The development of hydrolase activity in SWP showed a different pattern than that in SW and SWGB. The activity was low and relatively constant during the first 17 days but then increased to approximately  $5 \times 10^{-11}$  U per cell (Fig. 3b). The hydrolase activity of bacteria cultivated in medium M63 increased rapidly the first 2 days (Fig. 3b), as in SW and SWGB, but to a lower level than in these two media. The enzyme activity in M63 at time zero was not calculated since the number of CFU was not available, but it was estimated to be of the same magnitude as in the other media. In seawater with no or a very low concentration of organic material (UV-irradiated water), the MUHase activity was 3 orders of magnitude lower than in nonirradiated water (Table 1).

Bacterial enzymes acting on MU compounds in natural water are described as extracellular (11) and are at least partially cell bound, since enzymatic activity was retained on the filter after filtration of cell suspensions through a 0.22- $\mu$ m-pore-size filter. Different factors may have an influence on MUHase activity; a change in osmolarity in the external environment could be one of them. *E. coli* may adapt to environments with high osmolarity by intracellular accumulation of compatible solutes, such as glycine betaine

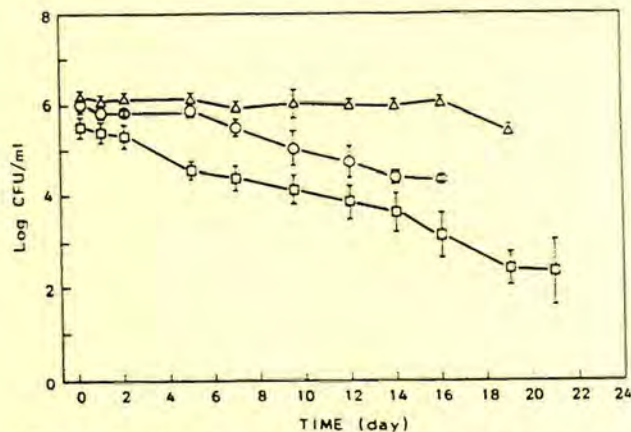


FIG. 2. Survival of *E. coli* in SW (collected in January). Enumeration was done by spread plating (CFU) (□), DVC (○), and AODC (△). Bars represent standard deviation from three CFU enumerations or counting of 200 cells or 20 fields (DVC and AODC).

(13, 14), an osmoprotectant able to enhance growth rates when sufficient nutrients are provided (15, 17). The high levels of enzyme activity in seawater with and without osmoregulator compared with activity in SWP (Fig. 3) indicate that increased salt concentration was not the cause of MUHase activity in *E. coli* in the present study.

The accumulation of osmoregulators balances external osmolytes so that cell turgor is maintained, but the accumulation must also be compatible with the function of intracellular enzymes. It has, however, been demonstrated that accumulation of glycine betaine may decrease enzymatic activities in *E. coli*;  $\beta$ -galactosidase activity was shown to be reduced by 40 to 70% in cells from the exponential growth phase (3, 6). In the present study, MUHase activity was lowered by 70 to 90% in seawater with glycine betaine, compared with activity in untreated seawater, in cultures with decreasing CFU.

It has previously been demonstrated that several proteins are induced in *E. coli* during nutrient limitation, and some of these are likely to be involved in conferring resistance to starvation, while others may be concerned primarily with preparing the cell for escape from starvation (9, 21). In all media except for the peptone-enriched medium, MUHase activity increased by 2 to 3 orders of magnitude within 2 days. In this initial phase, the majority of the bacterial cells were culturable, as demonstrated by the high (Fig. 1a) or increasing (Fig. 1b) number of cultivable cells. An increase in MUHase activity can, therefore, be assumed to be related to cells which are not undergoing lysis but which may be adapting to conditions of nutrient limitation by producing enzymes active on naturally occurring organic molecules accessible as substrates. This interpretation is supported by results of the experiment in which *E. coli* was exposed to seawater with no or very small amounts of natural organic compounds, with enzyme activity 3 to 4 orders of magnitude lower than in seawater containing organic matter (Table 1).

The initial increase of MUHase activity in minimum medium containing glucose (Fig. 3b) contradicts the hypothesis that production of MUHase is related to adaption to nutrient limitation and supports the hypothesis that the cells reduce metabolism when exposed to low-nutrient conditions. However, because CFU numbers remained low during the first 8 to 10 days after inoculation (Fig. 1b), the cells were not assimilating glucose during this period to the same extent

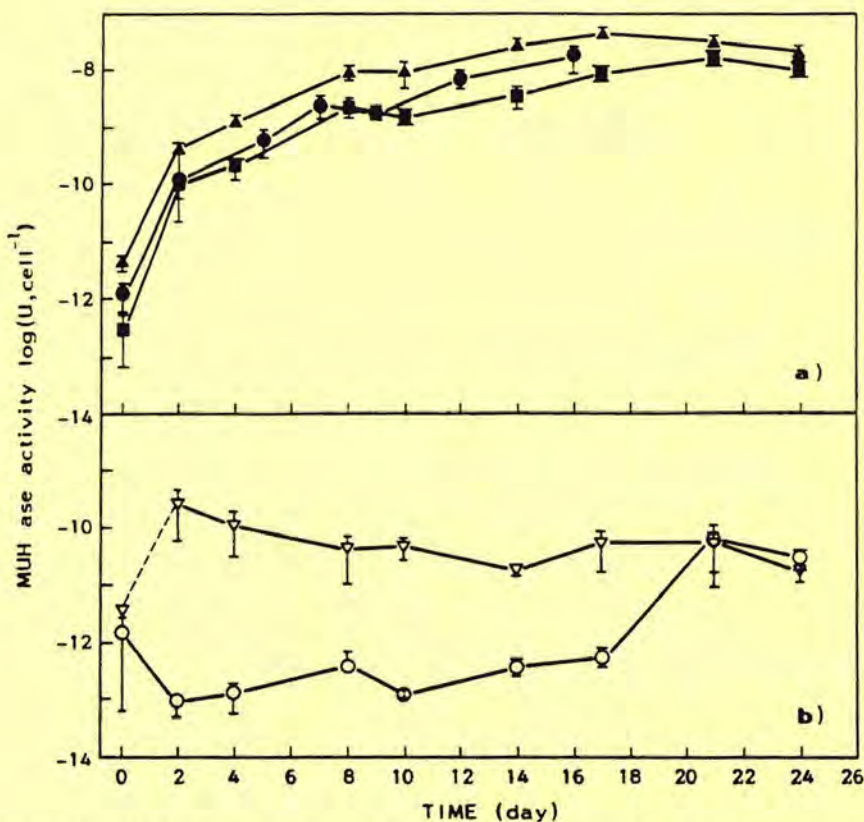


FIG. 3. Production of MU from MU heptanoate by *E. coli* in the following nonenriched (a) and enriched (b) seawater media: SW collected in January (●) and May (▲), SWGB (■), M63 (▽) (cellular activity at  $t = 0$  in M63 was stipulated because the number of CFU was not available), and SWP (○). SWGB, M63, and SWP were made from seawater collected in May. Bars represent standard deviations of the ratio between CFU and MUase activity, from three CFU enumerations and two MUase activity measurements.

as during active growth. If the initial assimilation of glucose in the present study was low because of a lack of growth factors, this may explain the production of MUase during the same period. When growth factors are released from dead cells, assimilation of glucose increases, and enzyme activity is not increased further. It has previously been demonstrated that adaptation of *E. coli* to starvation stress during exposure to seawater is not accurately described simply as a gradual decrease in metabolic functions, since cellular activity of alkaline phosphatase was enhanced (16).

The results obtained with peptone-enriched medium may support the assumption that the production of MUase is related to the availability of nutrients, since MUase activity was low during the exponential growth phase. The activity remained low, however, also in the stationary phase

(Fig. 1b and 3b), when nutrients were limited. At the end of the experimental period, activity increased to the same level as in glucose-enriched medium. The relation between nutrient limitation and MUase activity therefore seemed to be of a different character in SWP than in the other media.

The pool of dissolved and particulate organic material in seawater consists of different organic compounds, many of which are bacterial nutrients, e.g., sugars, amino acids, and carboxylic acids (1). The amount of organic material may have been too low in January to sustain a constant number of culturable cells but sufficiently abundant to induce MUase activity to almost the same level as in May. The difference found between MUase activities in waters collected in January and May may confirm results (Table 1) showing that MUase activity depends on the amount of organic material in the seawater.

Upon being exposed to natural seawater, *E. coli* cells maintained cellular integrity for more than 2 weeks, as demonstrated by AODC. As previously shown by others (8, 20, 23), a portion of the cells remained viable even if they were not culturable (Fig. 2). Further investigations on protein production under nutrient-limiting conditions should be done to elucidate the relation between this production and the change of culturable bacteria into viable, nonculturable cells.

TABLE 1. MUase activity of *E. coli* exposed to seawater with different organic carbon contents

Exposure time (days)	MUase activity (log U/cell) in seawater		
	Natural	Natural + organic C <sup>a</sup>	UV-irradiated with low organic C content
0	-12.53	-12.10	ND <sup>b</sup>
2	-9.94	-10.59	ND
19	-7.22	-7.43	-10.51
26	ND	ND	-10.72

<sup>a</sup> Glucose (0.5 mg/liter) and glycine (0.5 mg/liter; Sigma) were added after 6 days of exposure.

<sup>b</sup> ND, Not determined.

We thank The Royal Norwegian Council for Scientific and Industrial Research (NTNF) and Elf Aquitaine for their financial support (fellowships to L.F.).

## LITERATURE CITED

1. Azam, F., and B. C. Cho. 1987. Bacterial utilization of organic matter in the sea, p. 251-281. In M. Fletcher, T. R. Gray, and J. G. Jones (ed.), *Ecology of microbial communities*. Society for General Microbiology, Cambridge.
2. Berg, J. D., and L. Fiksdal. 1988. Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone- $\beta$ -D-galactoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2118-2122.
3. Eshoo, M. W. 1988. *lac* fusion analysis of the *bet* genes of *Escherichia coli*: regulation by osmolarity, temperature, oxygen, choline, and glycine betaine. *J. Bacteriol.* 170:5208-5215.
4. Evans, D. G., D. J. Evans, Jr., and W. Tjoa. 1977. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.* 18:330-337.
5. Feng, P. C. S., and P. A. Hartman. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1320-1329.
6. Gæver, H. M., O. B. Styrvold, I. Kaasen, and A. R. Strøm. 1988. Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:2841-2849.
7. Godsey, J. H., M. R. Matteo, D. Shen, G. Tolman, and J. R. Gohlke. 1981. Rapid identification of *Enterobacteriaceae* with microbial enzyme activity profiles. *J. Clin. Microbiol.* 13:483-490.
8. Grimes, D. J., and R. R. Colwell. 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:161-165.
9. Groat, R. G., J. E. Schultz, E. Zychlinsky, A. Bockman, and A. Matin. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. *J. Bacteriol.* 168:486-493.
10. Hobbie, J. E., R. J. Daley, and S. Jasper. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33:1225-1228.
11. Hoppe, H.-G. 1983. Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11:299-308.
12. Kogure, K. U. Simidu, and N. Taga. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* 25:415-420.
13. Landfald, B., and A. R. Strøm. 1986. Choline-glycine betaine pathway confers high level of osmotic tolerance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 165:849-855.
14. Larsen, P. I., L. K. Sydnes, B. Landfald, and A. R. Strøm. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Arch. Microbiol.* 197:1-7.
15. Le Rudulier, D., and L. Bouillard. 1983. Glycine betaine, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and other members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:152-159.
16. Munro, P. M., M. J. Gauthier, and F. M. Laumond. 1987. Changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater or grown in seawater-wastewater mixtures. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1476-1481.
17. Perroud, B., and D. Le Rudulier. 1985. Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: osmotic modulation. *J. Bacteriol.* 161:393-401.
18. Postgate, J. R. 1976. Death in macrobes and microbes, p. 1-19. In T. R. G. Gray and J. R. Postgate (ed.), *The survival of vegetative microbes*. Cambridge University Press, Cambridge.
19. Robison, B. J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:285-288.
20. Rozak, D. B., and R. R. Colwell. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2889-2893.
21. Schultz, J. E., G. I. Latter, and A. Matin. 1988. Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 170:3903-3909.
22. Trepeta, R. W., and S. C. Edberg. 1984. Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 19:172-174.
23. Xu, H.-S., N. Roberts, F. L. Singleton, R. W. Attwell, D. J. Grimes, and R. R. Colwell. 1982. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.* 8:313-323.

VII - Article 13 :  
Effect of seawater on *Escherichia coli*  
 $\beta$ -galactosidase activity



**Effect of Seawater on *Escherichia coli*  
β-galactosidase activity**

Pommepuy M.<sup>1\*</sup>, L. Fiksdal<sup>2</sup>, M. Gourmelon<sup>1</sup>, H. Melikechi<sup>1</sup>, M.P. Caprais<sup>1</sup>, M. Cormier<sup>3</sup> and R.R. Colwell<sup>4</sup>

<sup>1</sup> IFREMER Laboratoire de Microbiologie, DEL, BP 70, 29280 Plouzané France.

<sup>2</sup> Dept. of Hydraulic and Environmental Engineering, The Norwegian Institute of Technology, 7034 Trondheim, Norway.

<sup>3</sup> UFR Sciences Pharmaceutiques, Laboratoire de Microbiologie, 35000 Rennes France.

<sup>4</sup> University of Maryland Biotechnology Institute, 4321 Hartwick Rd., Room 550, College Park, MD 20740, USA.

Running title: Enzyme activity of *E. coli* in seawater.

Submitted to: Applied and Environmental Microbiology

Date: Dec. 1994

**ABSTRACT**

Several methods for measuring metabolic activity of fecal coliforms based on methylumbelliferyl substrate utilisation have been reported. Because fecal coliforms discharged via sewage into coastal areas are subjected to environmental conditions of elevated salinity, exposure to sunlight, etc., β-galactosidase activity was measured as a better way to monitor viability than plate counting.

*Escherichia coli* was found to a useful model for fecal coliform in waste water using β-galactosidase activity induced by isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG). The mean enzyme activity per cell (A/C) of sewage bacteria and induced *E. coli* were found to be similar (log A/C = -8.5 versus log A/C = - 12,1 for uninduced *E. coli*).

The initial enzyme activity was not dependant on phase growth of the cell (exponential versus stationary phase) or whether marine or fresh water at the time of initial dilution. The osmotic change resulted in a decrease of culturable cells, whereas enzyme activity remained constant. A drastic decrease in number of culturable bacteria followed by a decrease in β-galactosidase activity was observed after exposure to visible light radiation. In this study, the β-galactosidase enzyme is concluded not to be used by *E. coli* as a bulk protein during starvation; furthermore, the results suggest that enzyme is retained in viable but non culturable bacteria with the conclusion that β-galactosidase appears to offer a useful and rapid (25 min) measure of the viability of fecal coliforms and therefore of the water quality of bathing and shellfishing areas.

\* Corresponding author : phone 33.98.22.43.49 - Fax : 33.98.22.45.94  
E. Mail address : pommepuy@ifremer.fr

Both disposal of urban wastewater into rivers and non-point source run-off comprise major sources of pollution of near-shore and coastal areas. Where such pollution occurs, sewage bacteria exposed to environmental conditions pose a public health problem that is difficult to define (16, 19, 30), because important factors influencing bacterial survival in seawater are temperature, organic matter (15) and light radiation (3, 9, 36) or combined effects (37). Furthermore, dilution of sewage discharged into coastal waters can reduce bacterial contamination, however, the bacteria, including pathogens, may survive for days, months, or longer (31, 34).

Fecal contamination of coastal waters usually is estimated by fecal coliform counts. Rapid and low cost methods have been developed to improve the reliability of monitoring, as well as to provide information more quickly. Recently, several methods, based on methylumbelliferyl (MU) substrate utilization by fecal coliforms have been reported. Usually, MU substrate is added to the culture medium (18, 23, 29) or mixed directly into the sample for fluorimetric assay (2, 5, 13). Such procedures are based on active  $\beta$ -galactosidase activity of fecal coliform bacteria.

The objective of the study presented here was to evaluate the galactosidase activity of *Escherichia coli* in natural waters and the effect of environmental conditions on that enzyme activity.

