



MEDITERRANEAN ACTION PLAN
MED POL

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME



WORLD HEALTH ORGANIZATION

BIOGEOCHEMICAL CYCLES OF SPECIFIC POLLUTANTS (ACTIVITY K)
Survival of Pathogens

CYCLES BIOGEOCHIMIQUES DE POLLUANTS SPECIFIQUES (ACTIVITE K)
Survie des Pathogènes

Final Reports on Research Projects
Rapports finaux sur les projets de recherche

MAP Technical Reports Series No. 49

Note: The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO and UNEP concerning the legal status of any State, Territory, city or area, or of its authorities, or concerning the delimitation of their frontiers or boundaries. The views expressed in this volume are those of the authors and do not necessarily represent the views of either WHO or UNEP.

Note: Les appellations employées dans ce document et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'OMS et du PNUE aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les vues exprimées dans ce volume sont celles de leurs auteurs et ne représentent pas forcément les vues de l'OMS ou du PNUE

For bibliographic purposes this volume may be cited as:

UNEP/WHO: Biogeochemical Cycles of Specific pollutants (Activity K): Survival of pathogens. Final Reports on Research Projects. MAP Technical Reports Series No. 49. UNEP, Athens, 1991.

Pour des fins bibliographiques, citer le présent volume comme suit:

PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Survie des pathogènes. Rapports finaux sur les projets de recherche. MAP Technical Reports Series No. 49. UNEP, Athens, 1991.

This volume is the forty-ninth issue of the Mediterranean Action Plan Technical Report Series.

This series contains selected reports resulting from the various activities performed within the framework of the components of the Mediterranean Action Plan: Pollution Monitoring and Research Programme (MED POL), Blue Plan, Priority Actions Programme, Specially Protected Areas and Regional Marine Pollution Emergency Response Centre for the Mediterranean Sea.

Ce volume constitue le quarante-neuvième numéro de la série des Rapports techniques du Plan d'action pour la Méditerranée.

Cette série comprend certains rapports élaborés au cours de diverses activités menées dans le cadre des composantes du Plan d'action pour la Méditerranée: Programme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution (MED POL), Plan Bleu, Programme d'actions prioritaires, Aires spécialement protégées et Centre régional méditerranéen pour l'intervention d'urgence contre la pollution marine accidentelle.

GENERAL INTRODUCTION

The United Nations Environment Programme (UNEP) convened an Intergovernmental Meeting on the Protection of the Mediterranean (Barcelona), 28 January - 4 February 1975), which was attended by representatives of 16 States bordering on the Mediterranean Sea. The meeting discussed the various measures necessary for the prevention and control of pollution of the Mediterranean Sea, and concluded by adopting an Action Plan consisting of three substantive components:

- Integrated planning of the development and management of the resources of the Mediterranean Basin (management component);
- Co-ordinated programme for research, monitoring and exchange of information and assessment of the state of pollution and of protection measures (assessment component);
- Framework convention and related protocols with their technical annexes for the protection of the Mediterranean environment (legal component).

All components of the Action Plan are interdependent and provide a framework for comprehensive action to promote both the protection and the continued development of the Mediterranean ecoregion. No component is an end in itself. The Action Plan is intended to assist the Mediterranean Governments in formulating their national policies related to the continuous development and protection of the Mediterranean area and to improve their ability to identify various options for alternative patterns of development and to make choices and appropriate allocations of resources.

MED POL - Phase I (1976-1980)

The Co-ordinated Mediterranean Research and Monitoring Programme (MED POL) was approved as the assessment (scientific/technical component) of the Action Plan.

The general objectives of its pilot phase (MED POL - Phase I), which evolved through a series of expert and intergovernmental meetings, were:

- to formulate and carry out a co-ordinated pollution monitoring and research programme taking into account the goals of the Mediterranean Action Plan and the capabilities of the Mediterranean research centres to participate in it;
- to assist national research centres in developing their capabilities to participate in the programme;
- to analyse the sources, amounts, levels, pathways, trends and effects of pollutants relevant to the Mediterranean Sea;
- to provide the scientific/technical information needed by the Governments of the Mediterranean States and the EEC for the negotiation and implementation of the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution and its related protocols;
- to build up consistent time-series of data on the sources, pathways, levels and effects of pollutants in the Mediterranean Sea and thus to contribute to the scientific knowledge of the Mediterranean Sea.

MED POL - Phase I was implemented in the period from 1975 to 1980. The large number of national research centres designated by their Governments to participate in MED POL (83 research centres) from 15 Mediterranean States and the EEC), the diversity of the programme and

its geographic coverage, the impressive number of Mediterranean scientists and technicians (about 200) and the number of co-operating agencies and supporting organizations involved in it, qualifies MED POL as certainly one of the largest and most complex co-operative scientific programmes with a specific and well-defined aim ever undertaken in the Mediterranean Basin.

MED POL - Phase II (1981-1990)

The Intergovernmental Review Meeting of Mediterranean Coastal States and First Meeting of the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution, and its related protocols (Geneva, 5-10 February 1989), having examined the status of MED POL - Phase I, recommended that during the 1979/80 biennium a Long-term pollution monitoring and research programme should be formulated.

Based on the recommendations made at various expert and intergovernmental meetings, a draft Long-term (1981-1990) Programme for pollution monitoring and Research in the Mediterranean (MED POL-Phase II) was formulated by the Secretariat of the Barcelona Convention (UNEP), in co-operation with the United Nations Agencies which were responsible for the technical implementation of MED POL-Phase I, and it was formally approved by the Second Meeting of the Contracting Parties of the Mediterranean Sea against pollution and its related protocols and Intergovernmental Review Meeting of Mediterranean Coastal States of the Action Plan held in Cannes, 2-7 March 1981.

The general long-term objectives of MED POL-Phase II were to further the goals of the Barcelona Convention by assisting the Parties to prevent, abate and combat pollution of the Mediterranean Sea area and to protect and enhance the marine environment of the area. The specific objectives were designed to provide, on a continuous basis, the Parties to the Barcelona Convention and its related protocols with:

- information required for the implementation of the Convention and the protocols;
- indicators and evaluation of the effectiveness of the pollution prevention measures taken under the Convention and the protocols,
- scientific information which may lead to eventual revisions and amendments of the relevant provisions of the Convention and the protocols and for the formulation of additional protocols;
- information which could be used in formulating environmentally sound national, bilateral and multilateral management decisions essential for the continuous socio-economic development of the Mediterranean region on a sustainable basis;
- periodic assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea.

The monitoring of, and research on, pollutants affecting the Mediterranean marine environment reflects primarily the immediate and long-term requirements of the Barcelona Convention and its protocols, but also takes into account factors needed for the understanding of the relationship between the socio-economic development of the region and the pollution of the Mediterranean Sea.

As in MED POL-Phase I, the overall co-ordination and guidance for MED POL-Phase II is provided by UNEP as the secretariat of the Mediterranean Action Plan (MAP). Co-operating specialized United Nations Agencies (FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC) are responsible for the technical implementation and day-to-day co-ordination of the work of national centres participating in monitoring and research.

The first eight volumes of the MAP Technical Reports Series present the collection of final reports of the principal Investigators who participated in the relevant pilot projects (MED POL I -

MED POL VIII). The ninth volume of the MAP Technical Reports Series is the final report on the implementation of MED POL-Phase I, prepared, primarily, on the basis of individual final reports of the principal investigators with the co-operation of relevant United Nations Agencies (FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC).

From the tenth volume onwards, the MAP Technical Report Series contains final reports on research projects, assessment documents, and other reports on activities performed within the framework of MED POL-Phase II, as well as documentation originating from other components of the Mediterranean Action Plan.

This forty-ninth volume of the MAP Technical Reports Series contains the final reports of four research projects on survival of pathogens completed within the framework of MED POL in Activity K - "Biogeochemical cycles of specific pollutants".

INTRODUCTION GENERALE

Le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) a convoqué une réunion intergouvernementale sur la protection de la Méditerranée (Barcelone, 28 janvier - 4 février 1975) à laquelle ont pris part des représentants de 16 Etats riverains de la mer Méditerranée. La réunion a examiné les diverses mesures nécessaires à la prévention et à la lutte antipollution en mer Méditerranée, et elle s'est conclue sur l'adoption d'un Plan d'action comportant trois éléments fondamentaux:

- Planification intégrée du développement et de la gestion des ressources du bassin méditerranéen (élément "gestion");
- Programme coordonné de surveillance continue, de recherche, d'échange de renseignements et d'évaluation de l'état de la pollution et des mesures de protection (élément "évaluation");
- Convention cadre et protocoles y relatifs avec leurs annexes techniques pour la protection du milieu méditerranéen (élément juridique).

Tous les éléments du Plan d'action étaient interdépendants et fournissaient le cadre d'une action d'ensemble en vue de promouvoir, tant la protection que le développement continu de l'écorégion méditerranéenne. Aucun élément ne constituait une fin à lui seul. Le Plan d'action était destiné à aider les gouvernements méditerranéens à formuler leurs politiques nationales en matière de développement continu et de protection de zone de la Méditerranée et à accroître leur faculté d'identifier les diverses options s'offrant pour les schémas de développement, d'arrêter leurs choix et d'y affecter les ressources appropriées.

MED POL - Phase I (1976-1980)

Le programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution de la Méditerranée (MED POL) a été approuvé au titre de l'élément "évaluation" (scientifique/technique) du Plan d'action.

Sa phase pilote (MED POL-Phase I) avait les objectifs généraux ci-dessous, élaborés au cours d'une série de réunions d'experts et de réunions intergouvernementales:

- formuler et exécuter un programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution en tenant compte des buts du Plan d'action pour la Méditerranée et de l'aptitude des centres de recherche méditerranéens à y participer;
- aider les centres de recherche nationaux à se rendre plus aptes à cette participation;
- étudier les sources, l'étendue, le degré, les parcours, les tendances et les effets des polluants affectant la mer Méditerranée;
- fournir l'information scientifique et technique nécessaire aux gouvernements des pays méditerranéens et à la Communauté économique européenne pour négocier et mettre en oeuvre la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et les protocoles y relatifs;
- constituer des séries chronologiques cohérentes de données sur les sources, les cheminements, les degrés et les effets des polluants de la mer Méditerranée et contribuer par là à la connaissance scientifique de cette mer.

La Phase I du MED POL a été mise en oeuvre au cours de la période 1975-1980. Le grand nombre de centres de recherche nationaux désignés par leurs gouvernements pour participer au MED POL (83 centres de recherche de 15 Etats méditerranéens et de la CEE), la diversité du programme et sa couverture géographique, l'effectif impressionnant de scientifiques et techniciens méditerranéens (environ 200) ainsi que la quantité d'organismes coopérants et d'organisations d'appui qui y étaient engagés permettent sans conteste de caractériser le MED POL comme l'un des programmes de coopération scientifique les plus vastes et les plus complexes, comportant un objectif spécifique et bien défini, qui ait jamais été entrepris dans le bassin méditerranéen.

MED POL-Phase II (1981-1990)

La réunion intergouvernementale des Etats riverains de la Méditerranée chargés d'évaluer l'état d'avancement du Plan d'action et première réunion des Parties contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et aux protocoles y relatifs (Genève, 5-10 février 1979), ayant examiné la situation de la Phase I du MED POL, a recommandé que, durant la période biennale 1979-80, soit formulé un programme à long terme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution.

Sur la base des recommandations énoncées lors des diverses réunions d'experts et réunions intergouvernementales, un projet de programme à long terme (1981-1990) de surveillance continue et de recherche en matière de pollution (MED POL - Phase II) a été formulé par le secrétariat de la Convention de Barcelone (PNUE), en coopération avec les organismes des Nations Unies chargés de l'exécution technique de MED POL - Phase I, et il a été officiellement approuvé lors de la deuxième réunion des Parties contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et aux protocoles y relatifs et réunion intergouvernementale des Etats riverains de la mer Méditerranée chargée d'évaluer l'état d'avancement du Plan d'action, qui s'est tenue à Cannes du 2 au 7 mars 1981.

L'objectif général à long terme de la Phase II du MED POL était de concourir à la réalisation des objectifs de la Convention de Barcelone en aidant les parties contractantes à prévenir, réduire et combattre la pollution dans la zone de la mer Méditerranée ainsi qu'à protéger et améliorer le milieu marin dans cette zone. Les objectifs particuliers étaient de fournir constamment aux Parties contractantes à la Convention de Barcelone et aux Protocoles y relatifs:

- les renseignements dont elles avaient besoin pour appliquer la Convention et les protocoles;
- des indications et une évaluation de l'efficacité des mesures prises pour prévenir la pollution en application de la Convention et des protocoles;
- des renseignements scientifiques qui pourraient servir à réviser et modifier les dispositions pertinentes de la Convention et des protocoles et à rédiger des protocoles additionnels;
- des informations qui pourraient servir à formuler sur les plans national, bilatéral et multilatéral, les décisions de gestion, respectueuses de l'environnement, qui seraient indispensables à la poursuite du développement socio-économique de la région méditerranéenne;
- une évaluation périodique de l'état de pollution de la mer Méditerranée.

La surveillance continue des polluants affectant le milieu marin de la Méditerranée ainsi que la recherche menée à leur sujet répondent en premier lieu aux prescriptions immédiates et à long terme de la Convention de Barcelone et des protocoles y relatifs, mais elles tiennent également compte des facteurs requis pour la compréhension des relations existant entre le développement socio-économique de la région et la pollution de la mer Méditerranée.

Comme lors de la Phase I du MED POL, la coordination et la direction générales de la Phase II étaient assurées par le PNUE, par l'intermédiaire du secrétariat du Plan d'action pour la Méditerranée (PAM). Les organismes spécialisés coopérants des Nations Unies (FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI) étaient chargés de l'exécution technique et de la coordination quotidienne des travaux des centres de recherche nationaux participant au programme de surveillance continue et de recherche.

Les huit premiers volumes de la Série des rapports techniques du PAM rassemblent les rapports finaux de chercheurs responsables qui ont participé aux projets pilotes correspondants (MED POL I -MED POL VIII). Le neuvième volume de cette même Série se compose du rapport final sur la mise en oeuvre de la Phase I du programme MED POL, établi essentiellement sur la base des rapports finaux individuels des chercheurs responsables avec la coopération des organismes compétents des Nations Unies (FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI).