## MATERIALS AND METHODS

*E. coli* strain H10407 from Evans isolated was provided by B. Joly, Université de Clermont-Ferrand, France. Working stock cultures were maintained on Tryptone Soy Agar (Oxoid).  $\beta$ -galactosidase induction was achieved using Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) (Sigma chemical Co., St. Louis, Mo.) added to a basal medium (Oxoid), final concentration 10 %, as proposed by Dobrogosz (11). Cultures were grown overnight at 37 °C, with vigorous shaking. Cells from stationary phase were washed two times with physiological saline solution after centrifugation (4 °C, 3000 x g for 20 min). Exponential phase culture was obtained by transferring cells from an overnight culture (200  $\mu$ l) to a flask containing 20 ml of basal medium amended with IPTG, followed by incubation at 37 °C for 5 hr, with shaking. The cells were harvested, washed, and prepared as described above. Bacterial counts of the Tryptone Soy Broth (Oxoid) cultures were done, after incubation for 24 hr at 37 °C.

**ENVIRONMENTAL SAMPLES:** Water samples were collected from a sewage treatment plant employing secondary treatment with activated sludge (Maison Blanche, 29200 Brest, France). Fecal coliforms were recovered using MacConkey medium (Merck, Germany), with incubation of inoculated media for 24 hr at 44.5 °C.

**MICROCOSM EXPERIMENTS:** Experiments were carried out using 1 l borosilicate glass flasks (Duran) containing 800 ml of autoclaved, synthetic seawater (Instant Ocean, Aquarium Systems, France). The flasks were inoculated with *E. coli* at a concentration of  $10^7$  cells per ml. Experiments were also carried out using natural seawater collected at Argenton, France, (salinity of 34 ‰) sterilized by filtration (0.22 $\mu$ m filter, Millipore). The cultures were incubated at 15 °C, in the dark, with gentle stirring. Experiments using waste water diluted in synthetic seawater were carried out under the same conditions as with pure cultures of *E. coli*.

In the light exposure experiments, flasks were placed in an incubator (New Brunswick Scientific Co, Model G25) at 15 °C and exposed to artificial, continuous, visible light from a

bank of seven fluorescent neon lights (Lumilux de luxe Osram, Germany). Light intensity was approximately 800  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$ , measured with a Licor Li 100 instrument (Li-cor, Inc., Lincoln, Nebraska). Half the samples were incubated in the dark by covering the flasks with aluminium foil. All samples were incubated for ten days with shaking (180 rpm).

**$\beta$ -GALACTOSIDASE ASSAY.** Water samples were filtered using 0.22  $\mu\text{m}$  pore size 47 mm diameter membrane filters (Polycarbonate Nuclepore Costar Sc. Corp.). Each filter was placed in a 250 ml flask containing 13.5 ml sterile 0.05 M phosphate buffer (pH. 7.9) and 0.05% sodium lauryl sulfate (SLS) (Sigma Chemical Co). MUGal [0.25 mg/ml in buffer + SLS (Sigma Chemical Co)] was dissolved by heating to 70  $^{\circ}\text{C}$ . *ca.* 9 ml of the solution was added to each flask and to a sterile control flask containing 13.5 ml buffer and 0.05% SLS. The flasks were incubated in a water bath shaker at 44.5  $^{\circ}\text{C}$ . Fluorescence of sample aliquots was measured at 5 min intervals for 25 min using a Sequoia Turner instrument Model 450 (OSI), with excitation set at 369 nm and emission at 450 nm, after addition of 100  $\mu\text{l}$  10 M NAOH to 2.5 ml of sample in each cuvette. Enzymatic activity was measured as production rate of MU ( $\mu\text{M min}^{-1}$ ), determined by least square linear regression.

Resistance of  $\beta$ -galactosidase to inactivation was investigated using chloramphenicol (final concentration of 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). After addition of chloramphenicol, the cultures were incubated for 1 hour at 37  $^{\circ}\text{C}$  at the end of stationary phase ( $\text{OD}_{600}=0.36$ ) and during exponential phase ( $\text{OD}_{600}=0.13$ ). MUGalase activity was measured, comparing chloramphenicol treatment with controls (untreated). Results were confirmed using API 20E (Bio Merieux).

Several disinfection procedures for *E. coli* were compared, including addition of chlorine, peracetic acid, or formalin. Controls were autoclaved. Cells were also exposed to repeated cycles of freezing and thawing. In some experiments lysozyme was also added before the freeze-thaw treatment. The effect of different treatments was monitored using direct counting by epifluorescent microscopy (Carl Zeiss Jena - Jenamed) and plate counts.

## RESULTS AND DISCUSSION

To determine  $\beta$ -galactosidase activity of *E. coli* under different physiological conditions, cultures were grown in a medium with and without IPTG, a non metabolizable inducer. Cultures of *E. coli*, both induced and uninduced, were diluted in seawater (1/100). Corresponding ( $T_0$ ) cell number and enzyme activity values are shown in Fig. 1. Uninduced *E. coli* cells were characterized by low enzyme activity ( $\log U$ ) at high cell numbers (CFU). Enzyme activity of induced cells was 1000 times higher when cell numbers remained unchanged (Fig. 1). Initial enzyme activity per cell ( $\log \text{AC}/c$ ) of uninduced cells varied from -11.9 to -12.2, while activity of induced cells ranged from -8.0 to -9.0.

Induced cell suspensions of *E. coli* were diluted in artificial seawater (1/100) to establish whether a correlation (Fig. 1) existed between numeration and enzyme activity of cells under the same physiological conditions. The slope of the correlation line was found to be approximately 1 ( $\log \beta\text{-gal} = 0.98 \log \text{CFU} - 5.34$ ;  $r = 0.95$ ).

Enzyme activity and corresponding culturable cell number of fecal coliform bacteria in seawater dilutions of sewage were measured. From the results obtained (Fig. 1), it was found that the mean enzyme activity per cell, for the sewage bacteria, was similar to that of induced *E. coli* cells ( $\log \text{AC}/c = -8.5$ ).

Separate  $T_0$  data sets were obtained for induced *E. coli* and sewage bacteria, respectively. Enzyme activity and FC counts were fitted to a line, using weighted least squares. The slope and intercept, respectively, of each fit were tested using an F- test and were found to be the same. The significance level of the test was set at  $p < 0.05$  and the two data sets were combined (Fig. 1). Least square was used to obtain global slope and intercept:  $\log \beta\text{-gal} = 0.82 \log \text{CFU} - 4.90$ , with a correlation coefficient of  $r = 0.97$  and  $n = 41$ .

The range of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase activity observed in this study was found to depend on growth conditions. Selected values are presented in Table 1, for experiments 1-4, in which *E. coli* was grown with, and without, IPTG. In these experiments, cells in the logarithmic phase of growth, were diluted (dilution 1/100) in fresh water and seawater (34 ‰). Enzyme activity was measured at  $T_0$ . A significant difference was observed between uninduced and induced cells, whereas no significant difference ascribable to salt concentration (seawater versus fresh water) was detected. The experiments reported here were carried out using bacteria in exponential and stationary phase (5-6 and 5b-6b) of growth, with no significant changes observed due to the growth phase, even with a different level of induction of the cells.

Chloramphenicol (5-6) added to the culture medium did not affect  $\beta$ -galactosidase activity at a very high concentration (Table 1), i.e., increase of  $\leq 1$  log activity. These results are in agreement with the API 20E data (Table 2), clearly demonstrating that metabolic activity, except  $\beta$ -galactosidase, was inhibited by chloramphenicol.

Thus, the results obtained in this study indicate that *E. coli*  $\beta$ -galactosidase activity can range over a relatively large scale, depending on culture conditions, mainly whether or not induction has occurred. In our experiments, higher values were obtained using IPTG, with. The values were similar to those obtained with fecal coliforms in natural waste water samples. Thus, this protocol, i.e., microcosms with *E. coli* strains, appears to simulate natural conditions rather closely. Initial enzyme activity is concluded to be associated with growth condition at the time of initial dilution, and not to water quality.

The effect of osmotic stress on numbers of cells and  $\beta$ -galactosidase activity for *E. coli* grown with, and without, IPTG was then studied by exposing *E. coli* cells in the exponential phase of growth to fresh water and seawater, respectively. Cell number and enzyme activity remained constant for uninduced and induced cells during exposure in fresh water (Table 3). In seawater, however, the culturable cell number decreased by several log units during exposure, while the enzyme activity of induced and uninduced cells remained constant. In seawater, enzyme activity per culturable cell, therefore, appeared to increase with time. Similar results were obtained when *E. coli* cells in the stationary phase of growth were exposed to seawater (data not shown), even through survival of *E. coli* in the stationary phase has been reported to be greater than of cells in exponential phase (21).

The effect of osmotic stress on cultural bacterial counts and on  $\beta$ -galactosidase activity of induced *E. coli* was compared with fecal coliform bacteria in sewage (Fig. 2). Results of two types of experiments are reported, as follows. With high initial cell numbers of *E. coli* ( $\log \text{CFU}/100\text{ml} = 8$ ) and high enzyme activity, cell numbers decreased while enzyme activity remained constant during exposure. Similar results were found with *E. coli* cells with a lower level of induction. In comparison, sewage bacteria exposed to seawater yielded more rapid reduction in cell number than enzyme activity (3 logs and 1 log, respectively) during exposure.

Resistance of *E. coli*  $\beta$ -galactosidase to inactivation, when different means of disinfection were used proved interesting. After autoclaving, addition of chlorine, or addition of formalin, neither enzyme activity nor culturable cells could be detected. When cells were exposed to repeated cycles of freezing and thawing, the cell number decreased, compared to controls, while enzyme activity remained constant. Cell number and enzyme activity were rapidly reduced when lysozyme was added to cells before freeze-thaw treatment. Direct counting (data not shown), using epifluorescence microscopy, confirmed that whole cells could not be detected after lysozyme-freezing treatment, while 90% of the cells remained intact after freezing-thawing. Peracetic acid treatment (5ppm final concentration) resulted in both decrease in number of culturable bacteria and enzyme activity.

Effect of  $\beta$ -galactosidase activity on *E. coli* after light treatment for several days, compared to controls incubated in the dark, was decreased enzymatic activity and bacterial counts (Fig. 3). Bacterial number in controls was reduced by one log unit/day, while enzymatic activity remained more or less the same (7-10 days). The first day of light treatment yielded similar results, namely decrease in count (3 log/unit/day), while enzyme activity remained constant. Thereafter, with light treatment, culturable bacteria could not be detected and enzyme activity rapidly decreased to a low, but detectable, level. An effect of the light treatment was detected for both cell counts and enzyme activity at three days.

Monitoring water quality in coastal areas most frequently is done employing methods based on detection of  $\beta$ -galactosidase activity of coliform and fecal coliform bacteria, e.g., plate counts, most probable number estimations, and enzyme activity assays (2, 13, 23, 29).

The variability of  $\beta$ -galactosidase activity in *E. coli* in pure culture and in fecal coliform bacteria collected from polluted coastal areas may arise from whether or not the cells are induced. When an inducer, Isopropyl-  $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG), was used, enzyme activity increased by 3 log units, compared to uninduced cells. These results are in agreement with those of Lewin (22) and Freidelder (14), showing protein synthesis occurs in *E. coli* when lactose is the inducer. Enzyme activity, using lactose and IPTG, respectively, was found to be the same (data not shown). Because lactose is metabolized by *E. coli*, and can affect *E. coli* behavior during exposure to various environmental conditions, IPTG was used as inducer in the studies reported here, as by Diehl (10).

Our results demonstrate that the level of enzyme activity of fecal coliforms in sewage is similar to that of induced *E. coli* cells and that  $\beta$ -galactosidase activity of fecal coliform bacteria is maintained at the induced level, even after exposure to seawater for several days. Other investigators have demonstrated that environments contaminated by sewage are favorable to survival of fecal coliforms. Dupray and Derrien (12) demonstrated that *Salmonella spp.* in sewage effluent are able to synthesize osmoprotective compounds, contributing to survival and retention of culturability in seawater. When seawater medium was enriched with sewage, Munro *et al.* (28) demonstrated increased survival of *E. coli*.

Both the genetics and physiological state of *E. coli* cells are important in enzyme expression (24). However, results of studies reported here indicate that whether cells were in exponential or stationary growth phase was not a factor in  $\beta$ -galactosidase activity, i.e.,  $\beta$ -galactosidase was similar for cells suspended in fresh water and in seawater, even through a decrease in cell number occurred more rapidly for bacteria in the exponential growth phase, as previously demonstrated by Kolter (21). Induction did not have an influence on survival of *E. coli* in seawater and the difference between enzyme activity induced and uninduced cells was the

same, whether the cells were exposed to fresh water or seawater.  $\beta$ -galactosidase enzyme was, therefore, not degraded by endogenous metabolism of bacteria in seawater, but, instead, was maintained.

Enzyme activity and culturability of cells incubated in the light and in the dark in seawater were different. That is, culturable cell number decreased, whereas enzyme activity remained constant (in the dark). Enzyme activity per culturable cell appeared to increase, but more probable is the explanation that both culturable and nonculturable cells retain  $\beta$ -galactosidase activity (8). Similar results were obtained for fecal coliform bacteria in waste water mixed with seawater. Different environmental conditions (e.g. salinity, temperature, and nutrient concentration), can affect the physiological state of a cell and the relationship between number of culturable cells and viable but nonculturable cells is important. An apparent increase of  $\beta$ -galactosidase activity per culturable fecal coliform, when the number of cells decreased in polluted coastal areas, has been reported (13). Of course, such an increase could be a response to environmental changes and enzyme induction, but more likely it is a result of the increase in viable, but non-culturable bacteria, leading to an apparent increase in activity per cell.

The first hypothesis, induction of enzyme activity during conditions not optimal for growth, has been discussed by several authors. Increased enzyme activity during starvation or other conditions of stress has been described as a bacterial answer to environmental changes (20). According to Matin *et al.* (25), bacteria generally increase their content of scavenging enzyme, in response to deprivation of specific nutrients. However, these hypotheses are not supported by results of the present study with respect to  $\beta$ -galactosidase activity. When *E. coli* cells were exposed to seawater without inducer,  $\beta$ -galactosidase activity did not increase. Cyclic AMP levels increase significantly, e.g. during carbon starvation (6, 7, 26), but such changes alone cannot account for enzyme regulation during reduction in nutrient concentration (35). In the studies reported here,  $\beta$ -galactosidase activity in induced *E. coli* cells was reduced during exposure to seawater. Moreover, when IPTG was added to the culture medium of pure cultures of *E. coli* in seawater at the beginning of stationary phase of growth, increase of  $\beta$ -galactosidase activity was not observed. These results do not support the theory that  $\beta$ -galactosidase activity of *E. coli* cells is increased by induction during exposure to seawater.

However, the observed increase in enzyme activity per culturable cell is best explained by  $\beta$ -galactosidase activity being retained in nonculturable cells, since nonculturable cells have been shown to retain (and produce)  $\beta$ -galactosidase (8). Using enzyme methods (4-MU derivatives), the enzyme activities occur in few minutes: the substrate which enters the cell is a result of activity of appropriate permease or other process (4) and so suggest active metabolism in viable cells. Lewin (22) showed that rapid degradation of proteins and messenger RNA occurred in bacteria in the absence of nutrient. Gourmelon *et al.* (17) demonstrated a loss of protein (20-40%) upon 72 hours exposure of *E. coli* to seawater. Protein synthesis, especially during the first hours after onset of starvation, has been demonstrated to be essential for the longevity of starvation, with amino acids derived from degradation being utilized by bacteria for new protein synthesis (32). After a period of time, modification of cellular compounds may occur (27). Results of our study indicate that  $\beta$ -galactosidase is not used as bulk protein for starvation response.

Additional findings from our study were that exposure to chlorine or formalin, as well as autoclaving (control), caused destruction of both cells and  $\beta$ -galactosidase. After repeated freezing and thawing, there was no direct correlation between culturability and enzymatic activity during exposure to seawater. Cell numbers decreased in the initial exposure, after

which either regrowth or « recovery » of cells occurred, while enzyme activity/l remained the same, probably due to lack of inducer in exposure medium (fresh or marine water). When cells were treated with lysozyme and then subjected to repeated freezing and thawing cycles, the cells were destroyed (confirmed by microscopic observation) and  $\beta$ -galactosidase activity disappeared. These results indicate that enzyme activity observed after freeze-thaw treatment was that of intact, viable, non culturable bacteria surviving treatment. Direct microscopic observation of the cells (data not shown) indicated 90% of the cells remained intact after treatment, even though non-culturable.