A partir du dixième volume, la Série des rapports techniques du PAM, comprend des rapports finaux sur les projets de "recherche", des documents d'évaluation et d'autres rapports d'activités effectués dans le cadre de MED POL-Phase II, ainsi que de la documentation prise dans d'autres domaines du Plan d'action pour la Méditerranée.

Ce quarante-neuvième volume de la Série des rapports techniques du PAM comprend quatre rapports finaux sur la survie des pathogènes exécutés dans le cadre de la Phase II du MED POL, dans l'Activité K - "Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques".

TABLE OF CONTENTS/TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
Survival of some intestinal pathogens in the marine environment	
by Dragika Fuks	1
 Some environmental factors affecting survival of faecal pathogens and indicator organisms in seawater	
by F.M. El-Sharkawi, L. El-Attar, A. Abdel Gawad and S. Mozalem	21
 Adaptation des entérobactéries pathogènes à l'eau de mer (modèle <i>Escherichia coli</i>)	
par M.J. Gauthier, P.M. Munro et V.A. Breittmayer	33
 Evolution phénotypique et génétique des entérobactéries pathogènes dans le milieu marin (sédiments, biomasse)	
par M.J. Gauthier	43

SURVIVAL OF SOME INTESTINAL PATHOGENS IN THE MARINE ENVIRONMENT

by

Dragica FUKS

Rudjer Boskovic Institute
Center for Marine Research Rovinj
G. Pallaga 5, 52210 Rovinj,
Yugoslavia

1. INTRODUCTION

The common practice of disposing of untreated sewage and other wastes in the sea is of growing concern, as it may result in the contamination of shellfish areas and bathing beaches by pathogenic microorganisms. These microorganisms may survive sufficiently long in seawater to be transmitted to man, for instance through shellfish which have been exposed to pollution. Oysters and mussels concentrate bacteria suspended in the water, so that, unless purified, they offer a risk of infection. The relatively low incidence of disease among swimmers in polluted areas indicates that a process of self-purification, as a result of a combination of physical, chemical and biological factors, takes place in seawater. Extensive studies have been carried out on the survival of *Escherichia coli*, coliforms and faecal streptococci in seawater (1-9), but little work has been done to determine the fate of salmonellas and shigellas entering bathing areas through sewage or other routes.

The purpose of this study was to determine the effects of organic matter, temperature and light intensity on the survival of some *Salmonella* and *Shigella* strains, *Escherichia coli* and faecal coliforms in a marine environment, and in laboratory-performed experiments with natural seawater.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Chamber design

The diffusion culture chamber was constructed of three plexiglass rings (6 cm inner diameter) held together by 6 steel bolts. The inner ring formed a 20 ml growth chamber which was enclosed by 0.45 μ m porosity membranes (Millipore) held in a circular frame of a 6.5 mm thick plexiglass. The total surface area of the membranes in the chamber was 56.8 cm², and the surface area to volume ratio was 2.84. Two hypodermic needles were fitted into the top of the central spacer to allow filling and withdrawal of samples. The plexiglass parts of the chambers were sterilized by autoclaving, and the membranes were irradiated with ultraviolet light.

2.2 Bacterial inocula and enumeration

In the experiments, the following organisms were used: *Escherichia coli* B, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella newport*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* and faecal coliforms. These test organisms were selected because they are the ones most frequently isolated from faecal material of the local population. The test organisms were cultured in liquid Dextrose broth (beef extract - 3g, peptone - 5g, dextrose - 10g, NaCl - 5g, KH₂PO₄ - 1g, K₂HPO₄ - 3g, in 1 litre distilled water) to log phase and transferred to separate dialysis chambers. The population of enteric bacteria after dilution ranged from 10⁵-10⁹ n ml⁻¹. A replicate of 1 ml sample was withdrawn from each container with a sterile syringe.

Bacteria were enumerated by the spread plate method using dextrose nutrient agar for all tested bacteria, and marine agar (peptone - 5g, yeast extract - 1g, FePO_4 - 0.001g, agar - 15g, in 1 liter of 75% aged seawater) for heterotrophic marine bacteria. *E. coli*, salmonellas, shigellas and faecal coliforms were incubated at 37° C for 24 hours, heterotrophic bacteria at 25° C for three days. Colonies appearing on the plate were counted.

2.3 Field experiments

Field experiments were performed at three different stations. Station No 1 was situated in the vicinity of a sewage outfall, while stations No 2 and No 3 were about 2 km far from station No 1 (Figure 1).

The following environmental parameters were measured in the sea: sea temperature, pH, oxygen, salinity, BOD_5 , nutrients (P-tot., PO_4 , NH_3 , NO_2 , NO_3), particulate organic matter, light intensity and heterotrophic marine bacteria. All environmental parameters were analyzed by standard oceanographic methods.

Four groups on *in situ* experiments were performed:

- Group I - Two experiments were performed at stations No 1 and No 2. Bacteria tested were: *S. enteritidis*, *S. newport*, *S. typhimurium* and *E. coli*. The initial concentration of bacteria after dilution ranged from 10^7 - 10^9 n ml⁻¹. Chambers loaded with suspensions of washed cells were hung on a metal construction and immersed at 1 m depth at both stations. The experiments started between 9.00 and 10.30 a.m. All experiments were conducted under sunny weather, and "summer" and "winter" temperature of the sea. Bacterial samples from the chambers were selected at 1, 2, 4, 6, 24 and 28 hours from the start of the experiment.
- Group II - Two experiments were performed at stations No 1 and No 2. Bacteria tested were: *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *Sh. flexneri*, *Sh. sonnei* and *E. coli*. The initial concentration of bacteria after dilution ranged from 10^7 - 10^9 n ml⁻¹. Chambers loaded with a suspension of washed cells hung on a metal construction were immersed at 1 m depth and anchored at both stations. The experiments started between 9.00 and 9.30 a.m. All experiments were conducted under sunny weather and "summer" and "winter" temperature of the sea. Samples of bacteria from the chambers were selected at 1, 2, 4, 6 and 24 hours from the start of the experiment.
- Group III - Two experiments were performed at station No 2. The tested bacterium was *E. coli*. The initial concentration of bacteria after dilution ranged from 10^5 - 10^8 n ml⁻¹. The diffusion chambers loaded with a suspension of washed test bacteria were hung on a metal construction and immersed at 1m depth and anchored at station No 2. The experiments started between 8.30 and 10.00 a.m. Both experiments were conducted under sunny weather and "summer" and "winter" temperature of the sea. Samples of bacteria from the chambers were selected at 1, 2, 4, 6 and 24 hours from the start of the experiment.
- Group IV - Six experiments were performed at station No 3. Bacteria tested were: *S. typhimurium*, *E. coli* and faecal coliforms. The initial concentration of bacteria after dilution ranged from 10^7 - 10^9 n ml⁻¹. Chambers loaded with a suspension of washed cells were hung on a metal construction and immersed at 1, 18 and 27 m depths and anchored at station No 3. The experiments started between 8.30 and 9.30 a.m. All experiments were conducted under sunny weather, "summer" temperature and water column stratification of the sea. Samples of bacteria from the chambers were selected at 1, 2, 4 and 6 hours from the start of the experiment.

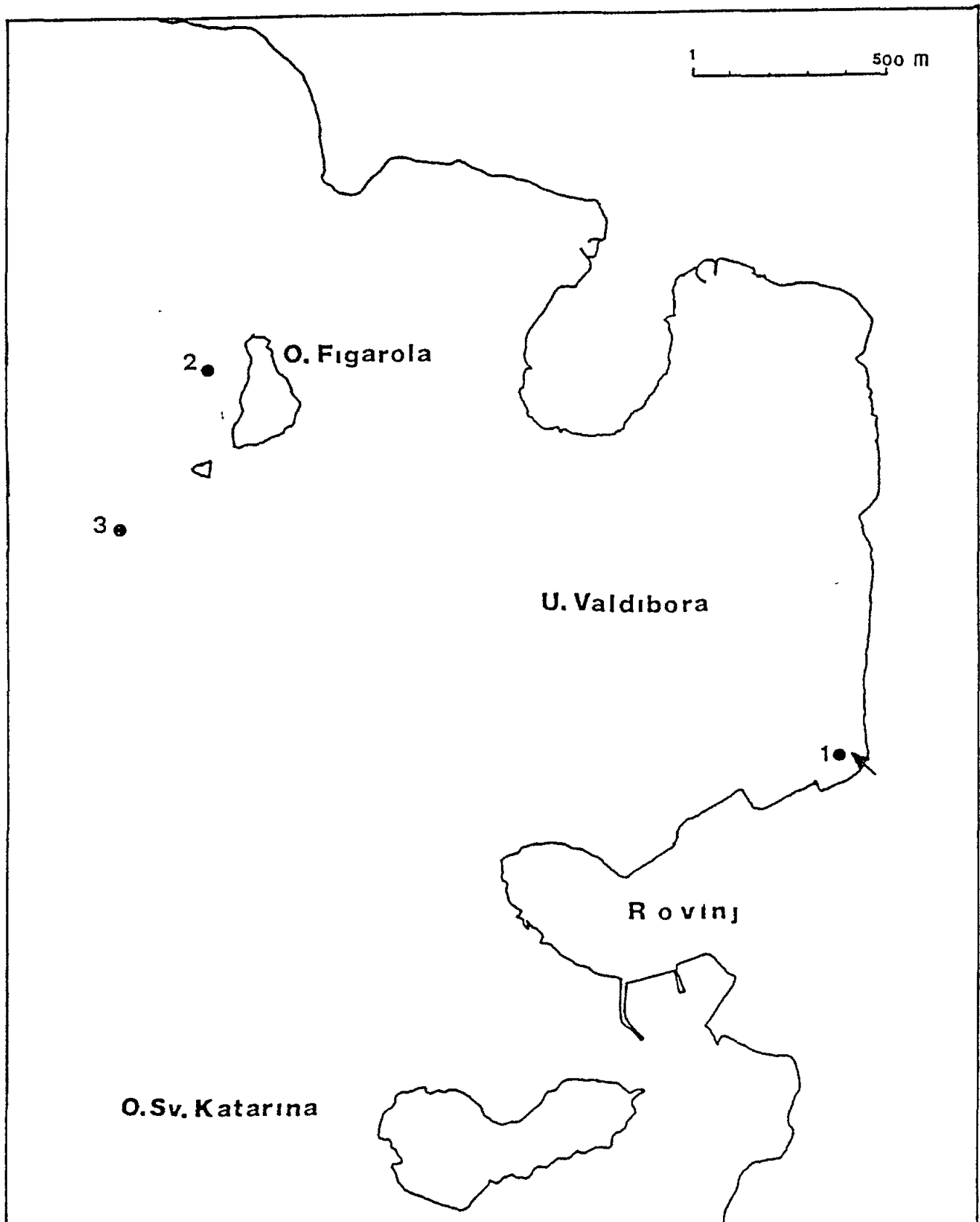


Figure 1
Location of field experiment stations

2.4 Laboratory experiments

Bacterial survival experiments were also performed under laboratory conditions. The chambers were immersed in the water from stations No 1 and No 2 that filled the glass vessels which were suspended in a refrigerated water bath to control the temperature. Two experiments with seawater from stations No 1 and No 2, at two different temperatures (12 and 23° C), were performed. The tested bacteria were: *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, *S. newport* and *E. coli*. All environmental parameters controlled in field experiments were also measured in laboratory experiments.

2.5 Die-off rate

The disappearance or die-off rate, known as T_{90} (i.e. the time required for 90% reduction in bacterial numbers), was estimated by linear regression of the logarithmic microbial count. The use of the exponential reduction model to correlate the measured bacterial concentration with the time was quite satisfactory. The coefficient correlation always had a value close to 1 ($r = 0.88-0.99$ in field experiments, $r = 0.78-0.99$ in laboratory experiments).

3. RESULTS AND DISCUSSIONS

3.1 The results of measurements of environmental parameters in the experiments are presented in Tables 1-4. The registered amount of dissolved oxygen, BOD_5 , nutrients and particulate organic matter confirmed a significant influence of the nearby fish plant sewage outfall on the seawater quality at station No 1. A remarkable difference, two of three order of magnitude, between the recorded concentration of heterotrophic marine bacteria revealed favorable environmental conditions at station No 1 compared to stations No 2 and No 3. Light intensity was recorded during the first six hours of the experiment. The daylight intensity and the sea temperature varied according to the season of the year and depth of the sea, respectively (Table 5).

3.2 Group I

Rates of survival of the bacteria exposed to *in situ* conditions are presented in Table 6. A marked decrease in the survival of the bacteria tested was recorded at station No 1 during a higher sea temperature exposure, while at a lower sea temperature (12° C) all bacteria survived longer. At station No 2, where low organic matter was recorded, die-off rates of all bacteria were significantly greater at low temperature (13° C) as well as at a high temperature exposure (22° C) compared to station No 1.

Survival rates of the bacteria exposed to seawater in laboratory experiments are presented in Table 7. During laboratory exposure to seawater collected from station No 1 and No 2 all bacteria tested survived somewhat longer at both temperatures (12 and 23° C) as compared to *in situ* exposure.

T_{90} values indicated that of *Salmonella* survival was somewhat higher in all experiments as compared to *E. coli* (Tables 10 and 11). None of the differences, however, were significant.