During exposure of *E. coli* cells to light for short periods of time (2 days),  $\beta$ -galactosidase activity remained high, while culturable cell numbers decreased during the first day of light treatment. Bacteria employ different strategies for survival in natural environments and it has been demonstrated that *E. coli* can retain active metabolism without being culturable (33). Persistence of  $\beta$ -galactosidase activity in *E. coli* cells for more than ten days of exposure to seawater has also been demonstrated (1, 28).

The relationship observed between  $\beta$ -galactosidase activity and cell number when dilutions of *E. coli* were analyzed indicate that, under conditions suitable for growth, enzyme activity per cell is not dependent upon cell number (the slope of the correlation line, based on logarithmic number, was observed to be equal to one). When *E. coli* and coliform bacteria are exposed to natural environmental conditions, e.g. seawater, the slope of the relationship changes, demonstrating loss in culturability of the cells, but not death of the cells, i.e., entry of cells into a viable but nonculturable state. Upon initial exposure to seawater,  $\beta$ -galactosidase activity of  $\log U < 4$  was found to correspond to  $10^4$ FC/100 ml, but at the end of the time of exposure the same activity was calculated to represent  $10^2$ FC/100 ml, or less. In other field investigations, Fiksdal *et al.* (13) showed that this level of enzyme activity would correspond to an even lower concentration of cells (10-15 FC/100 ml). AODC counts give different results than these culturable counts, adding greater verisimilitude to the hypothesis that viable but nonculturable *E. coli* remain metabolically active, i.e.  $\beta$ -galactosidase active. Comparison of cell number-enzyme activity relationships for fecal coliform bacteria under similar conditions indicates the slope of the correlation line can reflect differences in cellular response. The greater the slope, the more likely the cells will have converted to a viable but nonculturable state. Such conclusions, i.e., relative to activity/viability and degradation, can be drawn from results of experiments with sewage bacteria.

In summary, the rapid  $\beta$ -galactosidase test offers a useful measurement of fecal coliforms, but such results must be interpreted with care, since viable but nonculturable *E. coli* retain  $\beta$ -galactosidase activity. It is also useful to compare direct counts employing fluorescent labeled antibody, or more usefully, nucleic acid probes designed for enumeration of *E. coli* and/or coliforms. Until such probes are available, it must be understood that culturable counts are fraught with the potential of providing misleading conclusions, relative to water quality and public health concerns.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Anderson .I.M., Rhodes M., Kator H.I., 1979. Sublethal stress in *Escherichia coli*: a function of salinity. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**: 1147-1157.
2. Apte S.C., Batley G.E., 1992. Rapid detection of sewage contamination in marine waters using a fluorometric assay of  $\beta$ -D-galactosidase activity. *The Science of the Total Environment*, **141**: 175-180.
3. Barcina I., Gonzalez J.M., Irriberi J. and Egea L., 1989. The effect of visible light on progressive dormancy of *E. coli* cells during the survival process in natural freshwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 246-251.
4. Bascomb S., 1987. *Methods in microbiology*. Vol 19. Current methods for classification and identification of microorganisms. R.R. Colwell and R. Grigorova Ed. Academic Press.
5. Berg, J.D., Fiksdal, L., 1988. Rapid detection of total and faecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone- $\beta$ -D-galactoside. *Appl. Environ. Microbiol.* **4**: 2118-2121.
6. Botsford J.L. and M. Drexler, 1978. The cyclic 3'5'-adenosine monophosphate receptor protein and regulation of cyclic 3'5'-adenosine non phosphate synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.*, **165**: 47-56.
7. Botsford J.L., 1981. Cyclic nucleotides in procaryotes. *Microbiol. Rev.*, **7**: 1513-1523.
8. Byrd J.J., C.N. Kaspar, M.L. Tamplin and R.R. Colwell. The presence of  $\beta$ -galactosidase activity in non culturable *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* (in press).
9. Davies-Colley R.J., R.G. Bell and Donnison A.M., 1994. Sunlight inactivation of *enterococci* and fecal coliforms in sewage effluent diluted in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2049-2058.
10. Diehl J.D., 1991. Improved method for coliform verification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 604-605.
11. Dobrogosz W.J., 1981. Enzymatic activity, in *Manuel of methods of general bacteriology*. A.S.M.: 365-392.
12. Dupray E., A. Derrien and R. Pichon. Osmoregulation by trehalose synthesis in *Salmonella manhattan* after exposure to waste waters. *Letters in Appl. Microbiol.* (in press).
13. Fiksdal L., M. Pommepuy , M.P. Caprais, I. Midttun, 1994. Monitoring of fecal pollution in coastal waters by use of rapid enzymatic techniques. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 1581-1584.
14. Freidelder D., 1990. *Biologie moléculaire*. Ed. Masson, 335 p.



15. Fujoka R.S., H.H. Mashimoto, E.B. Swak and R.H.F. Young, 1981. Effect of sunlight on survival of indicator bacteria in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**:690-696.
16. Garcia-Lara J., P. Menon, P. Servais and G. Billen, 1991. Mortality of fecal bacteria in seawater, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**: 885-888.
17. Gourmelon M., J. Cillard, M. Pommepuy, 1994. Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater: oxidative stress hypothesis. *J. of Appl. Bact.*, **77**: 105-112.
18. Hernandez J.F., J.M. Guibert, J.M. Delattre, C. Oger, C. Charrière, B. Hugues, R. Serceau and Sinegre F., 1991. Evaluation of a miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia coli* in seawater, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide, *Wat. Res.*, **25**: 1073-1078.
19. Jensen M. and J.J. Linde-Jensen, 1992. Improvement of bathing water quality by reduction of urban outlets: case study for the beach of Rødving, Denmark, *Wat.Sci. Tech.*, **25**: 101-113.
20. Kjelleberg S., Hermansson M., Marden P. and Jones G., 1987. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**: 25-49.
21. Kolter R., 1992. Life and death in stationary phase, *ASM News*, **58**: 75-79.
22. Lewin B., 1988. Une panoplie d'operons: le modèle operon lactose et d'autres exemples. Chap. 10, In *Genes. Ed. Med. Sciences. Flammarion*, 219-247.
23. Mc-Feters, G.A., Pyle B.H., Gillis S.J., Acomb C.J., Ferrazza D., 1993. Chlorine injury and the comparative performance of colisure, colibert and coliquik for the enumeration of coliform bacteria and *E. coli* in drinking water. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 27, n° 3-4, 261-265.
24. Martins, M.T., Rivera, I.G., Clark, D.L., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., Olson B.H. (1993). Distribution of UidA mid gene sequences in *E. coli* isolated in water sources and comparison with the expression of  $\beta$ -glucuronidase activity in 4-Methylumbelliferyl- $\beta$ -d-Glucuronide Media. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 2271-2276.
25. Matin A., E.A.Auger, P.H. Blum and J. Eschultz, 1989. Genetic basis of starvation survival in non differentiating bacteria. *An. Rev. Microbiol.*, **43**: 293-316.
26. Matin A., 1992. Physiology molecular biology and applications of the bacterial starvation response. *J. of Appl. Bact. Symp. Supp.*, **73**:49S-59S.
27. Moyer C.L. and Morita R.Y., 1989. Effect of growth rate and starvation survival on the viability and stability of a psychophilic marine bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1122-1127.
28. Munro P.M., Gauthier M.J., Caumond F.M., 1987. Changes in *Escherichia coli* starved in seawater or grown in seawater-wastewater mixtures. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1476-1481.

29. Palmer, C.J., Tsai, Y.L., Lee Lang, A., Sangermano, L.R., 1993. Evaluation of Colilert Marine Water for Detect Total Coliforms and *Escherichia coli* in the Marine Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 786-790.
30. Pommepuy, M., Guillaud, J.F., Dupray, E., Derrien, A., Le Guyader, F., Cormier, M., 1992. Enteric bacteria survival factors. *Wat. Sci. Tech.*, **25**: 93-103.
31. Pommepuy M., Salomon J.C., 1991. A mathematical model for enteric bacteria in coastal areas. In: *Environmental hydraulics*, Lee & Cheung (Eds): 841-846.
32. Reeve C.A., Bockmand A.T. and Matin A., 1984. Role of protein degradation in the survival of carbon starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **157**, 3: 758-763.
33. Rozack D.B. and R.R. Colwell, 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, **51**: 361-379.
34. Salomon, J.C., Pommepuy, M. (1990). Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary (France). *Wat. Res.*, **24**: 983-994.
35. Schultz J.E., G.I. Latter, A. Matin, 1988. Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. of Bact.*, **170**, 9: 3903-3909.
36. Siton L.W., R.J. Davies-Colley and R.G. Bell, 1994. Inactivation of Enterococci and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2040-2048.
37. Solic M. and N. Krstulovic, 1992. Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Mar. Pollut. Bull.*, **24**, 411-416.

Table 1. Initial ( $T_0$ )  $\beta$ -galactosidase activity (Ac) of *E. coli* H10407 grown under different conditions

	Log culturable bacteria/100 ml	Log Ac/l	Log Ac/c	Log Ac/c (chloramphenicol)
1)	8.98	-3.22	-12.2	
2)	8.92	-3.00	-11.9	
3)	5.00	0.75	-8.0	
4)	5.80	0.58	-9.0	
5)	6.90	1.99	-7.6	(-6.9)
6)	6.11	2.26	-6.8	(-6.0)
5b)	7.00	1.05	-9.0	
6b)	6.64	1.16	-8.5	

- 1.) Without IPTG, exponential phase, fresh water.  
 2.) Without IPTG, exponential phase, seawater.  
 3.) With IPTG, exponential phase, fresh water.  
 4.) With IPTG, exponential phase, seawater.  
 5.) With IPTG, exponential phase, seawater.  
 6.) With IPTG, stationary phase, seawater.  
 5b) With IPTG, exponential phase, seawater.  
 6b) With IPTG, stationary phase, seawater.

Table 2. Effect of chloramphenicol ( $C_p$ ) on selected metabolic activities of *E. coli*, employing API 20E

	Exponential Phase (OD=0,16)	Stationary Phase (OD=0,38)	Exponential Phase (OD=010)	Stationary Phase (OD=0,26)
	Without $C_p$	Without $C_p$	With $C_p$	With $C_p$
ONPG	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-
IND	+	+	-	-
VP	-	-	-	-
GLU	+	+	-	-
MAN	+	+	-	-
SUR	+	+	-	-
RHA	+	+	-	-
MEL	+	+	-	-
ARA	+	+	-	-

Table 3: Activity of *E. coli* (exponential phase) in fresh water and seawater showing culturable bacteria (CFU/100 ml),  $\beta$ -galactosidase activity per liter (Ac/l :  $\mu\text{M MU/min}$ ),  $\beta$ -galactosidase activity per cell (Ac/c:  $\mu\text{M MU/c}$ )

Fresh water	<i>E. coli</i> (without IPTG)			<i>E. coli</i> (with IPTG)		
Time (Days)	Culturable Bacteria	log Ac/l	log Ac/c	Culturable Bacteria	log Ac/l	log Ac/c
T <sub>0</sub>	5.98	-3.22	-12.2	5.0	0.75	-8.0
T <sub>3</sub>	5.34	-2.82	-11.7	5.0	0.20	-8.2
T <sub>7</sub>	5.12	-3.05	-11.2	5.0	0.25	-7.8
<hr/>						
Seawater (30 ‰)						
T <sub>0</sub>	5.92	-3.00	-11.9	5.8	0.58	-9.0
T <sub>3</sub>	4.63	-3.15	-10.6	4.0	0.40	-7.5
T <sub>7</sub>	2.12	-3.30	-8.4	2.5	0.43	-6.0

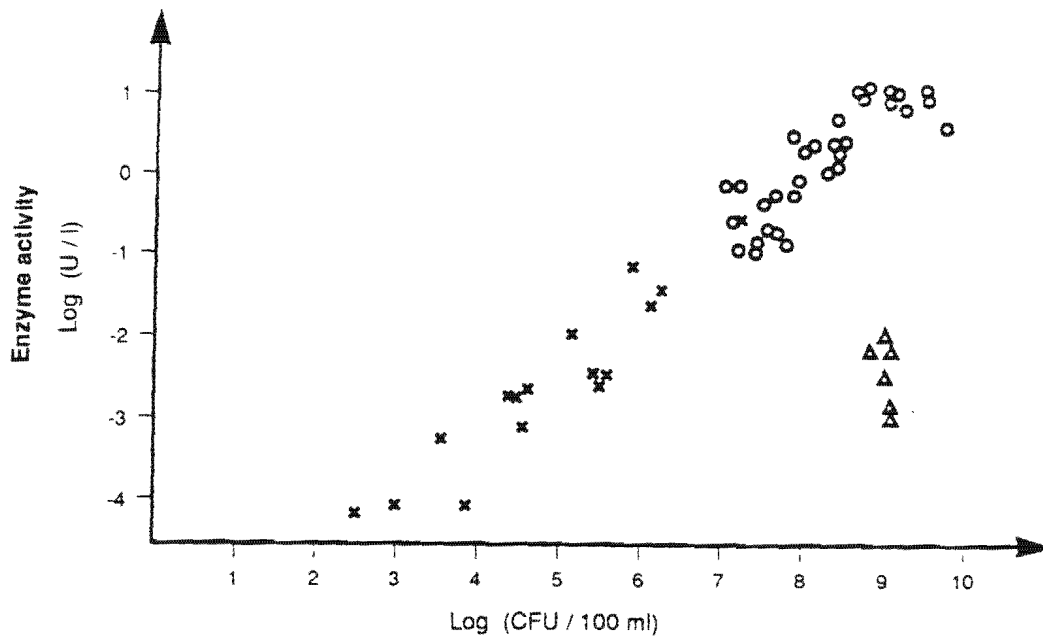


Figure 1: Correlation of cell number and activity of *E. coli* cells and sewage bacteria. x waste water, o: ITPG induced *E. coli*, uninduced *E. coli*

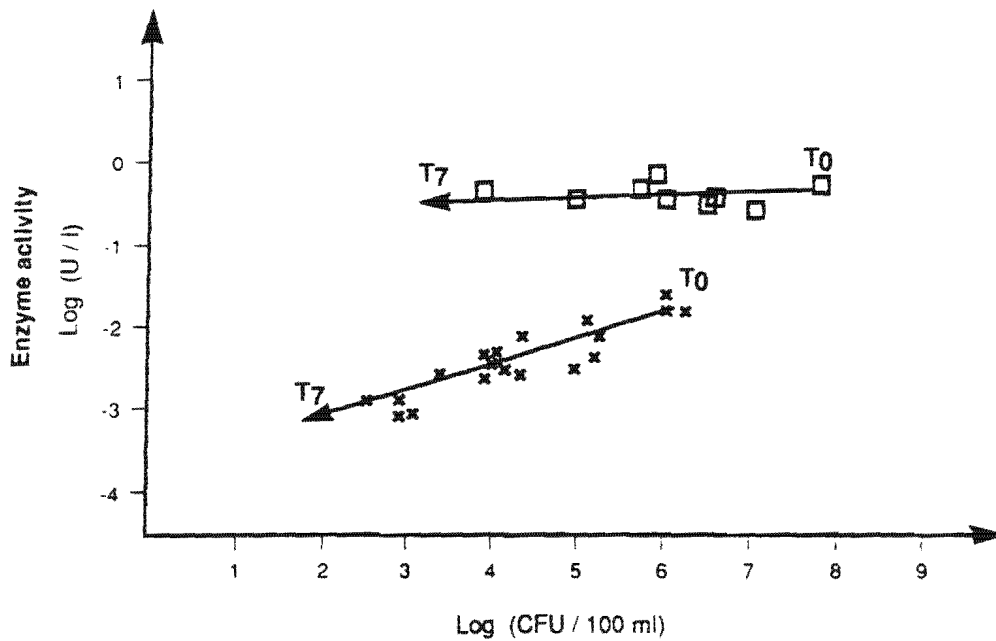


Figure 2: Effect of seawater on  $\beta$ -galactosidase activities of induced *E. coli* (•) and fecal coliform from waste water (x) - T<sub>0</sub>: initial time in seawater, T<sub>7</sub> end of experimentation (7 days).

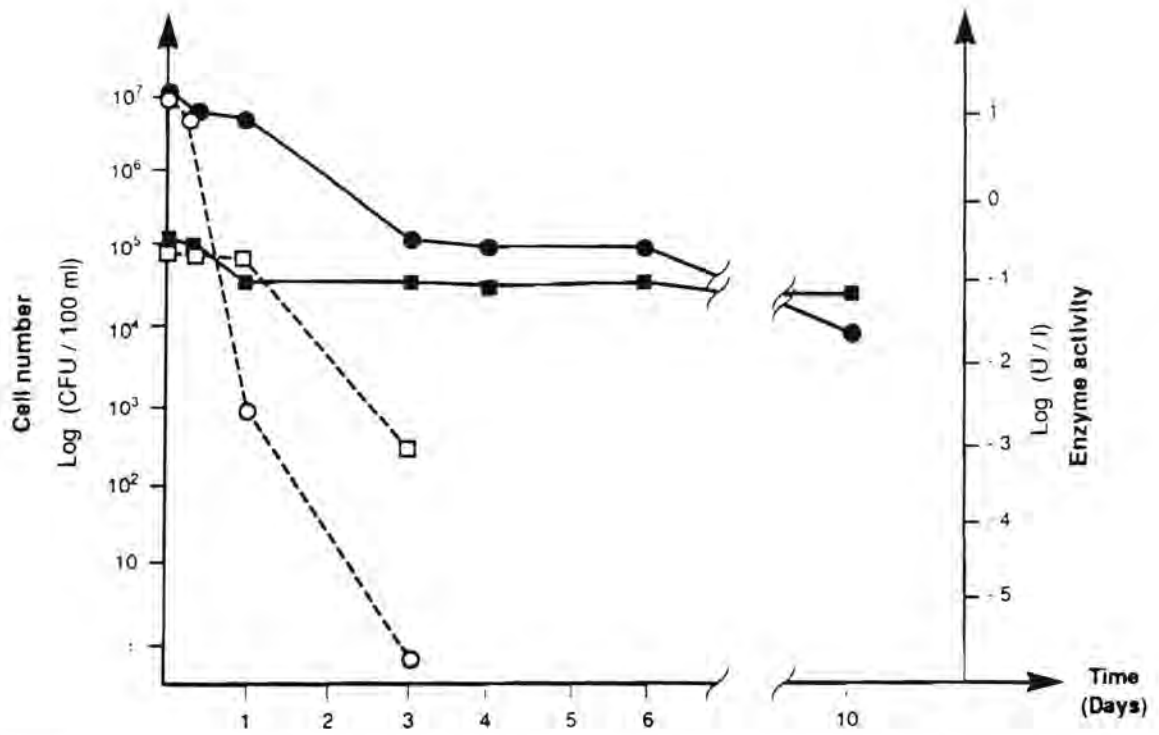


Figure 3: Effect of light radiation on numeration and  $\beta$ -galactosidase activities of *E. coli* immersed in seawater (CFU - o- light, UFC -●- dark, •  $\beta$ -gal (light), ■  $\beta$ -gal dark).

**VIII - Article 14 :**  
**Monitoring of fecal pollution in coastal**  
**waters by use of**  
**rapid enzymatic techniques**

## Monitoring of Fecal Pollution in Coastal Waters by Use of Rapid Enzymatic Techniques

LIV FIKSDAL,<sup>1</sup>\* MONIQUE POMMEPUY,<sup>2</sup> MARIE-PAULE CAPRAIS,<sup>2</sup> AND INGUNN MIDTTUN<sup>1</sup>

Department of Hydraulic and Environmental Engineering, The Norwegian Institute of Technology, University of Trondheim, 7034 Trondheim, Norway,<sup>1</sup> and Laboratory of Microbiology, Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, Centre de Brest, 29280 Plouzané, France<sup>2</sup>

Received 5 November 1993/Accepted 10 March 1994

Enzyme assays for 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranosidase and 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronidase activities were used for rapid detection (25 min) of fecal water pollution and to determine the impact of sewage discharge in coastal waters. Two coastal areas were investigated: (i) an estuary characterized by a high degree of contamination downstream of a discharge from a sewage treatment plant and a low degree of water renewal and (ii) a fjord with a low degree of pollution and a high degree of water renewal. Statistical analysis showed that a global correlation curve could be used to estimate concentrations of culturable fecal coliform bacteria in the two coastal areas, although environmental factors important for cell physiology (e.g., salinity) varied at different sampling locations. The sensitivity limit for detection of 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronidase activity corresponded to bacterial concentrations on the order of 10 to 100 CFU/100 ml. The 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactopyranosidase assay was less sensitive because of a higher rate of substrate autohydrolysis. The detection limit corresponded to bacterial concentrations on the order of 100 to 1,000 fecal coliforms per 100 ml.

Coastal waters are often used for multiple purposes, i.e., as recipients for wastewaters, for recreation, and for aquaculture. Discharges of sewage effluents have a negative impact on the coastal environment and make it less attractive for recreation as well as for aquaculture, which is sensitive to the presence of pathogenic microorganisms and toxic compounds. Occasional pollution by effluents containing human pathogens may result in prohibition of the sale of shellfish and economic loss.

In these areas, water quality has to be monitored. Standard methods for assessing the hygienic quality of water, using either membrane filtration or most-probable-number techniques, require 24 to 72 h to complete. The elapsed time is too great to warn of substandard quality that may require immediate remedial measures.

Fluorogenic methylumbelliferyl (MU) substrates have been used for the last 20 years in bacterial diagnostics for detection of coliform bacteria by enzyme assays (2, 12, 16). 4-MU- $\beta$ -D-galactopyranoside (MUGal) and 4-MU- $\beta$ -D-glucuronide (MUGlu) are hydrolyzed by the enzymes  $\beta$ -D-galactosidase and  $\beta$ -D-glucuronidase, present in coliform and fecal coliform (FC) bacteria, respectively. MU substrates have been used to detect sewage contamination in fresh water (3, 6, 7, 20) as well as in marine waters (13, 21).

Many so-called rapid enzymatic tests require high densities of bacteria, and the completion times are, in practice, around 24 h, almost the same amount of time required for conventional tests. An objective of the present work was to investigate bacterial water quality in coastal areas by use of rapid enzymatic hydrolysis of MUGal and MUGlu. The enzyme assay (25 min) has previously been applied to freshwater samples with MUGal as substrate (3), while MU-heptanoate has been used to enumerate pure cultures of *Escherichia coli* in seawater (11).

A second objective was to evaluate the use of this method in marine waters with MUGal and MUGlu as substrates.

### MATERIALS AND METHODS

**Sampling locations.** The water quality of the Morlaix River and Estuary, located in Bretagne, France, was investigated on 27 April 1992 (neap flood tide) and 4 May 1992 (spring flood tide). Stations -2, -1, and 0 represent river upstream of a biological treatment plant, effluent after primary treatment, and effluent after biological treatment, respectively. The biological oxygen demand, chemical oxygen demand, and suspended solids loading rates were 1,030 kg of O per day, 3,100 kg of O per day, and 4,590 kg/day, respectively, while discharges were 70 kg of O per day, 470 kg of O per day, and 145 kg/day. Salinities at different sites in the Morlaix River and Estuary increased from 3‰ (station -2) to 40‰ (station 9). Water quality of the Bjugn Bay and Estuary, near Trondheim, Norway, was investigated on 25 August 1992 (flood and ebbing tides) and 31 August 1992 (ebb and flooding tides). The bay receives primary treated sewage. The biological oxygen demand, chemical oxygen demand, and suspended solids loading rates were 85 kg of O per day, 170 kg of O per day, and 120 kg/day, respectively, while discharges were 70 kg of O per day, 135 kg of O per day, and 100 kg/day, respectively. Station 3.3 was in the bay, above the sewage outlet; station 3.6 was located in the treatment plant (effluent after primary treatment). Salinities at different sites in the Bjugn Bay varied from 27‰ to 31‰ (stations 3, 3.3, 4, 5).

**FC bacteria.** FC bacteria were recovered by membrane filtration (Millipore filter GA, 47-mm diameter, 0.22- $\mu$ m pore diameter) on MacConkey agar medium (Difco), and CFU were counted after 24 h of incubation at 44.5°C.

**$\beta$ -D-Galactosidase (MUGalase) assay.** Water samples were filtered through a 0.22- $\mu$ m-pore-size, 47-mm-diameter membrane filter (Millipore GTTP). The filter was then aseptically placed in a 250-ml flask containing 20 ml of sterile 0.05 M phosphate buffer (pH 7.9) and 0.05% sodium lauryl sulfate

\* Corresponding author. Mailing address: Department of Hydraulic and Environmental Engineering, NTH, University of Trondheim, 7034 Trondheim, Norway. Fax: 47-7-591298. Electronic mail address: Liv.Fiksdal@IVB.UNIT.NO.



(Sigma Chemical Co.). MUGal (Sigma Chemical Co.) was added at a final concentration of 0.4 mg/ml to each flask containing 20 ml of buffer plus sodium lauryl sulfate and to a sterile control flask containing 20 ml of buffer plus 0.05% sodium lauryl sulfate. The flasks were incubated in a shaking water bath at 44.5°C, and the fluorescence intensity of sample aliquots was measured every 5 min for 25 min with a Perkin-Elmer 3000 spectrofluorometer (excitation at 365 nm, emission at 440 nm) after addition of 100  $\mu$ l of 0.1 M NaOH to a 2.5-ml sample in the cuvette to obtain pH > 10 and maximum MU fluorescence (5). At least two hydrolysis control flasks (blanks) were included per batch of 10 samples. The enzymatic activity measured as the production rate of MU (micromolar concentration per minute) was determined by least-squares linear regression.

**$\beta$ -D-Glucuronidase (MUGluase) assay.** The MUGluase assay was done as described for the MUGal assay, except filters were placed in flasks containing 17 ml of sterile 0.05 M phosphate buffer (pH 6.4) and the assay was started by addition of 3 ml of MUGlu solution (50 mg of MUGlu-50 ml of sterile Triton water). Triton water was prepared by adding 1 drop of Triton X-100 to 50 ml of distilled water. At least two hydrolysis control flasks (blanks) were included per batch of 10 samples.

**Optimization of MUGluase assay.** Optimization of the MUGlu concentration was carried out by using a pure culture of *E. coli* H10407 (from isolates of Evans et al. [10] provided by B. Joly, University of Clermont-Ferrand, Clermont-Ferrand, France). The bacteria were grown in tryptone-soya broth (Oxoid), harvested by centrifugation, washed two times in saline, and resuspended in autoclaved (120°C, 20 min) seawater. The enzyme assay was then performed as described for the MUGluase assay, at various pHs, concentrations of MUGlu, temperatures, and fluorescence emission wavelengths.

## RESULTS

**Optimization of enzyme assay.** Results indicated that enzymatic activities for MUGal substrate corresponded to saturation kinetics, although an apparent  $V_{max}$  was not reached. A modest increase in the rate of the MUGluase-catalyzed reaction as a function of substrate concentration was demonstrated; the logarithm of velocity of substrate hydrolysis increased from  $-2.16 \log \mu\text{M MU per min}$  to  $-2.00 \log \mu\text{M MU per min}$  when the concentration of MUGlu increased from 0.07 to 0.20 g/liter. The rate of hydrolysis at 0.15 g of MUGlu per liter was only 4% lower than the maximum value, and 0.15 g of MUGlu per liter was used during the coastal water investigations. It is recognized that the kinetics of the pure *E. coli* experiment may not be representative for the stressed FCs found in seawater. Nonetheless, the concentration of MUGlu used in the field experiments was deemed to be acceptable for the purposes of detection of the FCs. The hydrolysis rate (micromolar concentration of MU per minute) decreased by 30% as pH increased from 6.4 to 7.2. A similar reduction was observed when the assay temperature was decreased from 44.5°C to 41.5°C. On the basis of these results, a pH of 6.4 and an incubation temperature of 44.5°C were used during the MUGlu assay. The rate of fluorescence increased 13% (at pH 6.4 and 44.5°C) when the emission wavelength was decreased from 465 nm to 440 nm.

To avoid substrate limitation in heavily contaminated samples (sewage effluents), the concentration of MUGal was increased from the 0.05 mg/ml used previously (3) to 0.4 g/ml.

**Rapid detection of sewage pollution of coastal water.** Salinities at sampling locations in the Morlaix River and Estuary

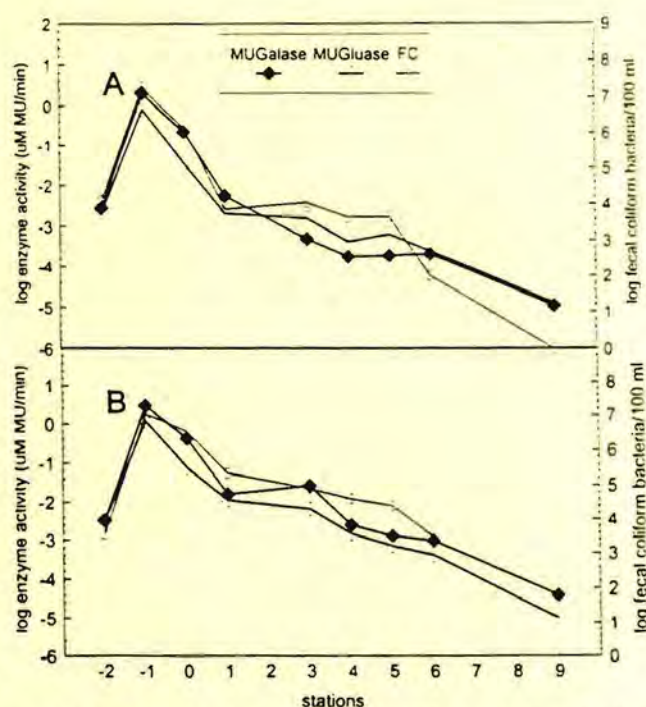


FIG. 1. Enzyme activity and number of FC bacteria in the Morlaix River and Estuary on 27 April 1992 (A) and 4 May 1992 (B). Salinities at the different sites increased from 3‰ (station -2) to 40‰ (station 9).

varied, from brackish to oceanic water. The Bjugn Bay and Estuary are open to the North Sea of the Atlantic Ocean, and salinities were generally high.

Numbers of FCs and enzyme activities of MUGalase and MUGluase in the Morlaix River decreased with increased distances from the water treatment plant (Fig. 1). In the Bjugn Bay and Estuary, small local outlets of sewage in addition to the treatment plant discharge resulted in a less clear relationship between the degree of water pollution and the distance from the sewage treatment plant than in the Morlaix area (Fig. 2). Enzyme activity was generally not detected when numbers of FCs were less than 10 to 100 CFU/100 ml. On one occasion (at station 9, Morlaix), however, hydrolysis of MUGal and MUGlu was registered at unexpectedly low levels of culturable FC bacteria (<1 and 1 CFU/100 ml).

The separate data sets from Morlaix and Bjugn for MUGalase activity versus FCs were each fit to a line by using weighted least-squares analysis. The slope and intercept, respectively, of each fit were tested with an *F* test, and they were found to be the same (fits were done with and without the results from station 9, Morlaix, because of inherent uncertainties with low plate counts, e.g., 1 FC/100 ml). The significance level of the test was set at  $P < 0.05$ . Because of similar potential bacterial population of discharges and similar potential bacterial behavior in receiving waters, the two data sets, including that from station 9, Morlaix, were then combined (Fig. 3), and least-squares analysis was used to obtain the global slope and intercept. The same statistical procedure was applied to data sets for MUGluase versus FCs. The slope and intercept of the Morlaix and Bjugn fits were found to be the same when data from station 9, Morlaix, were included, and the data were therefore combined (Fig. 3). However, without data from station 9, the two data sets appeared to obey different regression parameters (not shown).