3.3 Group II

Survival rates of bacteria exposed to *in situ* conditions are presented in Table 8. Some decrease in survival was recorded at station No 1 during the higher sea temperature exposure, compared to the lower sea temperature exposure (11° C) except for *Sh. sonnei*, which survived somewhat longer. At station No 2, where low organic matter was recorded, disappearance of all bacteria tested was greater, at both low and high temperature exposures (23-25° C), compared to station No 1 (Table 8)

Table 2

Parameters measured at laboratory experiments
performed with seawater collected at station No 1 and No 2*

Station	No 1		No 2	
Temperature (°C)	12.0	23.0	12.0	23.0
pH	8.10	7.85	8.20	8.12
Salinity (‰)	37.70	37.52	38.26	38.07
Oxygen (ml l ⁻¹)	4.66	2.05	5.72	4.94
Oxygen (%)	76.1	37.4	94.1	87.6
BOD ₅ (mg O ₂ l ⁻¹)	17.96	17.95	0.48	0.20
Particulated organic matter (mg l ⁻¹)	3.51	6.96	0.62	0.65
Nutrients (μmol l ⁻¹)				
P-tot	1.60	3.48	0.50	0.24
PO ₄ -P	1.10	0.54	0.30	0.07
NH ₄ -N	5.50	5.80	6.80	2.18
NO ₂ -N	0.34	0.78	0.12	0.12
NO ₃ -N	7.36	1.53	2.17	3.83
Heterotrophic bacteria (n ml ⁻¹)	5.2x10 ⁵	7x10 ⁵	2x10 ³	750
Light intensity (W m ⁻²)	0.4	0.4	0.4	0.4

* Group I tested bacteria

Table 4

Environmental parameter variations measured during
field experiments at station No 3*

Depth (m)	1			18			27		
Temperature (°C)	20.5	-	24.1	16.1	-	20.4	13.5	-	17.9
pH	8.10	-	8.28	8.00	-	8.22	8.00	-	8.20
Salinity (‰)	35.18	-	37.13	36.46	-	37.59	36.91	-	37.73
Oxygen (ml l ⁻¹)	4.37	-	6.07	3.99	-	6.32	3.49	-	5.91
Oxygen (%)	87.4	-	123.1	74.7	-	114.1	63.4	-	102.4
BOD ₅ (mg O ₂ l ⁻¹)	0.80	-	4.93	0.36	-	1.49	0.35	-	1.97
Particulated organic matter (mg l ⁻¹)	1.42	-	8.14	2.67	-	10.11	1.51	-	8.12
Nutrients (μmol l ⁻¹)									
P-tot	1.08	-	0.65	0.09	-	0.22	0.13	-	0.26
PO ₄ -P	0.03	-	0.24	0.04	-	0.20	0.08	-	0.22
NH ₄ -N	0.46	-	2.86	0.38	-	1.58	0.92	-	2.22
NO ₂ -N	0.01	-	0.06	0.02	-	0.35	0.05	-	0.56
NO ₃ -N	0.81	-	1.97	0.84	-	3.96	1.57	-	2.32
Heterotrophic bacteria (n ml)	60-20050			100-24500			50-16190		

* Group IV tested bacteria

Table 5

Variation of light intensity (W m^{-2}) in the water column at station No 3 during *in situ* experiments

Exposure period (min)	1	Depth (m) 18	27
60	88.6 - 163.9	11.2 - 26.8	1.0 - 5.8
120	102.2 - 167.2	12.9 - 27.3	1.2 - 5.9
240	114.3 - 171.4	15.0 - 28.0	1.4 - 6.1
360	120.6 - 172.7	15.9 - 28.2	1.5 - 6.2

Table 6

Survival(%) of tested bacteria during *in situ* exposure to seawater at stations No 1 and No 2

Station	No 1			No 2		
Time (hours)	0	6	24	0	6	24
Experimental temperature	11.9-12.2 ° C			13.2-13.6 ° C		
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	69.5	23.9	100	1.9	0.4
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	15.3	2.6	100	2.6	0.1
<i>Salmonella newport</i>	100	37.4	2.6	100	7.6	0.08
<i>Escherichia coli</i>	100	20.5	5.8	100	1.0	0.05
Experimental temperature	21.4-33.0 ° C			21.6-22.4 ° C		
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	3.1	0.3	100	0.02	<0.01
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	1.4	0.6	100	0.6	0.02
<i>Salmonella newport</i>	100	0.7	0.08	100	1.6	0.02
<i>Escherichia coli</i>	100	0.2	0.06	100	0.01	<0.01

Table 7

Survival(%) of tested bacteria during laboratory exposure
to seawater at stations No 1 and No 2

Station	No 1			No 2		
Time (hours)	0	6	24	0	6	24
Experimental temperature	12 ° C			12 ° C		
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	11.3	4.4	100	5.7	2.6
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	12.1	3.3	100	6.8	0.9
<i>Salmonella newport</i>	100	6.8	0.3	100	4.8	1.0
<i>Escherichia coli</i>	100	2.6	0.01	100	14.7	0.02
Experimental temperature	23 ° C			23 ° C		
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	12.7	0.5	100	11.3	0.2
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	10.5	1.1	100	3.1	0.03
<i>Salmonella newport</i>	100	23.0	1.3	100	1.5	0.02
<i>Escherichia coli</i>	100	6.2	0.4	100	1.0	0.02

Table 8

Survival(%) of tested bacteria during *in situ* exposure
to seawater at stations No 1 and No 2

Station	No 1			No 2		
Time (hours)	0	6	24	0	6	24
Experimental temperature	11.0-11.4 ° C			9.6-9.7 ° C		
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	2.4	0.4	100	1.8	0.2
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	19.5	5.9	100	10.7	2.1
<i>Salmonella flexneri</i>	100	2.6	1.4	100	5.1	2.9
<i>Shigella sonnei</i>	100	6.2	0.3	100	2.3	0.4
<i>Escherichia coli</i>	100	8.9	3.1	100	3.9	0.2
Experimental temperature	22.8-24.0 ° C			23.6-24.0 ° C		
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	1.5	0.05	100	0.7	0.02
<i>Salmonella typhimurium</i>	100	5.8	3.0	100	2.8	0.05
<i>Salmonella flexneri</i>	100	8.7	0.8	100	2.4	-
<i>Shigella sonnei</i>	100	6.4	3.6	100	3.2	0.05
<i>Escherichia coli</i>	100	0.7	0.1	100	1.2	0.08

T_{90} values in the experiments are presented in Table 12. Values recorded during low temperature exposure varied from 250 to 480 minutes at station No 1 and from 225 to 420 minutes at station No 2 while at a higher temperature exposure T_{90} values varied from 180 to 295 minutes at station No 1 and from 100 to 255 minutes at station No 2. A significant difference in die-off rates, effected by temperature, was noticed for *S. typhimurium* at station No 1 as well as at station No 2. The same die-off rates for both *Shigella* species were noticed at station No 1 during exposure to low and high temperature respectively. The identical effect of increasing temperature on die-off rates of shigellas at station No 2 was noticed (Table 12).

3.4 Group III

Die-off rates of *E. coli* exposed to *in situ* conditions are presented in Table 9. A significant difference in die-off rates of all tested initial concentrations (10^5 - 10^8 n ml⁻¹) affected by temperature, was noticed. T_{90} values varied from 120 to 160 minutes during low temperature exposure and varied from 335 to 355 minutes during high temperature (24.0-25.0°C).

No significant difference in T_{90} values was noticed concerning in the four different initial concentrations of *E. coli* (Table 9).

3.5 Group IV

Die-off rates of bacteria exposed to *in situ* conditions are presented in Figure 5. A marked increase in survival of all tested bacteria (*E. coli*, *S. typhimurium* and faecal coliforms) immersed at 27 m depth compared to 1 m depth was noticed. Die-off rates for *S. typhimurium* and faecal coliforms immersed at 27 m depth were similar, while at 1 m and 18 m depths, faecal coliforms survived somewhat longer compared to *S. typhimurium*. *E. coli* survived for shorter periods as compared to *S. typhimurium* and faecal coliforms at all tested depths.

Die-off rates for *E. coli* and faecal coliforms were halved (by 1.8-2.7 and 2.1-2.5 index, respectively) at the bottom compared to the surface position, while the die-off rate for *S. typhimurium* increased by an index of 2.9-3.9 during the same experiments.

The noted decrease in the survival of enteric bacteria could be the result of seasonal changes in physical parameters such as temperature and solar radiation, as well as changes in chemical and biological parameters such as heavy metals, organic matter, populations of predators or production of inhibitory substances.

In laboratory studies (2, 5, 9-11) the survival time of pure cultures of coliform bacteria in seawater or freshwater has been shown to decrease with increasing temperature. The present study confirms and extends these studies to pure cultures of *Salmonella* and *Shigella* strains. Our results suggest that temperature may exert an important control on the magnitude of decay rates of salmonellas, shigellas and *E. coli*, particularly at low levels of organic matter (Table 12, Figure 2). The effect of temperature on the die-off rate may be related to its effect on the metabolism. At low organic matter levels and low temperatures, the toxic material may be metabolized at slow rates and prolong survival. Graham and Sieburth (12) found that increasing the incubation temperature from 15 to 25° C without adding organic matter led to a decline of *S. typhimurium*.

The survival of the salmonellas and *E. coli* increased when the BOD₅ increased from 0.4 to 44 mg O₂ l⁻¹, while a slight increase of the survival rate was noticed when the BOD₅ increased from 0.4 to 8 mg O₂ l⁻¹ (Figure 3). This is in accordance with the conclusion of Savage and Hanes (13) that above a certain initial level of BOD₅, seawater temporarily loses its toxicity and survival of enteric bacteria becomes dependent on the initial BOD₅ (organic matter present).

A combined influence of organic matter and temperature on both *Shigella* species tested resulted in equal die-off rates at low and high temperatures at station No 1, which was polluted by organic wastes (Table 12).

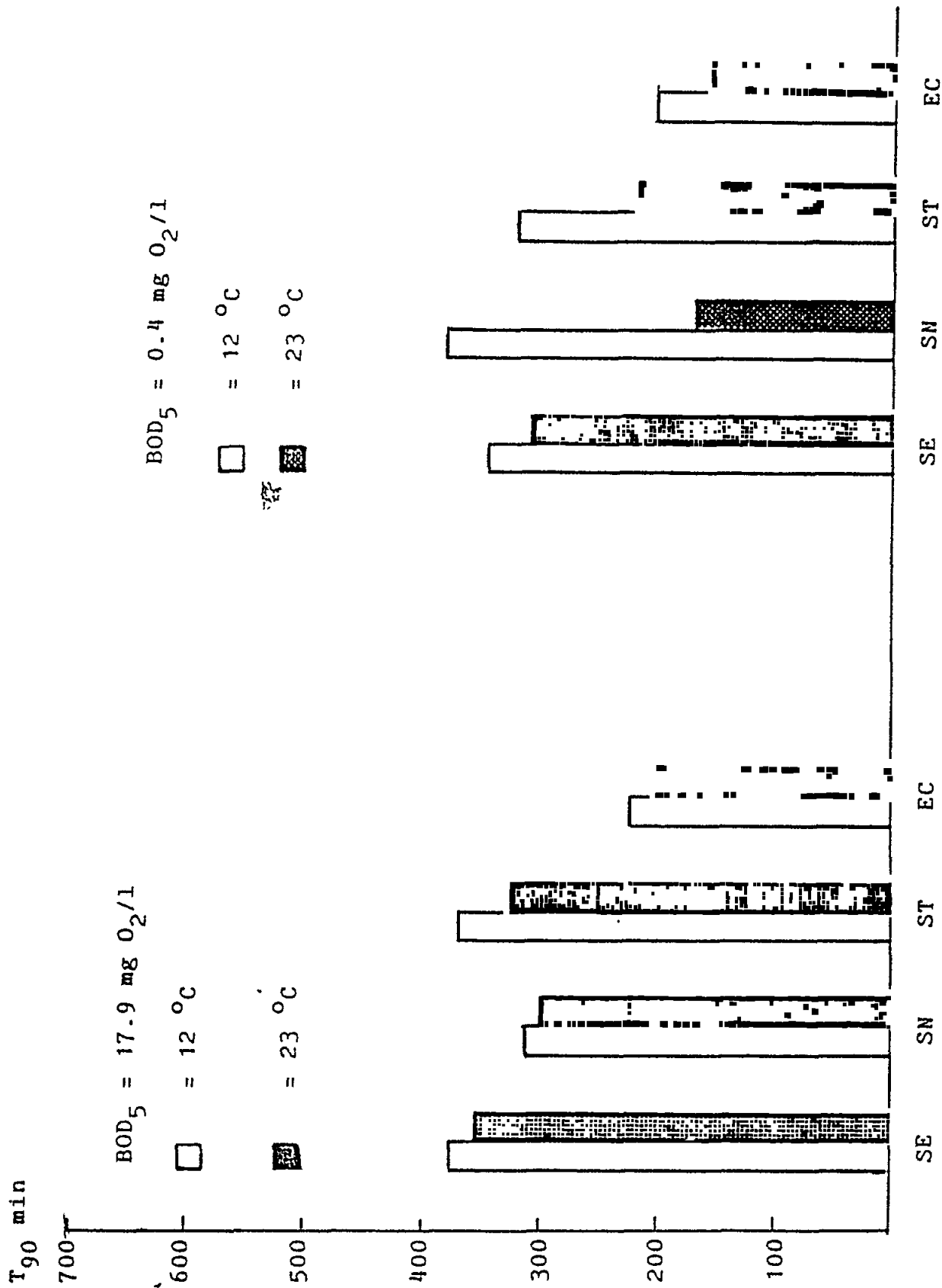


Figure 2: T_{90} of *S. enteritidis* (SE), *S. newport* (SN), *S. typhimurium* (ST), and *E. coli* (EC) in laboratory experiments at two different temperatures and BOD_5 , and identical light intensity (0.4 W m^{-2}).