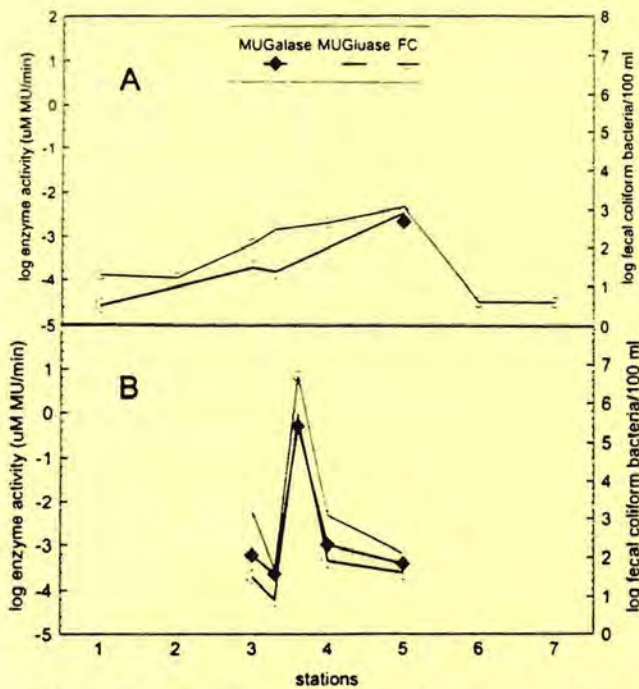


FIG. 2. Enzyme activity and number of FC bacteria in the Bjugn Bay and Estuary on 25 August 1992 (A) and 31 August 1992 (B) (sewage effluent, station 3.6, was not analyzed for panel A). Salinities at the different sites in the bay (B) varied from 27‰ to 31‰ (station 3.6 was not analyzed).

The logarithmic presentation of numbers of FCs versus MUGalase and MUGluase activities, respectively, for all locations of Morlaix and Bjugn (Fig. 3) demonstrated good linear correlations (correlation coefficients of  $r = 0.87$  and  $r = 0.88$  for MUGalase and MUGluase, respectively).

Enzyme activity will be a linear function of cell number (i.e., the enzyme activity per cell is constant) only when the slope of the linear logarithmic data curve is equal to 1. This was not the case in the present work, and it can be demonstrated by using regression line coefficients (Fig. 3) to calculate enzymatic activities per culturable cell that this activity seemed to decrease as the numbers of cells increased.

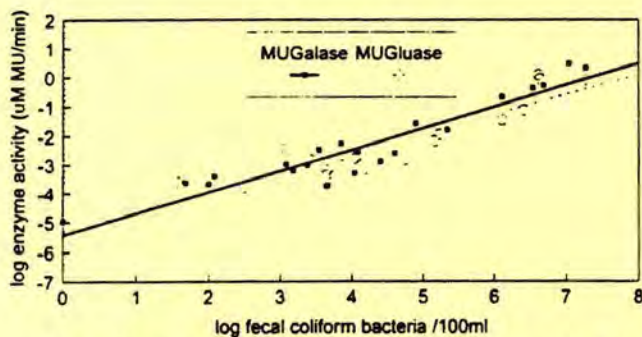


FIG. 3. MUGalase and MUGluase activity versus number of FC bacteria (all data from Bjugn and Morlaix sites). Regression lines:  $\log y_{\text{MUGalase}} = 0.74 \log x - 5.44$ ;  $\log y_{\text{MUGluase}} = 0.68 \log x - 5.31$ .

## DISCUSSION

The bacteriological quality of drinking water has recently been investigated by several authors using kits for simultaneous detection of total and FC bacteria. The kits rely on enzymatic conversion of *o*-nitrophenyl- $\beta$ -galactopyranoside by coliform bacteria and MUGlu by FC bacteria in 24 h (6, 7, 9, 20). Some studies have indicated that injured FCs in drinking water may be recovered to a lower degree with this technique than with standard methods (6). Recently, other authors have found such kits to be useful for detection of *E. coli* exposed to chlorine in drinking water (8, 19) and for *E. coli* exposed to environmental stress in coastal water (21).

We have investigated the use of MUGal and MUGlu in separate, rapid assays for detection of fecal pollution of coastal water. Because of their short assay time (25 min), the enzymatic methods described in the present work are candidate methods for early warning of sewage pollution of water. The investigations were carried out to study the impact of sewage discharge on bacteriological water quality and the use of rapid techniques for assessing bacteriological contamination of seawater.

Two coastal areas were selected for the study: an estuary (Morlaix) where mixing of sewage discharge and contaminated fresh water with seawater is complex, as demonstrated previously by use of mathematical models (26), and a fjord (Bjugn) where the sewage discharge is rapidly mixed with seawater. In Morlaix Estuary, there was a clear impact of the sewage discharge 4 km downstream of the outlet (until sampling station 5) at high tide as well as at low tide. In this part of the estuary, bacterial numbers and enzymatic activities were both high, and the enterobacterial die-off rate has previously been shown to be low (time for 90% of bacteria to lose culturability, 9 to 10 days) because of high concentrations of soluble and particulate organic matter which increase bacterial salt tolerance and prevent light penetration and the solar bactericidal effect (22, 26). In the outer part of the estuary (station 9), the time for 90% of bacteria to lose culturability is shorter (2 h to 2 days), and physical dilution processes efficiently reduce bacterial numbers. Dilution processes have been demonstrated to be more important than environmental factors affecting cell physiology, for numbers of culturable bacteria in the Morlaix Estuary (26). In the Bjugn Fjord, the combination of a small amount of sewage discharge (1,200 person equivalents) and a high degree of mixing with seawater resulted in limited impact by the discharge. The water was polluted near the sewage outlet; at distances >500 m from the outlet, high salinities were associated with low levels of FCs and enzymatic activity.

In the present work, MUGluase activity corresponding to bacterial concentrations in the order of 10 to 100 FCs/100 ml could generally be detected. The higher rate of substrate autohydrolysis in the MUGalase assay affected the detection limit, which corresponded to bacterial concentrations on the order of 100 to 1,000 FCs/100 ml.

In addition to the limit on the precision of the rapid assays mentioned above, other sources of error are also possible. Galactosidase-negative coliforms and galactosidase-positive noncoliforms, as well as glucuronidase-negative FCs and glucuronidase-positive non-FCs, may affect the enzyme assays (6, 7, 12, 16, 25). The lack of a relationship between the intensity of autoradiographic signals of the *uidA* gene encoding  $\beta$ -glucuronidase enzyme and the expression of enzyme activity in MUGlu media has recently been demonstrated for *E. coli* isolated from treated and raw water sources (17). Martins et al. (17) suggested that the physiological condition of the bacteria could have been a variable responsible for the nonexpression

of the enzyme activity of the inducible  $\beta$ -glucuronidase enzyme.

Because enzyme activities are subject to the physiological status of the bacteria, a variable fraction of the coliform bacteria may be stressed when changes in irradiation, salinity, temperature, and nutrient concentration of the environment occur (22). Interestingly, when results from the present study are used to calculate enzymatic activity per culturable bacterium, enzyme activity seems to increase when the concentration of cells in the receiving waters decreases. The increase in enzyme activity could have been a response to environmental changes; starvation studies of bacteria have, for instance, indicated an increase in the concentration of substrate-capturing enzymes as well as induction of high-affinity uptake systems for carbon substrates during starvation (15, 18). In our study, the apparent increase in MUGalase and MUGlucase activity per culturable cell could, however, also have occurred as a result of an increase of the fraction of viable, nonculturable bacteria. Viable, nonculturable bacteria have been shown to be metabolically active, even if they cannot be detected by commonly used cultivation techniques (1, 23, 24). Several studies have demonstrated a decrease in the relationship between culturable and viable enterobacteria during exposure to environmental stress (1, 4, 14).

Although environmental factors (e.g., salinity, irradiation, nutrient concentration) varied at different sampling locations in the present investigation and enzyme activity per bacterial cell may have varied along with a variable fraction of culturable to viable cells, the good linear correlation between logarithms of enzyme activities and concentrations of culturable FC bacteria encourages continued use of the rapid enzyme assays for monitoring of sewage pollution in marine waters. Further investigations of how marine environments affect the MUGalase or MUGlucase activity of FC bacteria would be important for a more extensive evaluation of the use of present methods for detection of culturable and viable, nonculturable coliform bacteria.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank N. Haget for assistance with assay-optimizing experiments and J. S. Tyssedal for help with statistical analysis.

This work was partially supported by a grant to L.F. from IF-REMER. Financial support was also received from the Cultural Agreement between Norway and France as a travel grant to M. Pommeypuy.

#### REFERENCES

1. Barcina, I., J. M. González, J. Irriberri, and L. Egea. 1989. Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:246-251.
2. Bascomb, S. 1987. Enzyme tests in bacterial identification. *Methods Microbiol.* 19:105-160.
3. Berg, J. D., and L. Fiksdal. 1988. Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone- $\beta$ -D-galactoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2118-2122.
4. Byrd, J. J., H.-S. Xu, and R. R. Colwell. 1991. Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:875-878.
5. Chrost, R. J., and H. J. Krambeck. 1986. Fluorescence correction for measurement of enzyme activity in natural waters using methylumbelliferol substrates. *Arch. Hydrobiol.* 106:79-90.
6. Clark, D. L., B. B. Milner, M. H. Stewart, R. L. Wolfe, and B. H. Olson. 1991. Comparative study of commercial 4-methylumbelliferol- $\beta$ -D-glucuronide preparations with the *Standard Methods* membrane filtration fecal coliform test for the detection of *Escherichia coli* in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1528-1534.
7. Clark, J. A., and H. El-Shaarawi. 1993. Evaluation of commercial presence-absence test kits for detection of total coliforms, *Escherichia coli*, and other indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:380-388.
8. Covert, T. C., E. W. Rice, S. A. Johnson, D. Berman, C. H. Johnson, and P. J. Mason. 1992. Comparing defined substrate coliform tests for the detection of *Escherichia coli* in water. *J. Am. Water Works Assoc.* 84:98-104.
9. Edberg, S. C., M. J. Allen, D. B. Smith, and the National Collaborative Study. 1988. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous enumeration of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: comparison with the standard multiple tube fermentation method. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1595-1601.
10. Evans, D. G., D. J. Evans, Jr., and W. Tjoa. 1977. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.* 18:330-337.
11. Fiksdal, L., M. Pommeypuy, A. Derrien, and M. Cormier. 1989. Production of 4-methylumbelliferol heptanoate hydrolase by *Escherichia coli* exposed to seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:2424-2427.
12. Frampton, E. W., and L. Restaino. 1993. Methods for *Escherichia coli* identification in food, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection. *J. Appl. Bacteriol.* 74:223-233.
13. Gauthier, M. J., M. C. Toregosa, M. C. Babelona, R. Cornax, and J. J. Borrego. 1991. An intercalibration study of the use of 4-methylumbelliferol- $\beta$ -D-glucuronide for the specific enumeration of *Escherichia coli* in sea water and marine sediments. *Syst. Appl. Microbiol.* 14:183-189.
14. Grimes, D. J., and R. R. Colwell. 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FEMS Microbiol. Lett.* 34:161-165.
15. Kjelleberg, S., M. Hermansson, P. Marden, and G. Jones. 1987. The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annu. Rev. Microbiol.* 41:25-49.
16. Manafi, M., W. Kneifel, and S. Bascomb. 1991. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiol. Rev.* 55:335-348.
17. Martins, M. T., I. G. Rivera, D. L. Clark, M. H. Stewart, R. L. Wolfe, and B. H. Olson. 1993. Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of  $\beta$ -glucuronidase activity in 4-methylumbelliferol- $\beta$ -D-glucuronide media. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:2271-2276.
18. Matin, A., E. A. Auger, P. H. Blum, and J. E. Schultz. 1989. Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 43:293-316.
19. McCarty, S. C., J. H. Standridge, and M. C. Stasiak. 1992. Evaluating a commercially available defined-substrate test for recovery of *E. coli*. *J. Am. Water Works Assoc.* 84:91-95.
20. Olson, B. H., D. L. Clark, B. B. Milner, M. H. Stewart, and R. L. Wolfe. 1991. Total coliform detection in drinking water: comparison of membrane filtration with Colilert and Coliquik. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1535-1539.
21. Palmer, C. J., Y.-L. Tsai, A. Lee Lang, and L. R. Sangermano. 1993. Evaluation of Colilert-Marine Water for detection of total coliforms and *Escherichia coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:786-790.
22. Pommeypuy, M., J. F. Guillard, E. Duprey, A. Derrien, F. Le Guyader, and M. Cormier. 1992. Enteric bacteria survival factors. *Water Sci. Technol.* 25:93-103.
23. Roszak, D. B., and R. R. Colwell. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* 51:365-379.
24. Roszak, D. B., and R. R. Colwell. 1987. Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2889-2893.
25. Rychert, R. C., and G. R. Stephenson. 1986. Lactose negative *Escherichia coli* from rangeland streams: source, antibiotic resistance, and colicinogenicity. *Water Res. Bull.* 22:39-42.
26. Salomon, J. C., and M. Pommeypuy. 1990. Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary (France). *Water Res.* 24:983-994.

## IX - CONCLUSION

Les études rapportées dans ce chapitre avaient pour but d'étudier les modifications physiologiques des bactéries soumises au stress du milieu marin et en particulier au stress osmotique et oxydatif. Les principales conclusions sont présentée ci-dessous.

Les caractéristiques des zones côtières définissent les conditions de stress et de ce fait, les possibilités de survie des bactéries en mer. La perte du pouvoir de cultiver va dépendre de la qualité des eaux dans lesquelles les bactéries vont être rejetées.

Ainsi, la présence de matières en suspension est déterminante pour la survie des bactéries. Son rôle est clairement démontré et se situe sur deux plans :

- **tout d'abord une action physique** par arrêt des rayons lumineux. En effet, il existe une corrélation significative entre les temps de perte de cultivabilité (T90) et l'intensité reçue par les bactéries : plus l'intensité est forte, plus les T90 sont courts.

Par ailleurs *in situ* une bonne corrélation entre les MES dans l'eau et le coefficient d'atténuation de la lumière a été trouvée ( $r^2 = 0,90$  pour 19 analyses). Dans les eaux turbides (100 mg/l) la transmission de la lumière à travers la colonne d'eau est réduite d'un facteur 10 par rapport à celle d'eaux claires (10 mg/l). Ces fortes turbidités sont couramment mesurées dans les estuaires. Les expériences en laboratoire mettent en évidence le rôle de la matière particulaire, celle-ci est responsable de 90 % de l'atténuation de la lumière pour des teneurs supérieures à 10 mg/l). En eau douce, la matière organique dissoute participerait de façon importante à cette atténuation.

D'autre part, on trouve une corrélation entre l'augmentation de la turbidité et le pourcentage de bactéries adsorbées lors de mesures réalisées en estuaire. Dans les eaux turbides la probabilité de rencontre d'une bactérie et d'une particule est très élevée ; les matières en suspension participeraient ainsi à la survie des bactéries en leur offrant un environnement protecteur (vis-à-vis de la lumière). Dans ces conditions, les T90 trouvés sont très longs (par exemple 7 jours au Dourduff, dans l'estuaire de Morlaix) et sont comparables à ceux trouvés dans le sédiment (6-20 jours) ou en absence de lumière (supérieur à 10 jours).

- **Ensuite une action biologique** : dans les conditions de températures proches des conditions naturelles, la matière organique dissoute est assimilée par *Salmonella* et *E. coli*. Ce substrat est utilisé pour l'osmorégulation des bactéries. Ainsi pour des eaux chargées en matière organique (23,5 mg/l) et à 15 °C, 72 % des souches de *Salmonella* testées ont augmenté leur halotolérance. Pour ces mêmes eaux à 37 °C, la matière organique particulaire est également utilisée. Ces résultats montrent par ailleurs l'importance de la température.

Eu égard à ces résultats, la spécificité des côtes méditerranéenne et antillaise rend les conditions de survie des entérobactéries dans la masse d'eau très difficiles. L'ensoleillement, dont les intensités sous l'eau peuvent atteindre  $1\ 000\ \mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  et plus, les salinités supérieures à 34 ‰ et le manque d'éléments nutritifs, justifient les T90 très courts, l'été dans les eaux de surface (2 heures). On peut retrouver ces conditions dans d'autres sites en été, par beau temps et dans les eaux très claires, par exemple à l'embouchure de la baie de Morlaix ou sur la côte ouest du Cotentin. La population cultivable chute rapidement tandis que les bactéries restent viables sans qu'aucune lyse bactérienne ne soit constatée.