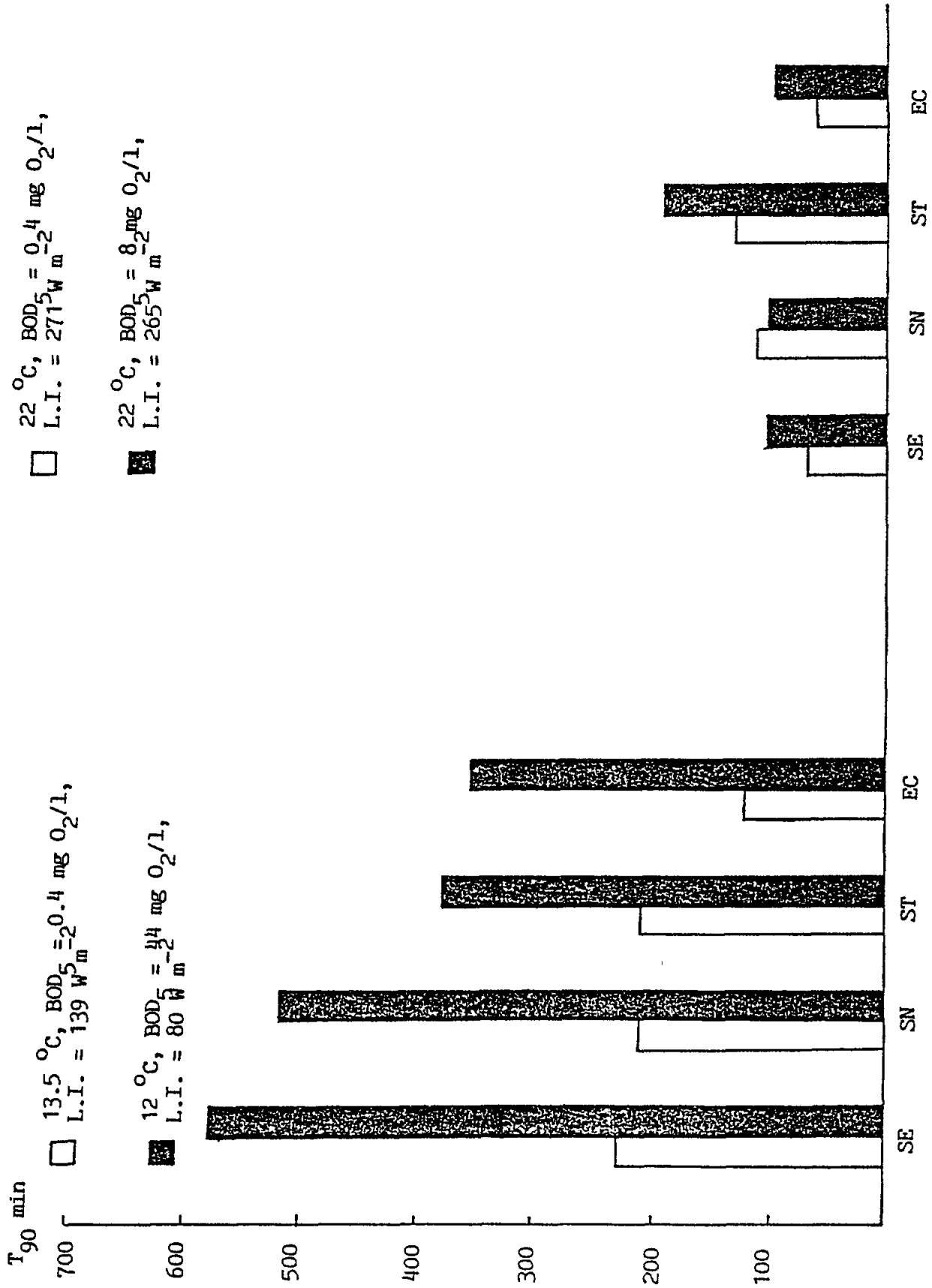


Figure 3: T_{90} of *S. enteritidis* (SE), *S. newport* (SN), *S. typhimurium* (ST) and *E. coli* (EC) in field experiments in function of BOD_5 at identical light intensity (L.I.) and temperature

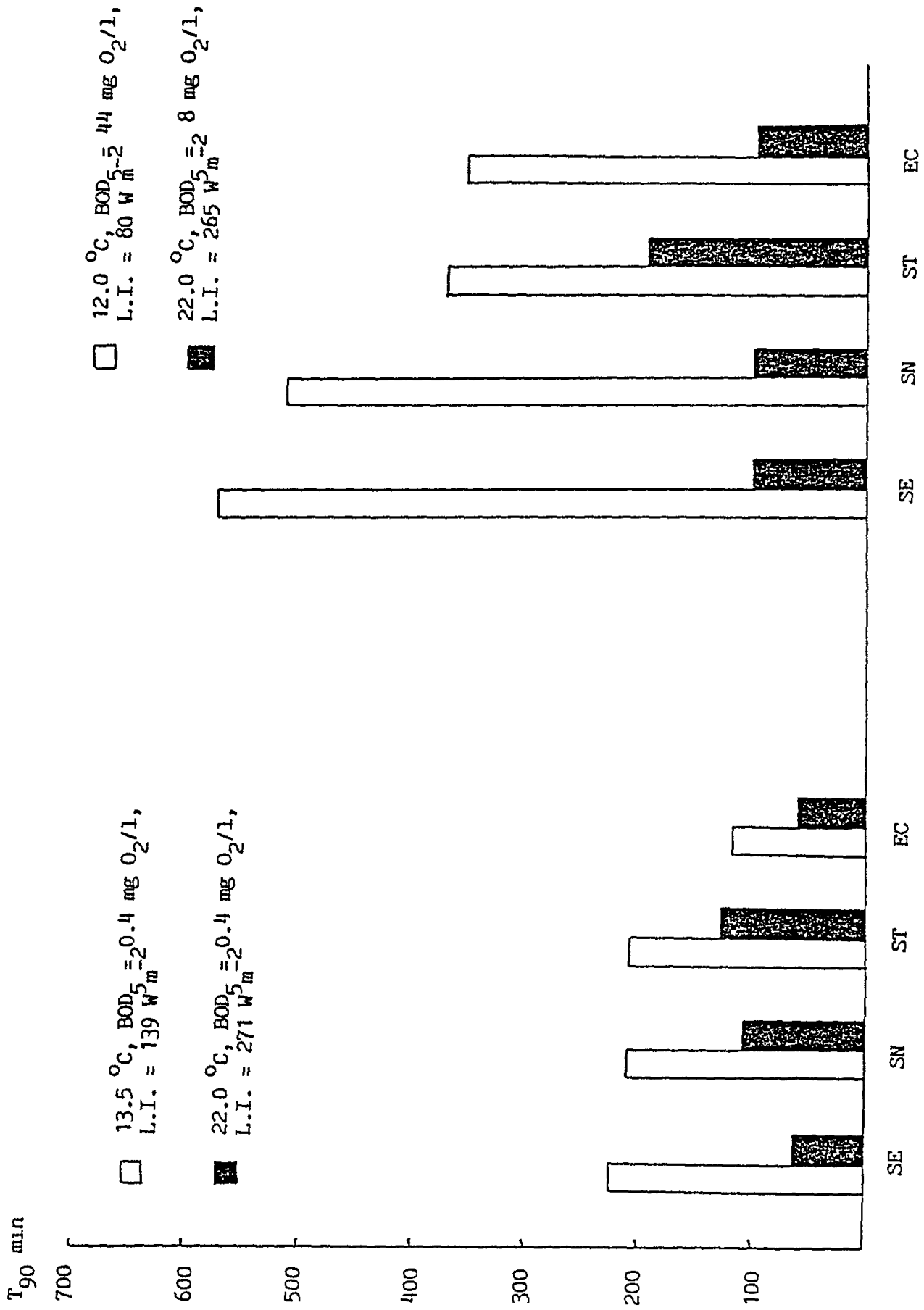


Figure 4: T₉₀ of *S. enteritidis* (SE), *S. newport* (SN), *S. typhimurium* (ST) and *E. coli* (EC) in field experiments in a function of temperature and light intensity (L.I.).

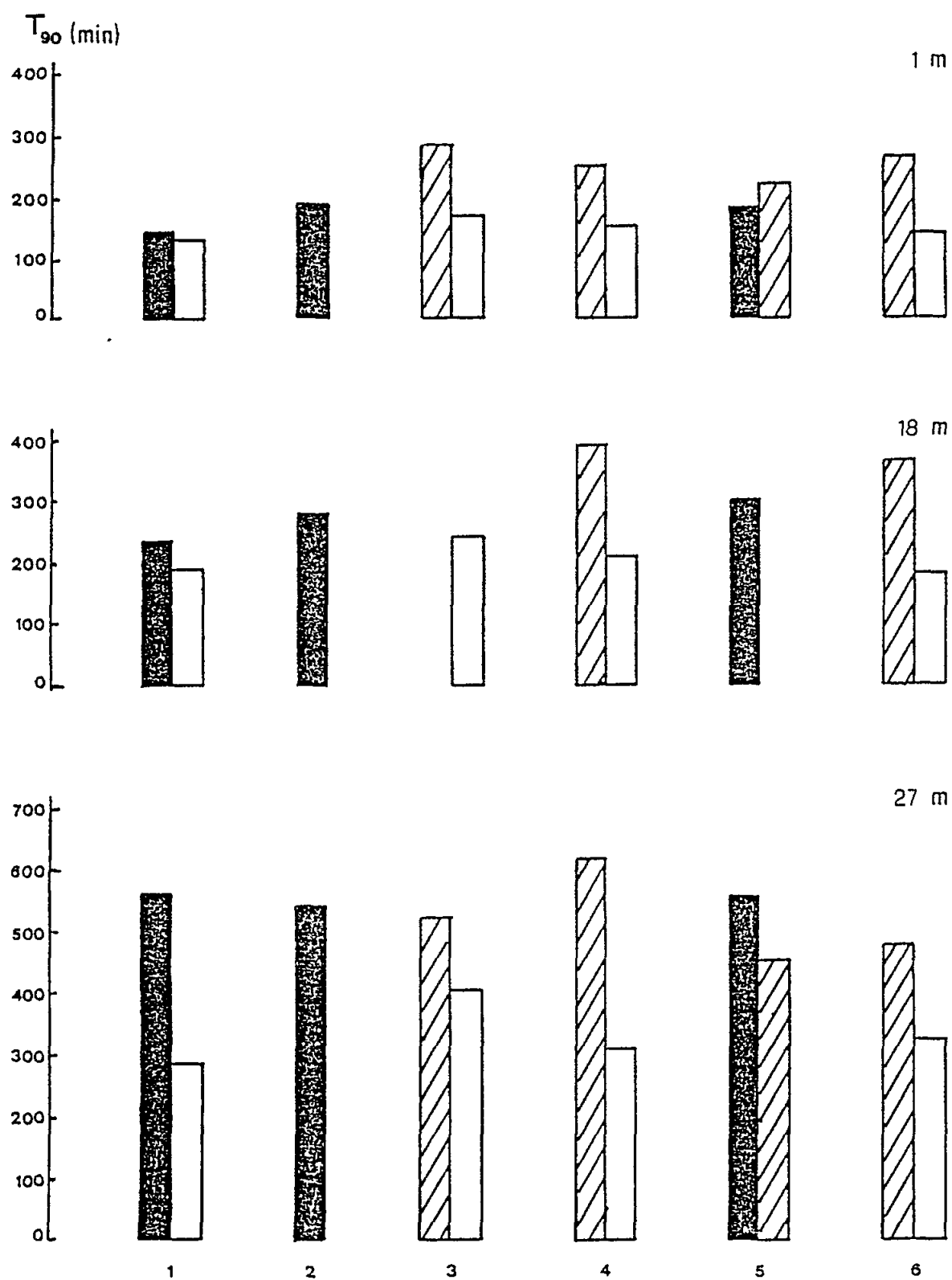


Figure 5: T_{90} of *Salmonella typhimurium* (▨), *Escherichia coli* (□) and faecal coliforms (▨) in field experiments

Table 9

Survival of *Escherichia coli* during *in situ* exposure to seawater at station No 2

Initial concentration n/1 ml	T ₉₀ minutes
Experimental temperature: 14.6-15.6 ° C	
1.58 * 10 ⁵	335
1.99 * 10 ⁶	345
1.58 * 10 ⁷	355
1.26 * 10 ⁸	350
Experimental temperature: 24.0-25.0 ° C	
1.99 * 10 ⁵	155
2.51 * 10 ⁶	120
1.99 * 10 ⁷	120
1.58 * 10 ⁸	160

Table 10

T₉₀ (min) of tested bacteria during *in situ* exposure to seawater

Station	No 1	No 2
Experimental temperature	11.9-12.2 ° C	13.2-13.6 ° C
<i>Salmonella enteritidis</i>	570	230
<i>Salmonella typhimurium</i>	370	210
<i>Salmonella newport</i>	515	210
<i>Escherichia coli</i>	356	121
Experimental temperature	21.4-22.0 ° C	21.6-22.4 ° C
<i>Salmonella enteritidis</i>	100	65
<i>Salmonella typhimurium</i>	190	130
<i>Salmonella newport</i>	100	110
<i>Escherichia coli</i>	95	60

Table 11

T₉₀ (min) of tested bacteria during laboratory exposure to seawater

Station	No 1	No 2
Experimental temperature	12 ° C	12 ° C
<i>Salmonella enteritidis</i>	375	345
<i>Salmonella typhimurium</i>	370	320
<i>Salmonella newport</i>	310	385
<i>Escherichia coli</i>	220	200
Experimental temperature	23 ° C	23 ° C
<i>Salmonella enteritidis</i>	355	310
<i>Salmonella typhimurium</i>	320	220
<i>Salmonella newport</i>	295	170
<i>Escherichia coli</i>	200	160

Table 12

T₉₀ (min) of tested bacteria during *in situ* exposure to seawater

Station	No 1	No 2
Experimental temperature	11.0-11.4 ° C	9.6-9.7 ° C
<i>Salmonella enteritidis</i>	250	225
<i>Salmonella typhimurium</i>	475	420
<i>Salmonella flexneri</i>	295	250
<i>Shigella sonnei</i>	280	265
<i>Escherichia coli</i>	220	215
Experimental temperature	22.8-24.8 ° C	23.3-24.0 ° C
<i>Salmonella enteritidis</i>	210	190
<i>Salmonella typhimurium</i>	295	255
<i>Salmonella flexneri</i>	295	180
<i>Shigella sonnei</i>	275	185
<i>Escherichia coli</i>	175	100

The influence of the initial concentration on the die-off rate of *E. coli* was not noted when 10^5 - 10^8 ml⁻¹ concentrations were used (Table 9). Gameson and Saxon (3) found the same for a lower initial concentration (10 - 10^4) but found increasing survival with a higher initial concentration of coliform bacteria.

Numerous laboratory studies have demonstrated that near-UV light, as well as visible light, can be lethal or growth-inhibitory to a great variety of bacteria (3, 5, 14-19). The results of our field experiments confirmed that a lower light intensity and sea temperature prolonged the survival of all *Salmonella* strains tested and of *E. coli* (Figure 4). These effects are greater with an increasing amount of organic matter (BOD₅).

The effect of sunlight on bacteria is dependent on the total received. Due to absorption of light penetrating the sea, the sunlight received after six hours of exposure was two orders of magnitude lower at 27 m depth compared to 1 m depth (from 173 to 6 W m⁻², Table 5). The lowering of light intensity by two orders of magnitude prolonged remarkably the survival rate of the bacteria (by an index of 1.8 to 3.9, Figure 5). The decrease of light intensity by one order of magnitude (from 150 to 15 W m⁻²) influenced the survival rate of the bacteria slightly (by an index of 1.3 to 1.7).

The discrepancy between prolongation of the survival rate for *S. typhimurium* and faecal coliforms downward from the surface to 27 m depth, although they have a similar die-off rate for the same depth location, indicated a combined influence of light and temperature on the metabolism of the two bacteria resulting from different effects. A similar prolongation of the survival rate for *E. coli* and faecal coliforms indicated the same tolerance to temperature changes, but a different tolerance to the light received.

During stratification of the sea (May-October) mixing and rising of released wastewater at the bottom level is blocked by the thermocline. For this reason, a different die-off rate below and above the thermocline has to be considered in determining the position of a sewage outfall.

4. CONCLUSIONS

The survival of all *Salmonella* and *Shigella* strains tested and of faecal coliforms, was higher in all experiments compared to *E. coli*.

The results confirmed that sea temperature may exert an important influence on the magnitude of decay rates of salmonellas, shigellas and *E. coli*.

In situ experiments revealed that a large amount of organic matter may overcome the bactericidal effects of sea temperature and light on the bacteria tested.

Although the die-off rate of *E. coli* did not differ significantly from *S. typhimurium* in some experiments, their different tolerance to light and temperature has to be taken into account particularly when *E. coli* is utilized as an indicator of *S. typhimurium* presence in seawater.

The discrepancy between die-off rates of *S. typhimurium* and faecal coliforms increased from 27 m depth to the surface. Even if *S. typhimurium* and faecal coliforms have similar die-off rates, various combinations of detrimental factors could exert different influence on the tested pathogenic bacteria and indicator bacteria. Therefore, although faecal coliforms should be used as indicators of pathogenic bacteria present in the sea, they should not constitute the only such indicator.

5. REFERENCES

- ANDERSON, I.C., M.W. RHODES and H.I. KATOR, 1983. Seasonal variation in survival of *Escherichia coli* exposed *in situ* in membrane diffusion chambers containing filtered and non-filtered estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45, 1977-1883.
- CARLUCCI, A.F. and D. PRAMER, 1960. An evaluation of factors affecting survival of *Escherichia coli* in sea water. II. Salinity, pH and nutrients. *Appl. Microbiol.*, 8, 247-250.
- D'AOUST, J.Y., W.G. MARTIN, J. GIROUX and H. SCHNEIDER, 1980. Protection from visible light damage to enzymes and transport in *E. coli*. *Photochem. Photobiol.*, 31, 471-474.
- FEDORAK, P.M. and D.W.S. WESTLAKE, 1978. Effect of sunlight on bacterial survival in transparent air samplers. *Can. J. Microbiol.*, 24, 618-619.
- GAMESON, A.D.H. and J.R. SAXON, 1967. Field studies on the effect of daylight on mortality of coliform bacteria. *Water Res.*, 1, 279-295.
- GAMESON, A.D.H. and D.J. GOULD, 1975. Effects of solar radiation on the mortality of some terrestrial bacteria in seawater, p 209-214. In: A.L.H. Gameson (Ed.), *Discharge of Sewage from Sea Outfalls*. Pergamon Press, New York.
- GRAHAM, J.J. and J.M.N. SIEBURTH, 1973. Survival of *Salmonella typhimurium* in artificial and coastal seawater. *Rev. Intern. Ocean. Me.*, 29, 5-29.
- HANES, N.G., G.A. ROHLIC and W.B. SARLES, 1965. Effects of temperature on survival of indicator bacteria in water. *J.N. Engl. Water Works Assoc.*, 80, 13-16.
- JAGGER, J. 1975. Inhibition by sunlight of the growth of *Escherichia coli* B/r. *Photochem. Photobiol.*, 22, 67-70.
- JAGGER, J. 1976. Effect of near-ultraviolet radiation on microorganisms. *Photochem. Photobiol.*, 23, 451-454.
- KAPUCINSKI, R. and R. MITCHEL, 1981. Solar radiation induced sublethal injury in *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environm. Microbiol.*, 41, 607-674.
- KOCH, A.L., R.J. DOYLE and H.E. KUBITSCHKE, 1976. Inactivation of membrane transport in *Escherichia coli* by near-ultraviolet light. *J. Bacteriol.*, 126, 140-146.
- LESSARD, E.J. and J. McN. SIEBURTH, 1983. Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and batch chambers in the marine environment. *Appl. Environm. Microbiol.*, 45, 950-959.
- McFETERS, G.A. and D.G. STUART, 1972. Survival of coliform bacteria in natural waters: Field and laboratory studies with membrane filter chambers. *Appl. Microbiol.*, 24, 805- 811.
- ORLOB, G.T. 1956. Viability of sewage bacteria in seawater. *Sewage Ind. Wastes*, 28, 1147-1167.
- SAVAGE, H.P. and N.B. HANES, 1971. Toxicity of seawater to coliform bacteria. *Journal WPCE*, 43, 854-861.
- SCARPINO, P.V. and D. PRAMER, 1962. Evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater. VI. Cysteine. *Appl. Microbiol.*, 10-436-440.
- SLANETZ, L.W. and C.H. BARTLEY, 1965. Survival of faecal streptococci in seawater. *Health Lab. Sci.*, 2, 142-148.
- VERSTRATE, W. and J.P. VOETS, 1976. Comparative study of *E. coli* survival in two aquatic ecosystems. *Water Res.*, 10, 129-136.

SOME ENVIRONMENTAL FACTORS AFFECTING SURVIVAL OF FAECAL PATHOGENS AND INDICATOR ORGANISMS IN SEAWATER

by

Fahmy EL-SHARKAWI, L. EL-ATTAR, A. ABDEL GAWAD & S. MOLAZEM

Department of Environmental Health & Microbiology
High Institute of Public Health
University of Alexandria, Egypt

1. INTRODUCTION

The common practice of disposing of untreated or partially treated sewage and other wastes into the sea is currently of growing concern, as it may result in the contamination of bathing beaches and shellfish areas by pathogenic organisms. These organisms may survive long enough in seawater to be transmitted to man either through direct contact with water (including ingestion) or indirectly through consumption of shellfish which have been exposed to these organisms.

The relatively low incidence of disease among swimmers in polluted areas indicates that a process of self-purification, as a result of a combination of physical, chemical and biological factors, takes place in the seawater.

It is a well known fact that once enteric bacteria are discharged from the intestines of human and other warm-blooded animals and reach the more hostile natural marine environment, they begin to die-off. The question thus arises as to the fate of the enormous number of enteric bacteria which enter coastal waters daily via sewage outfalls.

The aim to this study was to determine the effect of some environmental factors such as temperature, salinity and light on the rate of die-off of *Salmonella typhi*, *S. Wein*, *Shigella flexneri* and *E. coli* as examples of pathogens and faecal indicators.

2. MATERIALS AND METHODS

All media used in this study were commercially available (products of Difco and Oxoid laboratories) in dehydrated form. They were prepared, distributed and sterilized according to the manufacturers' instructions. The following media, reagents and tests were used:

Mac-Conkey agar (Difco - 0075 - 01)

The indicated weight was suspended in an appropriate volume of distilled water, heated to boiling, cooled to about 55° C and poured into sterile plates.

Normal Saline Solution

A solution of 0.85% NaCl was prepared, distributed in 500 ml amounts into screw capped bottles of 750 ml capacity, sterilized by autoclaving at 120° C for 15 minutes, and kept at room temperature until use.

Bacterial inoculum

Identified strains of *S. typhi*, *S. wein* and *Sh. flexneri* type 6 were procured from the Ministry of Health laboratories in Cairo. *E. coli* was procured from the High Institute of Public Health laboratories in Alexandria.

The test organisms were inoculated and streaked on Mac-Conkey agar plates and incubated at 37° C for 24 hours. The growths were scraped with a sterile loop and washed from the plates using 10 ml sterile physiological saline for each. The suspension was then transferred to sterile centrifuge tubes. The cells were then sedimented by centrifugation at 3500 r.p.m. for 10 minutes. The cellular pellets were washed with sterile physiological saline and centrifuged. The washing procedure was repeated twice. Finally the sediment was suspended in 10 ml normal saline and used as the test inoculum.

Seawater

Seawater samples from Camp Cezar beach Alexandria were collected in 5 liter sterilized containers. The salinity of the seawater samples was about 37,000 mg/l. The samples were divided into two parts, one part was sterilized by Seitz filtration and the other was used in the form of raw seawater (R.S.W.).

3. BACTERIOLOGICAL PROCEDURES

3.1 Effects of temperature and salinity

3.1.1 The following were prepared in 500 ml amounts in clean sterile screw-capped glass bottles of 750 ml capacity

- a - Raw seawater (R.S.W.)
- b - Filtered sterilized seawater (F.S.W.)
- c - Normal saline (N.S.)

The above were prepared in four identical sets. Each aliquot was inoculated with the tested strains, all at the same time. Six ten-fold serial dilutions of the suspensions were made in sterile distilled water after the bottles had been shaken. From each of the previous serial dilutions 0.02 ml were cultured on Mac-Conkey's agar plates for enumeration of the surviving organisms. The plates were incubated at 37° C for 24 hours and the colonies were counted. The recorded bacterial count per ml was considered the count at time Zero. The procedure was repeated every 2 hours for the first 8 hours then at 24 hours and at 24 hours thereafter for one week.

The whole procedures were repeated at temperatures of 25, 30, 35 and 40° C.

3.1.2 The above procedures were repeated using dechlorinated tap water and normal saline.

3.2 Effect of Light

Raw and sterilized filtered seawater as well as normal saline were prepared as before in 3 identical sets. Each set was inoculated under a fluorescent lamp (artificial light) at an intensity of about 12 foot candles at room temperature. A second set was incubated under sunlight (as natural light) with an average intensity of about 22 foot candles. The third set was prepared in dark bottles and incubated in a dark place at room temperature, which was about 22° C.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1 Effect of temperature

Table 1 and Figures 1 and 2 show a comparison between the die-off of the 4 tested organisms under the effect of four different temperatures (25,30,35,40° C) in three types of water and in normal saline.

Table I
A comparison between the die-off of the organisms tested under the effect of four different temperatures and three types of water and normal saline

Time	days	Type of water															
		F.S.W.				R.S.W.				D.I.W.				N.S.			
		Temperature °C															
		25	30	35	40	25	30	35	40	25	30	35	40				
Org.	7	7	7	2	6	6	6	2	6	6	6	4	6	6	6	3	40
<i>S. typhi</i>																	
<i>S. wein</i>	4	4	3	3	4	4	4	3	6	6	4	4	7	5	7	5	
<i>Sh. flexneri</i>	2	3	3	6*	4	3	4	2	6	7	5	2	3	4	4	3	
<i>E. coli</i>	7	5	3	1	7	4	2	3	7	7	6	5	7	4	5	5	

F.S.W. : Filtered sterilized seawater
R.S.W. : Raw seawater
D.T.W. : Dechlorinated tap water
N.S. : Normal saline

Org. : Organisms tested
* : Time in hours

Figure 1

A comparison between the effect of 3 types of waters and normal saline on the die-off rate of the four tested organisms at four different temperatures