**Le maintien du pouvoir pathogène des bactéries viables non cultivable** a ensuite été étudié. La perte de viabilité a été obtenue *in situ* sur une souche d'*E. coli* exposée à des conditions naturelles (fort ensoleillement en milieu marin). Dans le témoin (à l'abri de la lumière) les bactéries sont restées cultivables. Parmi les deux techniques utilisées pour étudier le maintien du pouvoir pathogène, l'anse ligaturée de lapin s'est avérée peu adaptée. En effet l'eau de mer stérile provoque une légère accumulation de fluide dans l'anse ce qui rend les résultats difficilement exploitables. La technique Gm<sub>1</sub> ELISA donne des résultats intéressants : pour les deux échantillons (le témoin et l'échantillon éclairé) le test s'est avéré positif. Aucune prolifération d'*E. coli* n'a été observée dans l'anse où les bactéries viables non cultivables avaient été inoculées (résultats par culture négatifs). Cette expérimentation semble indiquer que les bactéries viables non cultivables garderaient leur pouvoir pathogène. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres auteurs (Singh *et al.*, 1986).

**La perte de cultivabilité** provoquée par l'exposition à la lumière visible de *E. coli* a été reproduite *in vitro* dans des conditions proches de celles observées *in situ* : intensités lumineuses de 500 à 900  $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ . L'hypothèse testée est **l'implication des espèces oxygénées réactives** dans ce mécanisme : la phototoxicité pourrait être due à l'adsorption de la lumière visible par des photooxydateurs qui, excités électroniquement pourraient réagir avec l'oxygène pour former des espèces oxygénées réactives (ROS). Les expérimentations semblent impliquer en effet l'oxygène présent dans l'eau, puisque des tests, réalisés sur l'eau de mer privée de son oxygène, montrent une toxicité moindre qu'en présence d'oxygène. Si le rôle de l'oxygène singulet n'a pu être mis en évidence du fait des conditions expérimentales (faible efficacité des piègeurs), il ne peut néanmoins être totalement écarté. En tout état de cause, les résultats semblent démontrer qu'il n'y a pas de formation exogène de ce composé. Le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde par contre seraient produits dans la cellule.

**Les modifications métaboliques** provoquées par le stress marin sont nombreuses. On constate par exemple, que dès l'immersion dans l'eau de mer, *E. coli*, même sans perte de cultivabilité modifie son métabolisme. La synthèse des protéines ou du DNA est fortement inhibée de même que l'incorporation totale de la thymidine. Ces modifications s'accompagnent d'une chute importante de la quantité de protéines (20 à 40 %) et ceci en moins d'une vingtaine de minutes. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment trouvés (Hood *et al.*, 1986). Par contre, les techniques employées n'ont pas permis de mettre en évidence une variation importante de ces paramètres entre la bactérie à l'abri ou exposée à la lumière.

En l'absence de lumière, les modifications des systèmes énergétiques ont été étudiés en utilisant le CCCP. Chez *E. coli*, la concentration minimale inhibitrice (CMI) du CCCP dépend de la nature du milieu de culture. En milieu riche (trypticase caséine soja) la résistance au CCCP diminue par rapport à un milieu minimum.

Sous l'effet du sel, la CMI atteint 20  $\mu\text{M}$  (pour des salinités supérieures à 0,68 M de NaCl), 100  $\mu\text{M}$  pour 0,008 M de sel : Le système antiport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  peut donc fonctionner en absence de la force motrice protonique, quand le glucose est utilisé comme source d'énergie. Cependant, lorsque la quantité de sel augmente l'énergie glycolytique n'est pas suffisante pour permettre à la bactérie de résister. Dans ce cas on observe un effet conjugué de la salinité et du CCCP qui provoque l'arrêt de la croissance d'*E. coli*. Ces résultats sont confirmés par le

fait que si des osmoprotecteurs sont ajoutés, ils provoquent la résistance d'*E. coli* (levée de l'inhibition osmotique). A l'opposé pour les souches de *Vibrio* et à pH 7.2, le CCCP s'est révélé inhibiteur quel que soit le milieu de croissance. Il est intéressant de noter que cette inhibition est indépendante de la teneur en sel. Dans tous les cas, le choc osmotique causé par le sel et associé avec l'inhibition, même partielle de la force motrice protonique, diminue la croissance des bactéries.

Le stress marin a d'autre part, un effet important sur les **activités enzymatiques** telles que l'hydrolase, la  $\beta$ -galactosidase et la  $\beta$ -glucuronidase.

Sous l'effet du stress oligotrophe **l'activité hydrolase rapportée** au nombre de cellules cultivables augmente sensiblement. Ces résultats sont trouvés lorsque *E. coli* est inoculé dans une eau de mer naturelle avec ou sans ajout de glycine-bétaïne (1.0 mM). Le fait que les résultats soient identiques en présence ou non d'un osmoprotecteur confirme le rôle du stress oligotrophe sur cette activité. Le même résultat est obtenu en milieu minimum où l'augmentation de l'activité enzymatique par cellule s'accompagne d'une croissance lente de la population. Dans le milieu oligotrophe, cette croissance s'accompagne par contre d'une chute (en eau de mer) ou d'un maintien (en eau de mer avec un ajout d'osmoprotecteur) du nombre de bactéries cultivables.

Dans tous les cas - sauf dans l'eau de mer enrichie en eau peptonée (10 %) on retrouve une augmentation de l'activité enzymatique. Ces résultats suggèrent que les bactéries en milieu pauvre tentent d'adapter leur métabolisme en synthétisant des enzymes capables de rendre la matière organique présente plus facilement assimilable (Groat *et al.*, 1986 ; Schultz *et al.*, 1988) et d'augmenter la résistance au stress permettant ainsi à la bactérie de survivre.

**L'activité  $\beta$ -galactosidase** semble elle aussi augmenter pendant le stress, lorsqu'on la rapporte au nombre de cellules cultivables. Dans le cas de cette enzyme, l'induction en milieu marin par des composés présents dans le milieu ne semble pas envisageable. Les résultats suggèrent plutôt un maintien de cette activité dans les cellules non cultivables ce qui traduirait un métabolisme actif. En effet le substrat (MUGal) donné à la bactérie, pour être utilisé doit pénétrer par transport actif dans la bactérie. Il serait nécessaire de confirmer ce résultat par des systèmes de marquage.

Testée *in situ* cette technique confirme l'hypothèse que, pour de très faibles concentrations en coliformes cultivables (extérieur de la baie de Morlaix), les activités enzymatiques  $\beta$ -galactosidase et  $\beta$ -glucuronidase - mesurées sont plus importantes que dans les zones très contaminées (intérieur de l'estuaire). Les ordres de grandeur d'activité enzymatique obtenus *in situ* sur les entérobactéries et *in vitro* sur une souche d'*E. coli* dont l'activité  $\beta$ -galactosidase a été induite sont comparables.

Testées en parallèle sur l'estuaire de Morlaix, ces techniques enzymatiques ( $\beta$ -galactosidase et  $\beta$ -glucuronidase), montrent une corrélation significative entre elles. De même, une bonne corrélation est trouvée entre l'activité enzymatique et le nombre de coliformes thermotolérants. Ces techniques rapides (25 minutes), si elles s'avéraient en effet plus sensibles pour détecter les bactéries stressées, pourraient être utilisées pour améliorer le contrôle des zones conchylicoles et de baignade.

En conclusion, l'importance des facteurs environnementaux sur la survie des bactéries fécales en mer est clairement démontrée. Cependant, des études récentes mettent en évidence le rôle déterminant de l'état de la physiologie de la bactérie à son arrivée en mer. Par exemple, à partir d'études réalisées sur des eaux naturelles, Dupray et Derrien (1995) démontrent l'influence du séjour dans des eaux de station d'épuration sur la survie d'*E. coli* et *Salmonella* : ces bactéries acquièrent une protection qui leur permettrait de conserver une viabilité en eau de mer ; dans l'eau épurée, le stress induirait une synthèse de tréhalose (Dupray *et al.*, 1995), peut-être par une activation du gène *kat F*. La bactérie exposée ensuite au choc osmotique utiliserait alors le tréhalose comme osmoprotecteur.

En ce qui concerne le stress oxydatif, comme pour les autres stress, différents auteurs ont mis en évidence la possibilité d'une augmentation de la résistance, en soumettant les cellules à des doses sub-letales de radicaux superoxydes ou de peroxyde d'hydrogène par exemple ou lorsque les cellules sont en phase stationnaire de croissance (Jenkins *et al.*, 1988 ; Gourmelon *et al.*, 1995). Soumis à un stress oxydatif continu, *E. coli* réagit en induisant la synthèse de nombreuses protéines dites du stress oxydatif. Parmi plusieurs dizaines de protéines ainsi formées, neuf au moins sont placées sous la dépendance d'un régulon commandé par le gène *sox R*, quatre sont des enzymes de défense et les autres des enzymes de réparation de l'ADN.

## **V - CONCLUSIONS**



## CONCLUSION

Pour répondre à la question de l'acceptabilité du milieu marin vis-à-vis de la contamination fécale, on dispose actuellement d'un ensemble de données. Les travaux présentés ici et ceux publiés en France ou à l'étranger ces dernières années ont donné un nouvel éclairage sur le devenir des bactéries rejetées en mer. L'ensemble de ces connaissances est utilisable pour l'aménagement des zones littorales.

**Dans les rejets anthropiques** on dénombre une quantité élevée de coliformes thermotolérants et streptocoques fécaux ; lorsqu'on les recherche, les pathogènes (salmonelles) sont très souvent présents - surtout dans les eaux des stations d'épuration traitées ou non traitées. Ce flux à la côte est important car il est continu. Le développement de la population et des activités côtières ne va pas dans le sens d'une diminution de ces apports. De plus, l'existence de réseaux unitaires dans les villes côtières favorise par temps de pluie, les débordements (by-pass) d'eaux brutes fortement chargées. Le traitement biologique même si la station fonctionne correctement, n'élimine qu'une partie de la flore entérique et les moyens de désinfection, lorsqu'ils existent, ne sont pas tous performants

**Arrivée en mer**, une partie des bactéries sédimentent lorsque les vitesses de chute sont suffisantes et la zone abritée (port, vasières...). Le sédiment offre une protection aux bactéries d'origine fécale qui y trouvent des éléments nutritifs ou des osmoprotecteurs leur permettant de lutter contre le stress osmotique. Cependant, il existe une compétition de flore avec les bactéries du milieu naturel, mieux adaptées aux températures et aux composés organiques présents. Ainsi, on peut observer qu'un apport ponctuel d'*E. coli* dans un sédiment chargé en matière organique en présence de flore autochtone permet à cette bactérie de dominer l'écosystème. La perte de cultivabilité intervient lentement : en effet les T90 - temps nécessaire pour que 90 % de bactéries ne cultivent plus - sont dans le sédiment pour *E. coli* d'une vingtaine de jours. La bactérie évolue alors sous le stress vers des stades où le métabolisme est très ralenti, étape de dormance où les techniques usuelles sont prises en défaut. Dans le sédiment seul 1/100 à 1/1000 de la flore totale est cultivable.

Lorsque les houles, le clapot ou les courants sont suffisants, une **partie des dépôts est remis en suspension** ; la turbidité de l'eau augmente alors et simultanément la contamination. Dans les eaux turbides, les bactéries issues des sédiments ou fraîchement issues des rejets sont protégées du stress principal du milieu marin : le rayonnement lumineux. Comme dans le sédiment, elles trouvent sur les supports en suspension ou dans la matière organique dissoute les éléments nécessaires à leur survie. Dans ces conditions les T90 mesurés peuvent atteindre une semaine et plus pour *E. coli* ; ces T90 sont trouvés dans les eaux côtières estuariennes. Ils sont très voisins de ceux mesurés la nuit sur tous les sites étudiés (Manche, Rade de Brest, Méditerranée), sauf en Martinique, où la décroissance persiste pendant la nuit.

**Lorsque la lumière solaire pénètre dans les eaux, les T90 sont alors très courts** : ces situations sont observées dans les eaux très claires et bien ensoleillées (Martinique et Méditerranée, également Manche et Atlantique lors de conditions estivales ensoleillées). Dans ce cas, l'acceptabilité du milieu vis-à-vis de la contamination fécale semble être très élevée ; cependant la perte de cultivabilité ne peut pas toujours être associée à une mortalité voire, peut-être, à une perte du pouvoir pathogène.

Ces résultats sont importants vis-à-vis de l'aménagement des zones côtières. Il convient pour une étude d'impact de connaître les caractéristiques du site, celles ci influençant le devenir des bactéries en mer.

**L'étude des mécanismes du stress** en milieu marin met en évidence le rôle de la lumière, du manque d'éléments nutritifs et de la salinité sur l'évolution métabolique des entérobactéries ; le stress osmotique et oligotrophique sont certainement très drastiques car même s'ils n'entraînent pas toujours une perte de cultivabilité rapide, ils modifient immédiatement les teneurs en protéines, inhibent la synthèse d'ADN et de protéines, modifient les systèmes respiratoires et énergétiques. La lumière est le facteur le plus drastique, elle agit sur la cultivabilité ; des espèces oxygénées réactives peroxyde d'hydrogène, anion superoxyde ainsi que l'oxygène peuvent être impliquées dans ces mécanismes. Dans les conditions de manque d'éléments nutritifs, de salinité élevée et d'ensoleillement, les conditions idéales semblent être réunies pour que le milieu marin soit le plus défavorable et qu'une contamination bactérienne entérique ne puisse s'implanter (site de Toulon, Martinique).

Cependant, les découvertes récentes de la physiologie bactérienne et de la biologie moléculaire rendent prudent quand à l'estimation de l'élimination des bactéries et encore davantage des virus dans le milieu marin. Récemment on a pu mettre en évidence pendant des temps relativement longs la présence des ADN bactériens ou d'ARN viraux dans les eaux et les sédiments côtiers ou *in vitro* dans les microcosmes. Dans ces microcosmes les bactéries avaient perdu depuis très longtemps le pouvoir de cultiver ; plus encore on s'est aperçu que les bactéries pouvaient résister aux stress en mettant en place des protéines spécifiques leur permettant de résister aux conditions défavorables. L'acclimatation de bactéries entériques à des stress osmotique, oligotrophique et oxydatif a pu être réalisée, les gènes clonés et l'expression de ces gènes stimulée.

Ces derniers résultats rendent plus que jamais nécessaire une recherche orientée sur la désinfection des eaux ainsi que des études épidémiologiques sur le risque encouru par l'homme en présence d'espèces microbiennes non cultivables ou multirésistantes. La connaissance de l'état physiologique des bactéries doit permettre de comprendre et d'améliorer l'action de désinfectants. Elle devrait pouvoir expliquer le phénomène de "recroissance" ou reviviscence observé, par exemple, après application d'un traitement ultraviolets à des eaux usées. Actuellement le développement d'une recherche sur la désinfection des eaux, s'appuyant sur ces nouvelles connaissances, est indispensable pour améliorer la gestion des zones littorales.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ABSN :	Agence de Bassin Seine Normandie.
ADN :	Acide désoxyribonucléique
AODC :	Acridine Orange Direct Count
ATP :	Adénosine triphosphate
BCR :	Bureau Communautaire de Référence
BM :	Basse mer
CCCP :	carbonylcyanide m-chlorophenyldrazone
CEE :	Communauté Economique Européenne
CF :	coliformes fécaux (ancienne appellation des coliformes thermotolérants)
CF/s :	expression des flux de coliformes thermotolérants par seconde.
CMI :	Concentration minimale inhibitrice
CNEXO :	Centre National pour l'Exploitation des Océans
COB :	Centre Océanologique de Bretagne.
COD :	Carbone organique dissous
CT :	Coliformes Totaux
D42 :	Bactéries entériques isolées sur milieu de Drigalski à 42 °C
DBO :	Demande biologique en oxygène
DCO :	Demande Chimique en Oxygène.
DDASS :	Direction Départementale de l'Action Sanitaire et Sociale.
DDE :	Direction Départementale de l'Equipement.
DRAF :	Direction Régionale de l'Agriculture et de la Forêt.
DVC :	Direct Viable Count
E. :	Einstein
EH :	Equivalent Habitant.
FMP :	Force motrice protonique
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Peroxyde d'hydrogène
IFREMER :	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer.
K :	coefficient de décroissance
M63 :	Milieu minimum
MES :	Matières en Suspension.
ND :	non déterminé.
OH° :	Radical hydroxyle
ORSTOM :	Organisation Scientifique des Territoire d'Outre Mer.
PM :	Pleine mer
ROS :	Reactive oxygen species : espèces oxygénées réactives
SAU :	Surface Agricole Utile.
SF :	streptocoques fécaux
SOD :	Superoxyde dismutase
SRAE :	Service Régional de l'Aménagement des Eaux.
STH :	Surface Toujours en Herbe.

T90 :	Temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne soient plus cultivable ( $T90 = 1/K$ )
TD :	milieu trypticase caséine soja préparé à l'eau distillée
To :	début d'une expérimentation
Tx :	x heure après le début de l'expérimentation (ex : T13 = 13 h après)
UFC :	Unité Formant Colonie
UV :	Ultraviolet
UV-A :	320-400 nm
UV-B :	290-320 nm
UV-C :	200-290 nm
ZIP :	Zone Industrielle et Portuaire.
$\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ :	Unité d'intensité lumineuse : micro einstein par mètre carré et par seconde.
$\text{O}_2^-$ :	Anion superoxyde
$^1\text{O}_2$ :	Oxygène singulet

## **BIBLIOGRAPHIE**

- Alibou J., 1987.** Etude de l'évolution simultanée des abondances et de la survie des *Salmonella* et des coliformes fécaux dans différents ouvrages épurateurs et milieux aquatiques. *Thèse. Univ. Sciences Tech. du Languedoc, Montpellier*, 218 p.
- Almeras V., 1985.** Golfe Normano-Breton. Aspects socio-économiques des activités humaines des bassins versants. Université de Rennes, 67 p. + annexes.
- Aminot A., Chaussepied M., 1983.** Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, ISBN 2.902721.10.2., 395 p.
- Arana I., Muela A., Iriberry J., Egea L., Barcina I., 1992.** Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3903-3907.
- Ashbolt N.J., Grohmann G.S., Kueh C.S.W., 1993.** Significance of specific pathogens in assessment of polluted receiving waters of Sydney, Australia. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, n° 3-4, 449-452.
- Association Française de Normalisation, 1986.** Eaux, méthodes d'essai. *Recueil des normes françaises*, 624 p.
- Baleux B., Alibou J., Troussellier M., Got P., 1988.** Utilisation du bouillon sélénite F modifié pour dénombrer *Salmonella* dans les milieux aquatiques. *Revue des Sciences de l'eau*, **1**, 401-408.
- Baleux B., Troussellier M., Got P., Montfort P. Alibou J., 1986.** Etude de l'évolution de certaines bactéries pathogènes à l'entrée et à la sortie de la station d'épuration des eaux usées de Toulon Est. Contrat IFREMER n° 86-3430053, 10 p.
- Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry J., Egea L., 1989.** Effect of visible light on progressive dormancy of *Escherichia coli* cells during the survival process in natural fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 246-251.
- Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry I., Egea L., 1990.** Survival strategy of *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine system. *J. Appl. Bacteriol.*, **68**, 189-198.
- Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry J., Egea L., 1991.** Role of protozoa in the regulation populations in seawater. *Marine Microbial Food Webs*, **5**, 179-187.
- Beliaeff B., Cochard M.J., 1995.** Applying geostatistics to identification of spatial patterns of fecal contamination in a mussel farming area (Havre de la Vanlée, France). *Wat. Res.*, **29**, 1541-1548.
- Bitton G., 1994.** Wastewater Microbiology. Ed. Wiley Lss, N.Y., 478 p.
- Bonnefont J.L., Martin Y.P., Guiennet B., 1990.** Etude expérimentale de la décroissance des bactéries fécales en milieu marin. Quantification, facteurs impliqués. *Wat. Res.*, **24**, 267-273.

- Bonnefont J.L., Martin Y., Troussellier M., Cahet G., 1994.** Modélisation du devenir des bactéries entériques en mer. Rapport PNOC-IFREMER, 28 p.
- Bravo J.M., De Vicente A., 1992.** Bacterial die-off from sewage discharged through submarine outfalls. *Wat. Sci. Tech.*, **25**, 9-16.
- Brown A.D., Simpson J.R., 1972.** Water relation of sugar-tolerant yeast, the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.*, **72**, 589-591.
- Byrd J.J., R.R. Colwell, 1990.** Maintenance of plasmids PBR 322 and pUC8 in non culturable *E. coli* in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 2104-2107.
- Camus P., C. Tréguier, J.C. Le gars, 1990.** Salubrité des coquillages de pêche de la petite mer de Gavres, Morbihan. Rapport Interne Ifremer, 52 p.
- Carney J.F., Carty C.E., Colwell R.R., 1975.** Seasonal occurrence and distribution of microbial indicators and pathogens in the Rhode River of Chesapeake Bay. *Appl. Microbiol.*, **30**, 771-780.
- Castaing P., A de Resseguier, C. Julius, M. Parra, J.C. Pons, M. Pujos, Weber O., 1986.** Qualité des eaux et des sédiments dans la baie de Fort de France (Martinique). Compte rendu de fin d'étude. Action concertée. CORDET.
- Catherine M., Dumont F., Pezeron A., Menauteau C., 1994.** Etude de salubrité des marais du Mes - Loire Atlantique. Rapport interne Ifremer DEL-14-Nantes, 108 p.
- Chamberlin C.E., Mitchell R., 1978.** A decay model for enteric bacteria in natural waters. Dans *Waters Pollution Microbiology*, édité par Mitchell R., Wiley-Interscience, New York, 325-348.
- Chambers S.T., Kunin C.M., Miller D., Hamada A., 1987.** Dimethylthetine can be substitute for glycine-betaïne as an osmoprotectant molecule for *E. coli*. *J. Bacteriol.*, **169**, 4845-4847.
- CNEXO-DDE, 1980.** Schéma d'aptitude et d'utilisation de la mer, rade de Brest. 197 p. + Annexes.
- CNEXO, 1981.** Réseau National d'Observation. RNO. Synthèse des travaux de surveillance 1975-1979 du Réseau National de la qualité du milieu marin. Ministère de l'Environnement, 358 p.
- CNEXO-COB, 1983.** Capacité d'acceptation du milieu marin - Bactériologie. Rapport de synthèse. 160 p. + figures.
- CNEXO-COB-ELGMM, 1978.** SAUM de la Rade de Brest. Etudes océanographiques. I. Le milieu marin, 35..

- Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A., Palmer L.M., 1985.** Viable non culturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment, implications for the release of genetically engineered microorganisms. *Biotechnology*, **3**, 817-820.
- Comps M.A., Tournier H., Sospedra C., 1993.** Bilan des analyses du réseau microbiologique (Rémi) en Languedoc-Roussillon (Avril 1989 - Décembre 1991). Rapport interne Ifremer Del 93-08 Sète, 78 p.
- Console J.J., C. Zeitoun, 1992.** La qualité sanitaire des eaux de l'anse de Carteau, Golfe de Fos. Rapport Interne Ifremer DEL, 92-02 Marseille, 70 p.
- Cooper W.J., Zika R.G., 1983.** Photochemical formation of hydrogen peroxide in surface et ground waters exposed to sunlight. *Science*, **220**, 711-712.
- Curtis T.P., Mara D.D., Silva S.A., 1992a.** Influence of pH, oxygen et humic substances on ability of sunlight to damage fecal coliforms in waste stabilization pond water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1335-1343.
- D'Aoust J.Y., Martin W.G., Giroux J., Schneider H., 1980.** Protection from visible light damage to enzymes and transport in *Escherichia coli*. *Photochem. Photobiol.*, **31**, 471-474.
- Davies-Colley R.J., Belle R.G., Donnison A.M., 1994.** Sunlight inactivation of Enterococci and fecal coliforms in sewage effluent diluted in seawater. *Appl. Env. Microb.*, **60**, 2049-2058.
- DDASS, 1988.** Origine de la détérioration des eaux marines du secteur de Granville à Pair-Sur-Mer, 51 p.
- DDASS-IFREMER, 1988.** Surveillance sanitaire des eaux littorales du département de la Manche, 180 p.
- DDASS-IFREMER-Agence de Bassin Seine Normandie, 1989.** Les sources de pollution microbiologique et organique dans le bassin versant du havre de la Vanlée. Incidence sur les activités mytilicoles, 140 p.
- DDASS-IFREMER- Agence de Bassin Seine Normandie, 1992.** Surveillance sanitaire des eaux littorales du département de la Manche, 267 p.
- Dupont J., Kevorkian, 1994.** Effet d'un effluent de station d'épuration sur la survie et l'état physiologique d'*E. coli* et *S. manhattan* en eau de mer. Rapport d'avancement IFREMER. Grand Programme Qualité Epuration des Eaux, 103 p.
- Dupray E., Baleux B., Bonnefont J.C., Guichaoua C., Pommepuy M., Derrien A., 1991.** Apports en bactéries par les stations d'épuration. In : La mer et les rejets urbains. *IFREMER, Actes de Colloques 11*, 81-88.
- Dupray E., Derrien A., 1995.** Influence du passage de *Salmonella spp.* et *E. coli* en eaux usées sur leur survie ultérieure en eau de mer. *Wat. Res.* **29**, 1005-1011.



- Dupray E., Derrien A., Pichon R., 1995. Osmoregulation by trehalose synthesis in *Salmonella manhattan* after exposure to waste waters. *Letters in Appl. Microbiol.*, **20**, 148-151.
- Epstein W., 1986. Osmoregulation by potassium transport in *E. coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**, 73-78.
- Evison L.M. Tosti E., 1980. An appraisal of bacterial indicators of pollution in sea water. *Progr. Wat. Tech.* **12**, IAWPR. Pergamon Press Ltd, 591-599.
- Flint K.P., 1987. The long term survival of *E. coli* in river water. *J. of Appl. Bacteriol.* **63**, 261-270.
- Fondation Océanographique Ricard, 1990. Programme rejets urbains, volet Méditerranée, devenir des microorganismes d'intérêt sanitaire dans le milieu récepteur marin. Ifremer - Agence de l'eau Rhône-Méditerranée-Corse. Rapport interne, 58 p.
- Furlong C.E., 1987. Osmotic shock sensitive transport systems. In : *E. coli* and *Salmonella typhimurium*. Vol. 1. Eds F.C. Neidhart, p. 768-796.
- Galdiereo E., Donnarumma G., De Martino L., Marcatili G., Cipollaro de l'Ero, Merone A., 1994. Effect of low nutrient seawater on morphology, chemical composition and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Arch. Microbiol.*, **162**, 41-47.
- Gameson A.L.H., Gould D.J., 1974. Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in sea water. In : International symposium DSSO "Discharge of sewage from sea outfall" Ed. Gameson Pergamon, 209-219.
- Gameson A.L.H., Gould D.J., 1975. Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in seawater in discharge of sewage from sea outfalls. Ed. Gameson-Pergamon Press, 209-218.
- Gameson A.L.H., 1980. Variability of bacterial counts in coastal waters. *Prog. Wat. Tech.*, **12**, 481-489.
- Ganoulis J.G., 1991. Water quality assessment and protection measures of a semi-enclosed coastal area : the bay of Thermaikos (NE Mediterranean Sea). *Mar. Pol. Bul.*, **23**, 83-87.
- Garcia-Lara J., Menon P., Servais P., Billen G., 1991. Mortality of fecal bacteria in seawater. *Appl. Env. Microb.*, **57**, 885-888.
- Gauthier M., Flateau G.N., Clément R.L., 1992a. Mécanismes de l'halotolérance : transports des substrats nutritifs par *Escherichia coli* dans les conditions marines. Programme National d'Océanographie Côtière, volet "Microbiologie sanitaire", Rapport final 1992, 25 p.

- Gauthier M., Flateau G.N., Clément R.L., Munro P.M., 1993.** The loss of culturability of *E. coli* cells in seawater depends on availability of phosphate ions and phosphate transport systems. *Microb. Ecol.*, **26**, 29-35.
- Gauthier M.J., Labedan B., Breittmayer V.A., 1992.** Influence of DNA supercoiling on the loss of culturability of *Escherichia coli* cells incubated in seawater. *Molecular Ecol.*, **1**, 183-190.
- Gauthier M.J., Munro P.M., Flatau G.N., Clément R.L., Breittmayer V.A., 1993.** Nouvelles perspectives sur l'adaptation des entérobactéries dans le milieu marin. *Mar. Life*, **3**, 1-18.
- Ghoul M., 1990.** Halotolerance de *E. coli*. Effet des osmoprotecteurs naturels. *Doc. Univ. Rennes I.*, 167 p.
- Ghoul M., Minet J., Bernard T., Sinbandhit S., Cormier M.** Osmoprotective effect of marine macroalgae on salt - stressed *E. coli* : efficiency of dimethylsulfonylacetate released from *Ulva lactuca* thalli (soumis à Appl. Env. Microbiol.).
- Godefroy D., C. Etourneau, 1994.** Bilan de douze années de suivi sanitaire de la conchyliculture en baie de Veys. Rapport interne Ifremer DEL 94-06 Port-en-Bessin, 73 p.
- Gourmelon M., 1995.** Etude de la lumière visible comme facteur limitant de la survie d'*Escherichia coli* en milieu marin. *Thèse de doctorat* (Univ. Rennes), 142 p.
- Gourmelon M., Cillard J., Pommepuy M., 1994.** Visible light damage to *Escherichia coli* in seawater, oxidative stress hypothesis. *J. Appl. Bacteriol.*, **77**, 105-112
- Grimes D.J., Colwell R.R., 1986.** Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semi-tropical ocean water. *FEMS, Microbiol. Lett.*, **34**, 161-165.
- Grouhel A., B. Raffin, 1993.** Réseau de surveillance microbiologique - Rémi. Répertoire des points et liste des codes. Rapport interne IFREMER DEL, 116 p.
- Guillaud J.F., 1988.** Programme "Rejets urbains", état d'avancement des études sur le site de Morlaix. Rapport interne IFREMER DRO/EL 88-24, 45 p.
- Guillaud J.F., 1991.** Etude préalable au réaménagement de la station d'épuration de Morlaix (SIVOM de Morlaix Saint-Martin des Champs). Rapport interne IFREMER DRO/EL, 19-03, 54 p.
- Gunnerson C.G., 1974.** Discharge of sewage from sea outfalls. *In* : International symposium DSSO "Discharge of sewage from sea outfall". Ed. Gameson-Pergamon, 415-425.
- Hengge-Aronis R., 1993a.** The role of *rpos* in early stationary phase gene regulation in *Escherichia coli* K12. *In* : *Starvation in bacteria*, Kjelleberg ed., Plenum Press, New York, 171-200.

- Hernandez J.F., Guibert J.M., Delattre J.M., Oger C., Charrière C., Hugues B., Serceau R., Sinegre F., 1991.** Evaluation of a miniaturized procedure for enumeration of *Escherichia coli* in seawater, based upon hydrolysis of 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronidase. *Wat. Res.*, **25**, 1073-1078.
- Hernandez J.F., Pourcher A.M., Delattre J.M., Oger C., Lœuillard J.L., 1993.** MPN miniaturized procedure for the enumeration of faecal enterococci in fresh and marine waters, the MUST procedure. *Wat. Res.*, **27**, 4, pp. 597-606.
- Higgins C.F., Cairney J., Stirling D.A., Sutherland L., Booth I.R., 1987.** Osmotic regulation of gene expression, ionic strength as an intracellular signal ? *Biochem. Sci.* **12**, 339-344.
- Hood M.A., Guckert J.B., White D.C., Deck F., 1986.** Effect of nutrient deprivation of lipid, carbohydrate DNA, RNA and protein levels in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 788-793.
- IFREMER - DDASS de la Manche, 1989a.** Les sources de pollution microbiologique et organique dans le bassin versant du havre de la Vanlée. Incidence sur des activités mytilicoles, juillet 1989.
- IFREMER, 1989.** Bilan des connaissances océanographiques en rade de Brest. DRO-EL 89-23, 106 p.
- IFREMER, 1992.** Etude de la qualité d'une zone conchylicole - Ouest-Cotentin 1990-1992 (entre le havre de Regnéville et Granville). Rapport DEL.92-29-MIC, Brest, 101 p.
- IFREMER, 1994.** Etude de la qualité du milieu marin littoral en Martinique (baie de Fort de France). Rapport interne IFREMER DEL, 93 p.
- IFREMER - DDASS de la Manche, 1989b.** Surveillance sanitaire des eaux littorales du département de la Manche, baignade - conchyliculture - pêche à pied - saison 1986-1987-1988.
- IFREMER, Fondation Océanographique Ricard, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Inserm Unité 303, Laboratoire Régional d'hygiène de la ville de Nice, 1987.** Station d'épuration de Toulon Est. Les microorganismes à intérêt sanitaire, concentration et flux. IFREMER rapport interne, 70 p.
- Iriberry I., Ayo B., Artolozaga I., Barcina I., Egea L., 1994.** Grazing on allochthonous vs autochthonous bacteria in river water. *Letters in Appl.*, **18** : 12-14.
- Iriberry I., Ayo B., Santamaria E., Barcina I., Egea L., 1995.** Influence of bacterial density and temperature on the grazing activity of two freshwater ciliates. *Freshwater biology*, **33**, 223-231.