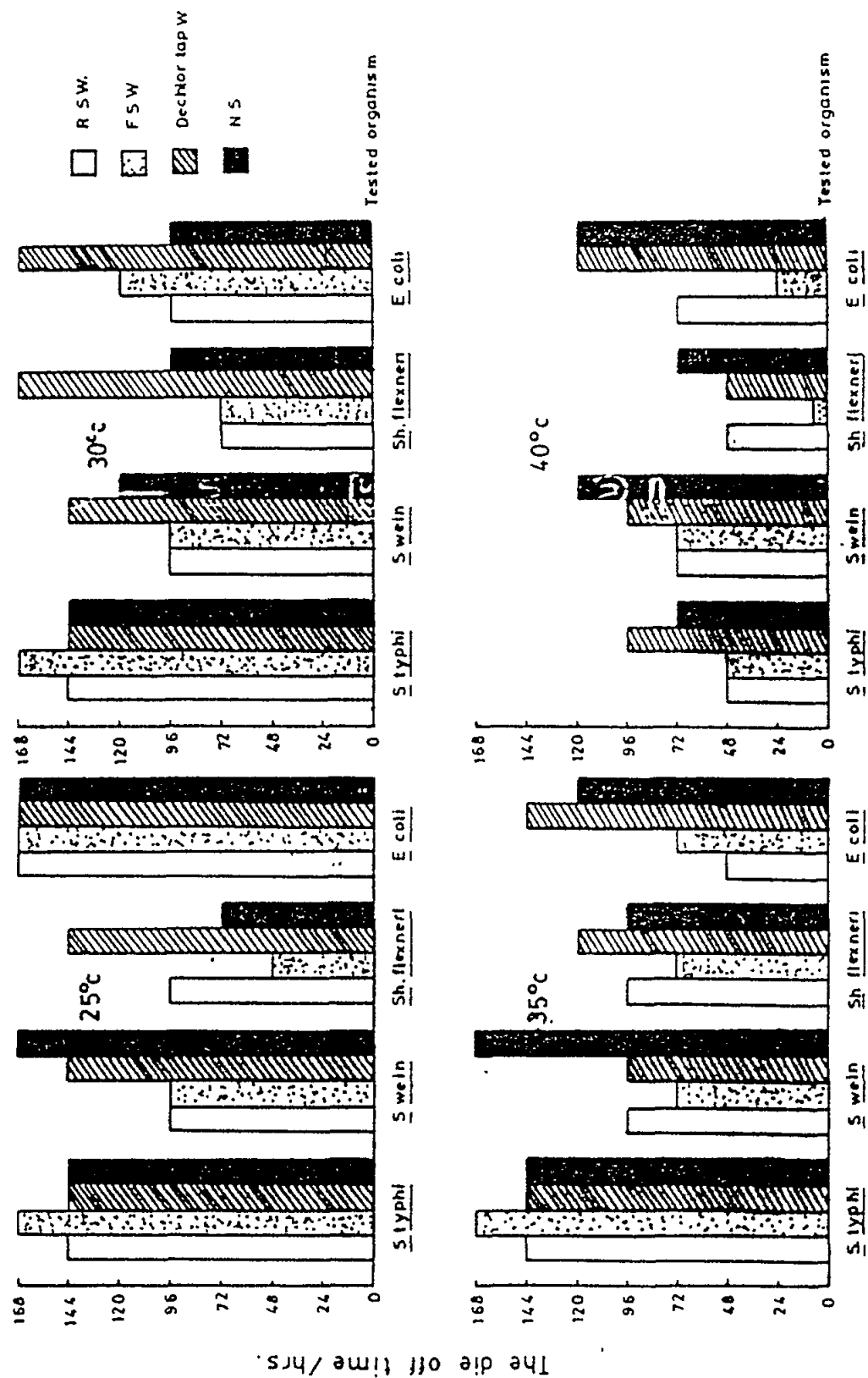
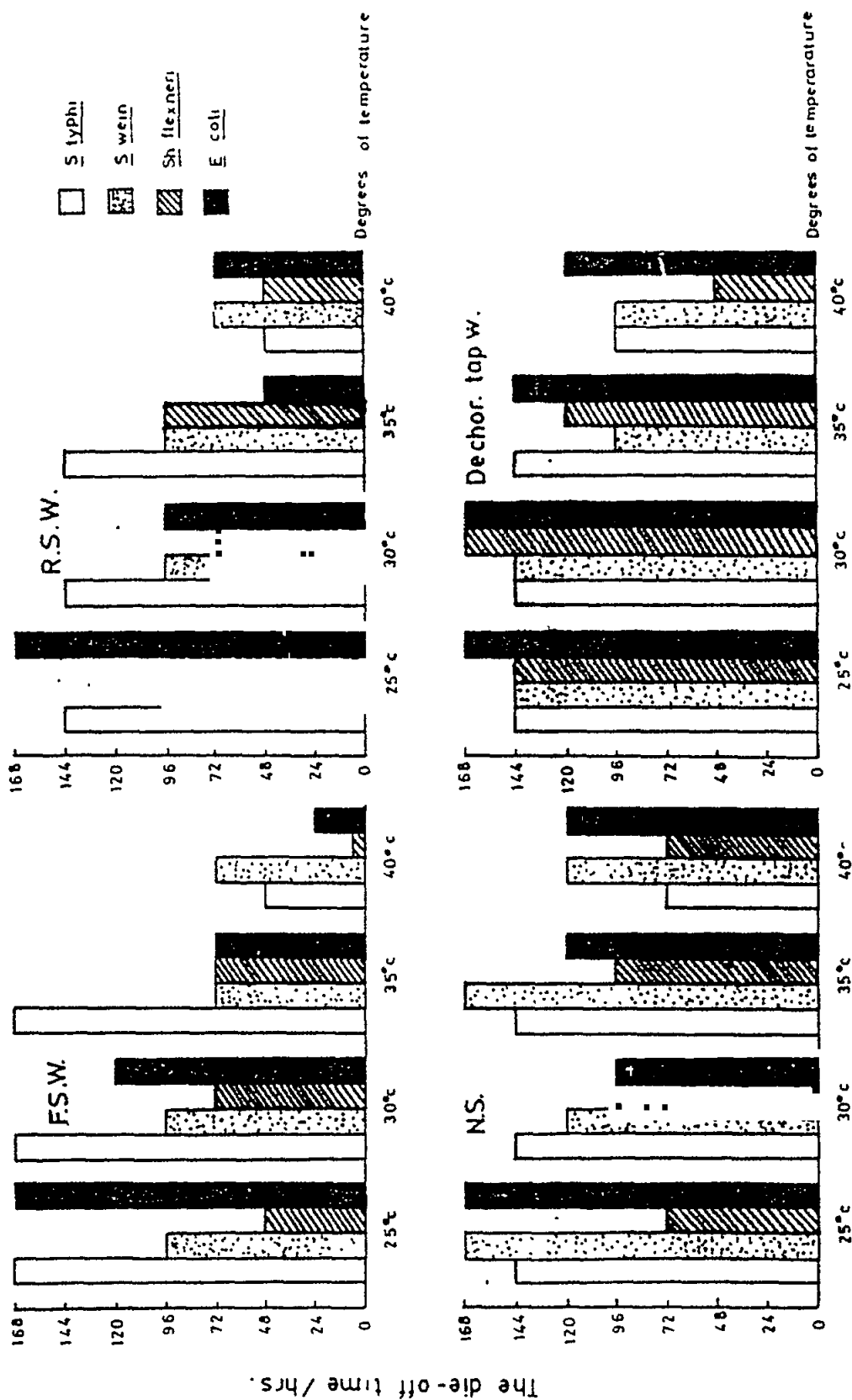


Figure 2

A comparison between the die-off of the four tested organisms under the effect of four different temperatures and three types of waters and normal saline



Temperature has been one of the factors most frequently considered as affecting survival time of bacteria. Virtually all studies have concluded that the rate of die-off increases as the temperature increases. The results of the present study demonstrated a relationship between temperature and survival of the tested organisms. This was mostly apparent with *S. typhi*, which survived for periods varying between 6 and 7 days in different types of water and in normal saline at temperatures up to 35° C, but died-off after 2-4 days at a temperature of 40° C. The survival of *S. wien* was longer at 40° C, being 3-4 days compared to 3-7 days at temperatures 25-35° C. *Sh. flexneri* survived only for 2-3 days at 40° C, while it survived for 4-7 days at 25-35° C. *E. coli* survived from 1-5 days at 40° C, as compared with 2-7 days at 25-35° C.

It is apparent from this study that there is no great difference in the survival time of the pathogenic organisms tested at temperatures between 25 and 35° C, but they die off more rapidly at 40° C.

4.2 Effect of Salinity

It has been stated that the most potentially toxic substances present in seawater on the basis of concentration are the inorganic salts. In this study, however, the salinity of seawater or any of its antagonistic factors did not affect the survival time of salmonellas. Many investigators studied the survival time of these organisms in seawater and reported different die-off times. This lack of uniformity could be attributed to the difference in the techniques used, strains tested and conditions of the experiments. Regarding *Sh. flexneri*, it was found that this species is affected somewhat by salinity. It survived longer in fresh water than in seawater. Marsharipov (1970) found that the survival of *Shigella* was influenced by the composition of the aqueous environment. *E. coli* appeared to survive longer in fresh water than in seawater at temperatures 30-35° C.

Numerous workers have justified the use of *E. coli* as an indicator of faecal pollution, because it survives longer in water than any of the microorganisms of public health significance. However, this study showed that *E. coli* and *S. typhi* have similar survival properties in water. The justification here lies on the fact that *E. coli* is easier to detect and is present in greater numbers than salmonellas in polluted water.

4.3 Effect of Light

Table 2 and Figures 3 and 4 show a comparison between the die-off of the four tested organisms under the effect of three different types of illumination in three types of water and in normal saline.

Porter reported that ultraviolet and visible lights have some lethal effects on bacteria and that certain bacterial cultures grow best in the dark. In this study, it was clear that these organisms survive more in the dark, ranging from 4-7 days depending on the different waters. They survive only for few hours or at most to one day when exposed to sun-light. Artificial light had less effect than natural light. It is therefore apparent that exposure to daylight is an important factor in the die-off rate of the different organisms. This factor, hence, becomes the crucial factor in the self-purification process when disposing of sewage in the aqueous environment.

Table 2

A comparison between the die-off rate of the four organisms tested under the effect of three different types of illuminations in three types of waters and in normal saline

Time	days	Type of water									
		F.S.W.		R.S.W.		D.T.W.		N.S.			
		Illumination									
Org.		D.L.	A.L.	D	D.L.	A.L.	D.	D.L.	A.L.	D.	
<i>S. typhi</i>		8*	1	5	1	2	6	1	3	6	
<i>S. wein</i>		4*	8*	6	1	1	6	1	5	5	
<i>Sh. flexneri</i>		8*	6*	5	1	3	4	1	4	6	
<i>E. coli</i>		8*	1	4	8*	4	5	1	5	7	

F.S.W. : Filter sterilized seawater

R.S.W. : Raw seawater

N.S. : Normal saline

D.T.W. : Dechlorinated tap water

D.L. : Day light

A.L. : Artificial light

D. : Dark

* : Time in hours

Figure 3

A comparison between the die-off rate of the four tested organisms under the effect of different illuminations in three types of waters and normal saline

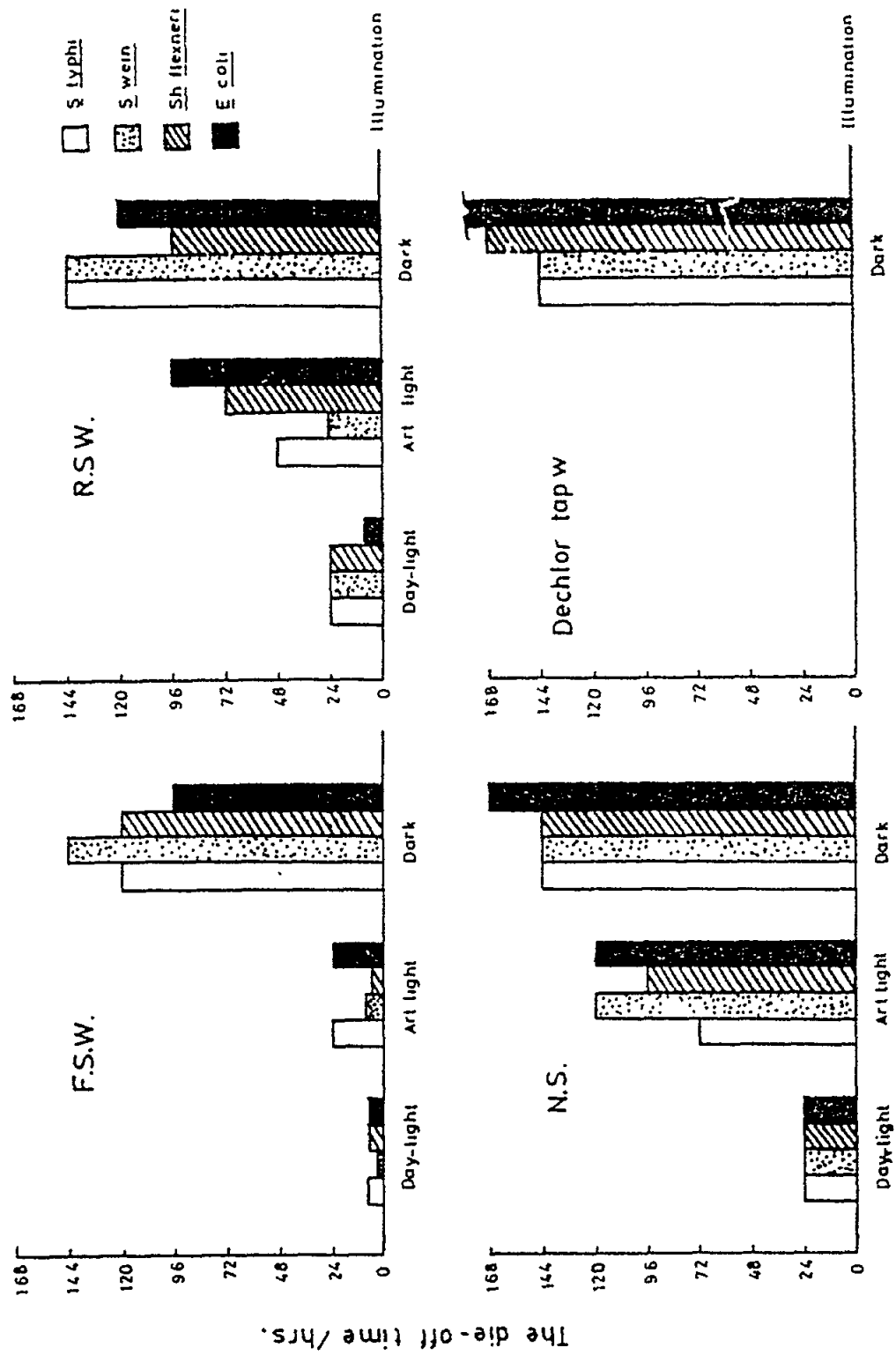
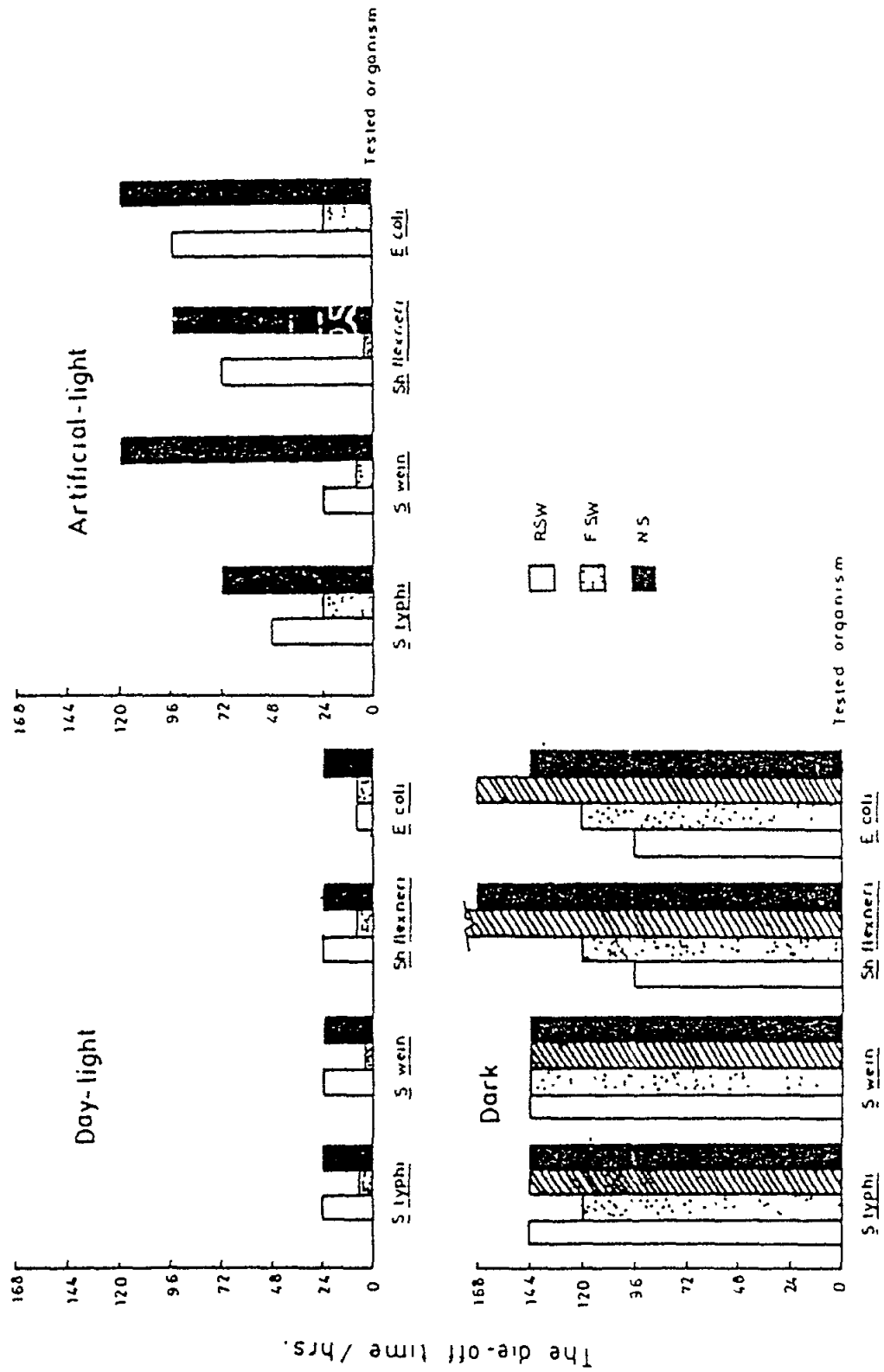