- Irving T.E., 1977. Preliminary investigation, on the effects of particulate matter on the fate of sewage bacteria in the sea. *Wat. Research Center Technical Report TR55*, 22 p.
- Izzo G., Tosti E., Voltera L. Fecal contamination of marine sediments in a stretch of Gulf of Naples. *Wat. Air Soil Pol.*, **20**, 191-198.
- Kogure K., Simidu V., Taga N., 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**, 415-420.
- L'Yavanc J., 1984. Etude hydrologique de l'estuaire de l'Elorn. Rapport Ifremer DRO/EL, 29 + annexes.
- L'Yavanc J., 1987. Evolution bathymétrique et morphologique de la rivière et de la baie de Morlaix. Ifremer DRO-87-15 EL, 89 p. + Annexes.
- L'yavanc J., 1992. Etude de la qualité d'une zone conchylicole - Ouest-Cotentin - 1990-1992 - Annexe V. Etude bathymétrique, 6 p. + cartes.
- Lafond P., 1992. Côte ouest du Cotentin - Havre de Regnéville et de la Vanlée. Etude des sédiments. Contrat IFREMER, 90.2.43.0442.
- Lazure P., Salomon J.C., Breton M, 1995. Subtidal circulation in Fort de France Bay. *In* : Small Island Oceanography Coastal and Estuaries Studies (in press).
- Le Hir P., Bassoullet P., L'Yavanc, 1993. Application of a multivariable transport model for understanding cohesive sediment dynamics. *In* : Nearshore and Estuarine cohesive sediment transport (Ed. A. Mehta). Coastal Estuarine Studies, 42, American Geophysical Union series.
- Le Hir P., Guillaud J.F., Pommepuy M., Le Guyader F., Salomon J.C., 1990. Modélisation du transport dissous et particulaire dans l'estuaire de Morlaix. Application au devenir des bactéries entériques. *La Houille Blanche*, 3-4, 6 p.
- Le Rudulier D., Bouillard L., 1993. Glycine-bétaïne, an osmotic effector in *Klebsiella pneumoniae* and others members of the *Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 152-159.
- Linder K., Oliver J.D.L., 1989. Membrane fatty acid and virulence changes in the viable but non culturable state of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2837-2842.
- Matsumoto J., Omura T., 1980. Some factors affecting the survival of fecal indicator bacteria in seawater. *Technology reports*, **45**, n° 2, 169-185.
- McFeters G.A., Gameson S.C., Lechevalier M.W., 1982. Influence of diluents, media and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 97-103.

- McFeters G.A., Pyle B.H., Gillis J.J., Acomb C.J., Ferrazza D., 1993.** Chlorine injury and the comparative performance of Colisure, Colibert and Coliquik for the enumeration of coliform bacteria and *E. coli* in drinking water. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, n° 3-4, 261-265.
- Mesplé F., Trousselier M., Martin Y., Bonnefont J.L., 1994.** Effet de la prédation sur le devenir des bactéries entériques en mer. Modélisation. Programme National d'Océanographie Côtière, "Microbiologie sanitaire". 51 p.
- Mezrioui N., Baleux B., Trousselier M., 1995.** A microcosm study of the survival of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* in brackish water. *Wat. Res.*, **29**, 459-465.
- Michel C., Dubois-Darnaudpeys A., 1980.** Persistence of the virulence of *Aeromonas salmonicida* strains kept in river sediments. *Ann. Rech. Vet.*, **11**, 375-380.
- Milne D.P., Curran J.C., Wilson L., 1986.** Effect of sedimentation on removal of faecal coliform bacteria from effluents in estuarine water. *Wat. Res.*, **20**, 1493-1496.
- Miossec L., 1990.** Mise en place d'un réseau de surveillance microbiologique du littoral français. Rapport Ifremer DRV 90-03, CSRU Nantes.
- Mitchell R., Chamberlin C., 1974.** Factors influencing the survival of enteric microorganisms in the sea : an overview. *In* : International symposium DSSO, "Discharge of sewage from sea outfall" Ed. Gameson Pergamon, 237-251.
- Montfort P., Baleux B., 1994.** Effects of environmental factors present in the St-Laurence estuary (Quebec, Canada) on experimental survival of *Salmonella salamae* as determined by flow cytometry. *Can. J. Microb.*, **40**, 712-719.
- Moyer C.L., Morita R.Y., 1989.** Effect of growth rate and starvation survival on the viability and stability of a psychrophilic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1122-1127.
- Munro P. 1988.** Modifications somatiques et adaptation d'*E. coli* en milieu marin. Thèse de Doctorat de l'Université d' Aix-Marseille II.
- Munro P.M., Gauthier M.J., Breitmayer V.A., Bongiovanni J., 1989.** Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2017-2024.
- Nilsson L., Oliver J.D., Kjelleberg S., 1991.** Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but non culturable state. *J. Bacteriol.*, **173**, 5054-5059.
- Nourry M., Baud D., J.P. Allenou, 1994.** Etude de la salubrité des marais de Beauvoir sur Mer (Vendée). Rapport Interne Ifremer DEL-94.05 Nantes, 45 p.
- Novitsky J.A. , Morita R.Y., 1976.** Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine vibrio. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 617-662.

- Obaton J., 1984. Etude hydrobiologique et bactériologique sur le havre de Regnéville. Contrat CNEXO-83-7052.
- Oliver J.D., 1992. Formation of viable but non culturable cells. In : Starvation in Bacteria., Ed. S. Kjelleberg. *Plenum Press*, 4, 239-272.
- Paerl H.W., Shimps J.L., 1973. preparation of filtered plancton and detritus for study with scanning electron microscopy. *Limnol. Oceanogr.*, 18, 802-805.
- Parker D.S., Jenkins D., Kaufman W.J., 1971. Physical conditioning of the activated sludge floc. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.*, 43 : 1897-1902.
- Pelmont J., 1993. Bactéries et environnement, adaptations physiologiques. PUG, 899 p.
- Perez-Rosas N., Hazen T.C., 1988. *In situ* survival of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* in tropical coral reefs. *Appl. Env. Microbiol.*, 54, 1-9.
- Piezena M., Häder, 1994. Penetration of solar U.V. irradiation in coastal lagoons of the southern baltic sea and its effect on phytoplankton communities. *Photoch. Photobiol.*, 60, 463-469.
- Pommepuy M., A. Derrien, F. Le Guyader, D. Ménard, M.P. Caprais, E. Dubois, E. Dupray, M. Gourmelon, 1995. Microbiol water quality on a Carribean Island (Martinique). In : Small Island Oceanography Coastal and Estuaries Studies (in press).
- Pommepuy M., Guillaud J.F., Martin Y., Dupray E., Derrien A., L'yavanc J., Cormier M., 1991. Le devenir des bactéries en zone littorale. In : La mer et les rejets urbains, IFREMER, *Actes de Colloques* 11, pp. 89-100.
- Pommepuy, 1987. Capacité d'acceptation du milieu marin. Bactériologie rade de Brest. *Rapport Scientifiques et Techniques de l'IFREMER*, 6, 60 p.
- Pradeep R., P. Lakshmanaperumalsamy, 1986. Distribution of fecal indicator bacteria in Cochin backwater. *Indian J. Mar. Sci.*, 15, 99-101.
- Qualls R.G., Ossoff S.F., Chang J.C.H., Dorfman M.H., Dumais C.M., Lobe D.C., Johnson J.D., 1985. Factors controlling sensitivity in ultraviolet disinfection of secondary effluents. *J. Wat. Poll. Control. Fed.*, 57, 1006-1011.
- Roberts P.J.W., Williams N., 1992. Modeling of ocean outfall discharges. *Wat Sci. Tech.*, 25, 155-164.
- Robertson W.J., Tobin R.S., 1983. The relationship between three potential pathogens and pollution indicator organisms in Nova Scotian coastal waters. *Can J. Microbiol.*, 29, 1261-1269.
- Roszak D.B., Colwell R.R., 1987a. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.*, 51, 365-379.

- Roszak D.B., Colwell R.R., 1987b.** Metabolic activity of bacterial cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2889-2893.
- Salomon J.C., Breton M., 1991.** Courants résiduels de marée dans la Manche. *Oceanologica Acta*, vol. Sp. 11, 47-53.
- Salomon J.C., Garreau P., Breton M., 1994.** The Lagrangian barycentric method to compute 2D and 3D long term dispersion in tidal environments. *In* : mixing processes in estuaries and coastal seas. (Ed. Pattiaratchi) American Geophysical Union Series.
- Salomon J.C., Pommepuy M., 1990.** Mathematical model of bacterial contamination of Morlaix estuary (France). *Wat. Res.*, 24, 983-990.
- Saunier Eau et Environnement, 1994.** Recensement des flux de pollution se déversant dans la rade de Brest. Communauté Urbaine de Brest, 16 p. + annexes.
- Sayler G.S., Nelson J.D., Justice J.R.A., R.R. Colwell, 1976.** Incidence of *Salmonella spp.*, *Clostridium botulinum* and *Vibrio parahaemolyticus* in an estuary. *Appl. Environ. Microb.*, 3, 723-730.
- Servais P., Menon P., 1991.** Fate of autochthonous and fecal bacteria in marine ecosystems. *Kieler Meereshfors. Sondch.*, 8, 290-296.
- Singh A., McFeters G.A., 1992.** Detection methods for waterborne pathogens in Environmental microbiology. R. Mitchell. Wiley Ed. Lss. Inc., 125-156.
- Sinton L.W., Davies-Colley R.J., Bell R.G., 1994.** Inactivation of enterococci and fecal coliforms from sewage and Meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Env. Microbiol.*, 60, 2040-2048.
- Smith J.J., McFeters G.A., 1994.** Effect of respiratory inhibitors, uncouplers and an electron donor on CTC and INT reduction in *E. coli* K12. ASM Meeting - Las Vegas, 1994.
- Solic M., Krstulovic N., 1992.** Separate and combined effects of solar radiation, temperature, salinity and pH on the survival of faecal coliforms in seawater. *Mar. Pollut. Bull.*, 24, 411-416.
- Strøm A.R., Falkenberg P., Landfald B., 1986.** Genetics of osmoregulation in *E. coli*, uptake and biosynthesis of organic osmolytes. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39, 79-86.
- Thouvenin B., 1991.** Caractéristiques et modélisation d'un rejet par émissaire. *In* : La mer et les rejets urbains, IFREMER, *Actes de Colloques* 11, 221-240.
- Tokuda H., Unemoto T., 1985.** The Na<sup>+</sup> motive respiratory chain of marine bacteria. *Microbiol. Sciences*, 2, 65-71.

- Troussellier M., Cahet G., Baleux B., 1993.** Distribution and dynamics of bacterial production in relation to wind perturbations in a mediterranean lagoon. *Limnol. Oceanogr.*, **38**, 193-201.
- Troussellier M., Le Baron P., Joux F., Courtis C., 1994.** Caractérisation des états cellulaires au cours de la survie des entérobactéries dans le milieu marin. PNOC - Rapport d'activité 1993-1994, 32 p.
- Troussellier M., Legendre P., 1989.** Dynamics of fecal coliform and culturable heterotroph densities in an eutrophic ecosystem, stability of model and evolution of these bacterial groups. *Microb. Ecol.*, **17**, 227-235.
- UER Rennes-CNEXO, 1981.** Etude des particules. Apports des bactéries dans les rejets et les eaux de mer littorales. Contrat 81-6684. 26 p. + photos.
- Van Overbeek L.S., Van Elsas J.D., Trevors J.T., Starodub M.E., 1990.** Long term survival of and plasmid stability in *Pseudomonas* and *Klebsiella* species and appearance of non-culturable cells in agricultural drainage water. *Microb. Ecol.*, **19**, 239-249.
- Webb R.B., Brown M.S., 1976.** Sensitivity of strains of *Escherichia coli* differing in repair capacity to far UV, near UV and visible radiations. *Photochem. Photobiol.*, **24**, 425-432.
- Xu H.S., Roberts N., Singleton F.L., Atwell R.W., Grimes D.J., Colwell R.R., 1982.** Survival and viability of non culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, **8**, 313-323.
- Zimmerman R., Iturriaga R., Becker-Birck J., 1978.** Simultaneous determination of the total number of aquatic bacteria and the number therefor involved in respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **36** : 926-935.



## RESUME

Le devenir des bactéries entériques rejetées en mer a été étudié sur cinq zones côtières du littoral français : la côte Ouest du Cotentin, la rade de Brest, l'estuaire de Morlaix, la rade de Toulon et la Baie de Fort de France. Sur chaque site, une étude a permis de déterminer les concentrations en coliformes thermotolérants et en streptocoques fécaux dans les principaux apports. Les salmonelles ont également été recherchées sur trois de ces secteurs. Un calcul de flux permet d'apprécier l'importance des rejets urbains. Dans ces eaux généralement très chargées en contamination fécale, la présence de salmonelles a presque toujours été détectée.

La qualité des eaux littorales et des sédiments côtiers a ensuite fait l'objet d'observations. Les caractéristiques des sites et des eaux rejetées déterminent les niveaux de contamination : nature des rejets (rivière ou rejets urbains), géométrie du site (côte ouverte, estuaire ou baie), hydrodynamisme (mer à marée ou sans marée), présence de vasières, conditions climatiques, tous ces facteurs jouent un rôle important sur le devenir des bactéries.

Ainsi, la variation des temps de survie d'*Escherichia coli* est due à la qualité du milieu récepteur : dans les eaux oligotrophes bien ensoleillées, l'effet de la lumière visible provoque une décroissance rapide des numérations bactériennes. Le T90 - temps nécessaire pour que 90 % des bactéries ne cultivent plus - est alors inférieur à deux ou trois heures. *In vitro*, il a été démontré que la lumière visible agissait sur *E. coli* en présence d'oxygène par la production endogène d'espèces toxiques (principalement le peroxyde d'hydrogène et l'anion superoxyde). Cependant, la perte de cultivabilité des entérobactéries ne s'accompagne pas toujours d'une perte de la viabilité. De plus, il semblerait que le pouvoir pathogène puisse alors être conservé.

Le rôle majeur de la lumière est atténué, voire annulé, par la présence de matières en suspension. Ces dernières jouent un rôle très important, en arrêtant les rayons lumineux, elles protègent les bactéries de l'effet bactéricide de certaines longueurs d'onde. Les T90 peuvent alors atteindre plusieurs dizaines d'heures voire quelques jours.

A leur sortie des stations d'épuration, une partie des bactéries peut être agglomérée ou piégée dans des floccs. Les expériences *in vitro* montrent que dans ces eaux, les particules minérales peu contaminées sédimentent plus rapidement que les bactéries. Dans les zones côtières, on observe des périodes de sédimentation et de contamination du sédiment alternant avec des périodes de remise en suspension. L'utilisation de modèles numériques permet de hiérarchiser les facteurs responsables des contaminations observées. Ainsi dans l'estuaire de Morlaix ou en rade de Brest, les facteurs physiques de dilution seraient responsables en grande partie de la diminution des décroissances observées.

Les modifications métaboliques provoquées par le stress marin sont nombreuses : perte de cultivabilité, modification des systèmes énergétiques, diminution des synthèses protéiques... Cependant la matière organique présente dans l'eau des rejets et dans les eaux côtières permet à la bactérie de s'adapter ou d'évoluer vers un état dit "viable", non cultivable, où les activités enzymatiques sont préservées ( $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase et hydrolase).

La présence de bactéries fécales viables mais non cultivables doit être prise en compte dans l'appréciation de la contamination des eaux côtières.

**Mots clés :** eau de mer, estuaire, coliformes thermotolérants, streptocoques fécaux, T90, lumière, stress oxydatif et oligotrophique.