Figure 4

A comparison between the effect of the type of water on the die-off rate of the four tested organisms at different illuminations



4.4 Isolation of bacterial organisms from seawater at different beaches

Samples were collected from seawater at different beach localities along the Alexandria coast. Table 3 shows the percentage of samples with positive results. It is shown that *E. coli* was isolated from 100% of the samples of all beaches. *Salmonellas* were not detected in any of the samples from the beaches of Camp Cezar, Cleopatra, Stanley, Sidi Bishr, Montaza and Maamoura. It was isolated from 40% of the samples, at Anfoushi and Sporting while it was isolated from 50,35,50 and 60% of the samples at Eastern Harbour, Shatby, Gleem and Mandara respectively.

Table 3

Isolation of different organisms along Alexandria beaches
in 20 sampling days

Beaches	<i>E. coli</i>	%	<i>Salmonella</i>	%	<i>Shigella</i>	%
Anfoushi	20+	100	8+	40	6-	30
Eastern Harbour	20+	100	10+	50	6-	30
Shatby	20+	100	7+	35	4-	20
Camp Cezar	20+	100	0+	0	0-	0
Sporting	20+	100	8+	40	5-	25
Cleopatra	20+	100	0+	0	0-	0
Stanley	20+	100	0+	0	0-	0
Gleem	20+	100	10+	50	4-	20
Sidi Bishr	20+	100	0+	0	0-	0
Mandara	20+	100	12+	60	8-	40
Montaza	20+	100	0+	0	0-	0
Maamoura	20+	100	0+	0	0-	0

Shigella was not detected in any of the samples from Camp Cezar, Cleopatra, Stanley, Sidi Bishr, Montaza and Maamoura. It was isolated from 40% of the samples in Mandara, 30% of the samples in Anfoushi and Eastern Harbour, 25% in Sporting and 20% in Shatbi and Gleem.

4.5 Isolation of different organisms from the boil of Kait-Bay outfall and along the water path of the sewage plume

Table 4 shows the results of isolation of the three organisms tested. *E. coli*, *Salmonella* and *Sh. flexneri* from the boil of Kait-Bay outfall and along the sewage plume. We were able to isolate *E. coli* for a long distance (as far as 5 kilometers), but *Salmonella* and *Shigellas* were isolated only within the boil itself. No isolation of these pathogens was successful starting at points 100 meters away from the periphery of the boil.

Table 4

Isolation of different organisms from the boil of Kait-Bay outfall
and along the sewage plume path

Location	<i>E. coli</i>		<i>Salmonella</i>		<i>Shigella</i>	
	day time	night	day time	night	day time	night
Boil	+	+	+	+	+	+
100 ms	+	+	+	+	+	+
200 ms	+	+	-	+	-	+
400 ms	+	+	-	+	-	-
500 ms	+	+	-	-	-	-
600 ms	+	+	-	-	-	-
800 ms	+	+	-	-	-	-
1 kilometer	+	+	-	-	-	-

As it was forbidden by the Coast Guards and security personnel to cruise outside the eastern harbour, it was decided to collect the samples as early as possible in the morning to study the effect of darkness. It was possible to isolate *Salmonella* in the early morning samples from the boil and at 100, 200 and 400 meters from the periphery of the boil, but we failed to isolate it from 500 meters onward. *Shigella* was isolated only from the boil, 100 and 200 meters from the periphery, but not from 400 meters onward.

This shows that these organisms survive more in the darkness i.e. during the night hours, and less by day i.e. under the effect of sunlight.

5. SUMMARY AND CONCLUSIONS

This study was conducted to determine the effect of some environmental factors such as temperature, salinity and light on the rate of die-off *S. typhi*, *S. wein*, *Sh. flexneri* and *E. coli* as examples of faecal pathogens and indicators in water.

These organisms were tested in different kinds of water: seawater, filter sterilized seawater, tap water and normal saline. The organisms were counted every two hours for eight hours and then every day up to seven days.

It was found that there was no great difference in survival time of the organisms tested at temperatures of 25 to 35° C, but at 40° C they died off more rapidly.

The salinity of seawater did not affect the survival time of *Salmonella*, *Sh. flexneri*. *E. coli* appeared to survive longer in fresh water than in seawater at temperatures between 30 and 35° C.

Daylight, i.e. sunlight, had a lethal effect on all test organisms. Survival time being shorter when exposed to daylight than in the dark in different types of waters, being up to a maximum of 24 hours as compared to several days in the dark. Artificial light had less effect than natural daylight.

Salmonella and *shigella* were isolated only from beaches with sewage shore outfalls and we were unable to isolate them from other beaches without outfalls.

Salmonella and *shigella* were isolated from the sewage boil only and we could not isolate them at a distance more than 100 meters from the periphery of the boil during daylight hours. *Salmonella* was isolated within 400 meters of the periphery of the boil by night. *Shigella* was isolated within 200 meters of the periphery of the boil by night.

It can be concluded that exposure to sunlight is the most important factor in the process of self-purification of water polluted by sewage outfalls.

6. ACKNOWLEDGMENT

This work was partially supported by a grant from the WHO Regional Office for Europe within the framework of the Long-term Programme of Pollution Monitoring and Research in the Mediterranean Sea (MED POL Phase II).

7. REFERENCES

- CARLUCCI, A.F., and PRAMER, D. (1959). Factors affecting the survival of bacteria in seawater, *Appl. Microbiol.* 7: 388.
- CARLUCCI, A.F., and PRAMER, D (1960): An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater. I. Experimental procedures. *Appl. Microbiol.* 8: 243.
- FUKS, D and DEVESCOVI, M (1984): Survival of *Salmonella* strains and *E. coli* in the Marine Environment, VII ICSEM/IOC/UNEP Workshop on Marine Pollution of the Mediterranean
- MARSHARIPOV, N.P. (1970): Survival of dysentery pathogens in well water. *Gig. Sanit.* 35: 146.
- McFETERS, G.A., and STUART, D.G. (1972): Survival of coliform bacteria in natural waters: Field and Laboratory studies with membrane filter chambers. *Appl. Microbiol.* 24(5): 805.
- NABBUT, N.H. and KURAYIYYAH, F. (1972): Survival of *S. typhi* in seawater. *J Hyg.(Camb).* 70: 223.
- PORTER, J.R. (1965): The effect of physical agents on bacteria. Chapter 3: 149. In *Bacterial Chemistry and physiology 3rd ed.* John Wiley & Sons, Inc. and Chapman & Hall Limited, London, New York.

ADAPTATION DES ENTEROBACTERIES PATHOGENES A L'EAU DE MER (MODELE ESCHERICHIA COLI)

par

M.J. GAUTHIER, P.M. MUNRO et V.A. BREITTMAYER

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
I N S E R M Unité 303 "Mer et Santé"

1. INTRODUCTION - GENERALITES

Les bactéries entériques pathogènes véhiculées par les eaux usées des agglomérations urbaines sont en grande partie rejetées dans le milieu marin, où elles subissent une dispersion physique en qualité d'éléments particuliers, mais aussi une évolution biologique en tant que micro-organismes vivants. Ces deux processus, qui guident le devenir de tous les micro-organismes telluriques dans la mer, ont fait l'objet de très nombreux travaux, *"in situ"* et *"in vitro"*, que l'on a répertoriés à diverses reprises (voir leur analyse rétrospective en bibliographie, références 1 et 13).

1.1 La dispersion physique des bactéries en mer

Bien que vivantes, toutes les bactéries peuvent être considérées comme de simples particules organiques: en même temps que les eaux usées se diluent dans la masse marine, elles subissent donc une dispersion physique. Plusieurs études ont montré que les eaux usées se mélangent en fait assez mal à l'eau de mer et qu'elles peuvent rester individualisées jusqu'à de grandes distances du point de rejet (9). La dispersion des germes contaminants dépend de la forme sous laquelle ils se présentent. A l'état libre, c'est-à-dire non absorbés sur des matériaux particuliers, ils se déplacent dans cette masse d'eau selon les conditions hydrologiques locales. Certains s'incluent dans les particules lipoides: ils peuvent alors demeurer dans l'eau, dans un environnement protecteur qui les isole du milieu, ou migrer jusqu'à l'interface eau-air et être emportés dans l'atmosphère sous l'action des vagues et des vents (2). D'autres tombent plus ou moins rapidement sur le fond lorsqu'ils sont absorbés sur des particules lourdes; ils s'accumulent à la surface des sédiments, qui représentent ainsi de véritables réservoirs de contamination. Ils peuvent par la suite être remis en suspension sous l'action de forces naturelles (vagues, upwellings, barres d'estuaires, bioturbation) ou artificielle (dragages, navigation) et atteindre un hôte humain, soit directement, soit à travers les chaînes alimentaires. L'importance quantitative de cette sédimentation reste en fait mal connue. Elle varie avec la nature des effluents, leur teneur en matières minérales et organiques floculables et peut être modifiée par le traitement préalable en station d'épuration. L'incertitude à ce sujet porte en grande partie sur l'importance relative des formes libres ou fixées des bactéries à intérêt sanitaire dans les eaux usées, puis dans les eaux marines. Des mesures récentes effectuées par A. Romana (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) dans la zone de rejet des eaux usées de Toulon (France) suggèrent la prédominance des formes libres (environ 90% des coliformes fécaux) dans les effluents préalablement traités par un procédé d'épuration physico-chimique, alors qu'elles sont moins nombreuses dans le même effluent non traité (environ 50%).

De nombreuses recherches ont été consacrées à l'analyse de la dispersion des bactéries telluriques en mer. Elles ont conduit à l'élaboration de modèles mathématiques plus ou moins satisfaisants, encore à l'étude aujourd'hui.

1.2 Les facteurs d'épuration naturels du milieu marin

Par ailleurs, les particules-bactéries tirent leur importance sanitaire du fait qu'elles sont vivantes et pour les pathogènes, capables d'infecter l'homme. Se pose donc le problème de leur survie dans les divers compartiments du milieu marin: eau, sédiments et biomasse.

L'eau de mer est un milieu qui diffère très sensiblement des eaux douces et, plus encore, du milieu intestinal ou urinaire, par un ensemble de caractères spécifiques: haute salinité (30 à 37 ‰), basse température (5 à 25° C), légère alcalinité (pH 8) et faible teneur en matières organiques (quelques dizaines de mg/l). Sa microflore est en outre très particulière. Il est donc "*a priori*" hostile aux bactéries entériques. Le fait est que toutes les études effectuées "*in situ*" sur la diminution du nombre de ces germes dans les zones de rejets d'eaux résiduelles, comme toutes les expériences de laboratoire visant à analyser la survie de souches pures dans des échantillons d'eau de mer, ont démontré qu'elles disparaissent rapidement au contact de l'eau de mer, ou tout au moins ne peuvent plus être retrouvées par les méthodes bactériologiques traditionnelles.

Dans le cas des études sur le terrain, on a coutume de quantifier ce déclin par la mesure du T 90, ou temps nécessaire pour voir disparaître 90% de la population bactérienne des effluents rejetés. Ce temps, qui tient compte en principe de la dilution, de la sédimentation et de tous les facteurs antagonistes du milieu marin, est pendant la journée, dans les eaux méditerranéennes, d'environ 1 à 2 heures pour les coliformes ou les salmonelles, et de 3 à 6 heures pour les streptocoques fécaux, qui sont plus résistants aux conditions marines. Au cours de la nuit, il est beaucoup plus long (24 à 36 heures pour *E. coli*) et voisin de celui que l'on obtient dans les expériences de laboratoire réalisées à l'obscurité. Cette observation paraît conférer à l'irradiation lumineuse (UV et visible) un rôle épurateur fondamental; ce facteur est en effet considéré comme le plus efficace pour la réduction de la contamination bactérienne dans les eaux peu turbides pendant le jour (8). Il n'est, à l'évidence, pas suffisant pour expliquer le déclin des germes entériques dans toutes les niches du milieu marin protégées de la lumière et dans les eaux contenant de fortes quantités de matières en suspension; les T 90 y sont d'ailleurs beaucoup plus importants. D'autres facteurs ont donc été invoqués pour expliquer l'antagonisme apparent de l'eau de mer vis-à-vis de ces bactéries. Parmi les plus étudiés, citons la forte teneur en sels (3), la présence de métaux lourds (7), la carence en éléments nutritifs (20) la prédation (micro et macro-prédateurs, dont les coquillages) et la production de substances antibiotiques ou bactériolytiques par les algues supérieures, le phytoplancton, les bactéries et les champignons marins (13). Il faut bien préciser qu'aucun consensus n'a jamais été obtenu quant à l'importance relative de ces différents facteurs, bien que la question ait été maintes fois discutée. Nous concluons pragmatiquement le débat en disant que tous concourent à l'augmentation du degré d'agressivité du milieu marin vis-à-vis des bactéries allochtones, tel ou tel d'entre eux pouvant prévaloir selon les conditions locales. Quoi qu'il en soit, il paraissait bien établi vers les années 1970-1975, que les bactéries entériques pathogènes rejetées en mer y étaient détruites par la conjonction léthale de facteurs de nature et d'importance diverses, conférant au milieu marin ce que l'on nommait son "pouvoir auto-épurateur" (1).

1.3 Conception actuelle de la survie des bactéries entériques en mer

Depuis cette époque, la notion de "mortalité" de ces bactéries dans l'eau de mer a profondément évolué, sans que soit pour autant mise en doute l'action des facteurs épurateurs. Au cours des années 1970 à 1975, il est apparu que le dénombrement des indicateurs de contamination, et en particulier des coliformes, peut être influencé par le stress consécutif au passage dans un milieu hostile. Ainsi, les dénombrements obtenus en milieux liquides (NPP) peuvent être jusqu'à 10 fois supérieurs à ceux obtenus par la méthode de culture sur milieu gélosé, dans le cas d'échantillons d'eaux chlorées ou contenant diverses substances toxiques (17). Un concept de stress a été progressivement élaboré en microbiologie alimentaire, du sol et des eaux; on a montré que certains facteurs physico-chimiques (température, congélation, irradiation, choc osmotique, déshydratation, etc) provoquent chez les micro-organismes des lésions structurales et fonctionnelles qui les rendent incapables de se développer sur milieux sélectifs (11).

qui contiennent différents produits inhibiteurs capables d'empêcher la croissance des bactéries associées aux espèces recherchées. Ces germes perturbés peuvent cependant retrouver leur potentiel normal sur des milieux moins agressifs. Diverses procédures, dites de "revivification", ont été proposées pour améliorer les dénombrements des espèces indicatrices et en particulier des coliformes. Elles consistent généralement en un passage progressif, en une ou plusieurs étapes, aux conditions "dures" du milieu sélectif et/ou de la haute température, par exemple par culture transitoire sur un milieu plus doux, à température intermédiaire.

Cet état de stress est particulièrement sévère pour les bactéries entériques dans l'eau de mer carencée en nutritifs. Il est vraisemblablement aggravé par la présence d'altéragènes chimiques (détergents, hydrocarbures, pesticides, métaux) dans les eaux usées mêmes, avant leur rejet en mer. On retrouve donc là l'influence de certains facteurs décrits dans le cadre du pouvoir épurateur du milieu marin, alliée à la notion de modification somatique des bactéries, et non plus à celle de leur mortalité.

S'agissant du stress de germes responsables de maladies humaines parfois très graves, plusieurs questions étaient alors posées: quelle importance sanitaire pouvait-on accorder aux cellules stressées? Conservaient-elles leur pouvoir pathogène? D'autre part, le stress estimé sur des espèces prises comme indicateurs était-il représentatif de celui des pathogènes? "In fine", devait-on réviser les normes de salubrité en utilisant des techniques de reviviscence? Les données sur l'état physiologique des germes stressés qui permettent de répondre à ces interrogations n'apparaissent que depuis quelques années.

Une nouvelle étape dans la compréhension de la situation des bactéries allochtones en mer a été franchie lorsque l'on a pris conscience (vers 1975-1978) que leur cas différait, en un sens, assez peu de celui des bactéries autochtones placées dans les mêmes conditions de carence alimentaire ("*starvation-survival*" pour les auteurs anglo-saxons). On sait depuis longtemps que la présence de matières nutritives influence la survie des germes entériques dans l'eau de mer et qu'un faible ajout (20 à 50 mg/l) de substrats protéiques ou glucidiques suffit à prolonger leur viabilité (16). Or l'eau de mer naturelle est généralement pauvre en substances organiques métabolisables par les micro-organismes. Dans ce milieu, les bactéries autochtones elles-mêmes se trouvent fréquemment en état de carence alimentaire et s'y adaptent, passant ainsi par ce qui paraît être une étape normale de leur cycle vital. Cette conception, développée par Y. Morita (1982) (12) pour les bactéries marines, s'intègre dans le cadre plus général d'une théorie sur la dormance bactérienne, établie par J. Postgate (1976) (15), puis par L. Stevenson (1978) (18) pour expliquer l'inactivité de nombreuses bactéries dans les milieux hydriques naturels carencés. Ces auteurs parlent d'une véritable adaptation au "stress nutritionnel", qui se traduit par un ensemble de modifications structurales et métaboliques: diminution de la taille des cellules, ralentissement des échanges avec le milieu et du métabolisme énergétique, arrêt des synthèses, etc... Ce concept de dormance a reçu, depuis, de nombreuses confirmations expérimentales.

On peut donc admettre que les bactéries entériques se comportent dans l'eau de mer comme les bactéries autochtones, sous l'influence du même stress alimentaire. Le développement de techniques de numération directe des bactéries dans les échantillons naturels (eaux, sédiments) et leur application à l'écologie bactérienne en milieu marin a permis de confirmer ce point et fourni des données importantes sur le devenir des germes entériques dans ce milieu. Ces techniques sont généralement fondées sur le marquage des bactéries, d'une manière non spécifique, par des colorants (acridine orange) ou plus spécifiquement par des anticorps fluorescents: on peut alors les dénombrer au microscope à épifluorescence. On évalue ainsi le nombre total des bactéries dans un échantillon, sans toutefois différencier les cellules vivantes des cellules mortes. Diverses méthodes ont ensuite été mises au point pour dénombrer spécifiquement les bactéries vivantes (10, 14). Il devenait alors possible de tester expérimentalement le pouvoir bactéricide de l'eau de mer vis-à-vis de nombreuses espèces pathogènes.

En appliquant ces méthodes, le groupe de R. Colwell (Université de Maryland, U.S.A. a pu décrire le passage progressif de ces bactéries à un état viable mais non cultivable peut être irréversible "in vitro" (21). Dans un échantillon d'eau de mer abiotique (stérilisé par filtration) incubé à température ambiante, les bactéries entériques demeurent vivantes pendant de longues périodes mais perdent en quelques jours leur capacité à se multiplier dans un milieu bactériologique traditionnel, même non spécifique, après être passées par un stade intermédiaire où l'ajout de matière organique à l'eau permet encore leur reviviscence. Une très petite fraction de la population initiale demeure cependant capable de se développer sur ces milieux (quelques variations de détail, chez divers *E. coli* entérotoxiques, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Campylobacter jejuni* et *Vibrio cholerae*. Nous l'avons constatée pour d'autres entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*) (5). Décrit et analysé d'abord en microcosmes au laboratoire, ce phénomène a été confirmé "in situ", dans des échantillons d'eau de mer mis en contact avec le milieu naturel dans des chambres à diffusion. Il semble donc de portée générale et se superpose à l'ensemble des facteurs d'épuration décrits antérieurement. Il est en quelque sorte la résultante de l'activité stressante globale du milieu, et peut être considéré comme une mise en dormance des germes entériques dans un compartiment marin carencé en nutriments

Ce processus adaptatif pose de nouvelles questions, dont certaines ont reçu quelques éléments de réponse au cours de notre travail. Quels sont les processus physiologiques et moléculaires mis en jeu dans cette évolution? Correspond-elle à une simple modification "premortem", ou signifie-t-elle que ces bactéries sont capables d'une adaptation à un environnement aussi étranger pour accroître efficacement leur survie dans ces nouvelles conditions? On peut aussi se demander, sur un plan plus pratique, s'il est possible d'inverser le processus et de rendre les cellules à nouveau cultivables, donc dénombrables au laboratoire. Restent aussi posées les questions essentielles concernant leur valeur sanitaire, dépendant du maintien de leur virulence lors d'un éventuel retour "in vivo".

Le but du présent travail était, dans ce cadre précis, d'évaluer les modifications structurales et métaboliques subies par les bactéries entériques dans les conditions marines, et de rechercher les mécanismes qui sont responsables de l'évolution vers la dormance.

L'étude n'a porté que sur l'espèce *E. coli*, considérée comme modèle. Nous avons en outre admis, schématiquement, que les germes entériques allochtones pouvaient se trouver, en milieu marin, dans deux situations types différentes. en SURVIE dans les compartiments oligotrophes (eau) ou en CROISSANCE (ou tout au moins à l'état de vie active) dans les compartiments eutrophes (sédiments, interfaces). Les processus d'adaptation ont été analysés systématiquement dans ces deux cas de figure.

Les résultats obtenus au cours de ces deux années écoulées sont récapitulés ci-après. Leur présentation détaillée, ainsi que les discussions et conclusions partielles qui en ont découlé, figurent dans les articles scientifiques, publiés ou en cours de soumission, fournis en annexes.

2. RESULTATS - DISCUSSION

2.1. Adaptation et modification d'E. coli en survie dans l'eau de mer carencée en éléments nutritifs

2.1.1 Aspects quantitatifs

La survie d'*E. coli* dans une eau de mer stérilisée (par autoclavage ou filtration) dépend, nous l'avons vu plus haut, de nombreux facteurs extérieurs aux microcosmes. Dans le but de standardiser les tests de survie effectués "in vitro" tout au long de ce travail, nous avons d'abord cherché à évaluer l'importance de la densité de l'inoculum sur le taux de disparition (apparente)

des cellules cultivables dans l'eau de mer. Ce taux s'est avéré indépendant de cette densité, des plus faibles concentrations testées (10^2 bactéries/ml) jusqu'à environ 10^7 cellules/ml. Pour des densités très élevées $\geq 10^8$ cellules/ml, la décroissance du nombre des cellules viables cultivables était progressivement ralentie. Tous les tests effectués par la suite ont, pour cette raison, été réalisés avec des concentrations initiales de 10^5 à 10^6 cellules/ml.

L'une des données les plus originales obtenues dans ce travail a été la mise en évidence de l'influence déterminante des conditions dans lesquelles les cellules d'*E. coli* sont cultivées avant leur mise en contact avec l'eau de mer, sur leur survie future dans ce milieu. Les résultats obtenus sur ce point peuvent être résumés comme suit:

2.1.1.1 Influence des conditions de culture préalable des cellules

2.1.1.1.1 Phase de croissance

Après inoculation en bouillon nutritif et incubation à 37° C, les cellules récoltées au début de la phase exponentielle (jusqu'à $DO = 0.05$ à 650 nm, pour 1 cm de parcours optique) étaient beaucoup plus sensibles à l'eau de mer que celles qui étaient récoltées plus tard. Pour les premières, le nombre d'unités formant colonies (UFC) accusait une diminution de 5 à 6 puissances de dix après 4 jours de contact avec l'eau de mer, alors que pour les autres, il ne diminuait que de 2 puissances de dix environ.

2.1.1.1.2 Composition du milieu

Divers milieux ont été testés dans ce sens: organiques complexes (Tryptic Soy Agar, Nutrient Broth, Mueller-Hinton, CFA, bouillon coeur cerveau), minéraux synthétiques (source de carbone: glucose; source d'azote: chlorure d'ammonium) ou naturels (urines, boues d'épuration).

Les cellules les plus résistantes à l'eau de mer provenaient de milieux riches en acides aminés et dérivés. Par contre, les cellules cultivées dans l'urine étaient beaucoup plus sensibles aux conditions marines (ANNEXE 1).

2.1.1.1.3 pH

Les cellules préalablement cultivées en bouillon nutritif à pH 6 ou 8 étaient significativement plus sensibles à l'eau de mer que celles qui étaient cultivées à pH voisin de la neutralité (ANNEXE 1).

2.1.1.1.4 Teneur en oxygène

Ce facteur compte parmi les plus influents sur le potentiel de survie d'*E. coli* dans l'eau de mer. Les cellules précultivées en anaérobiose étaient beaucoup plus fragiles que celles qui étaient incubées à l'air (ANNEXE 1).

2.1.1.1.5 Température

Ce facteur est aussi très important pour la survie: les cellules incubées à haute température ($> 40^\circ \text{C}$) ont évolué beaucoup plus rapidement vers l'état non cultivable (ANNEXE 1).

2.1.1.1.6 Teneur en sels

Après culture dans un milieu naturel (eau usée, sédiment) ou artificiel (milieu bactériologique) préparé à l'eau de mer, *E. coli* évolue beaucoup plus lentement vers l'état non cultivable. C'est là le point le plus important soulevé au cours de nos recherches (ANNEXE 2). Nous avons retrouvé cette même propriété chez d'autres bactéries entériques (*Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*), alors que d'autres germes comme

Staphylococcus aureus, *Streptococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*, par exemple, ne présentent pas cette adaptation induite par les sels (ANNEXE 3).

Le sodium n'est pas le seul ion responsable de cet effet protecteur, car il ne le provoque qu'à des concentrations ≥ 500 mM (30 NaCl g/l), nettement supérieures à celles qu'il présente dans l'eau de mer (ANNEXE 1). L'ion Li^+ substitué à Na^+ , n'assure aucune protection à des concentrations analogues (300 à 500 mM).

2.1.1.1 7 Teneur en solutée osmoprotecteurs

Il est possible que l'effet réparateur (ou protecteur) des sels soit une conséquence, directe ou indirecte, de processus d'osmorégulation développés par *E. coli* dans le milieu salé où il a été cultivé avant sa mise en eau de mer. Cette hypothèse, qui implique des phénomènes complexes encore très mal connus, est soutenue par une autre observation faite au cours de ce travail: la glycine bêtaïne, ajoutée au milieu de préculture, provoque la même protection en l'absence d'eau de mer ou de NaCl. Ce dérivé méthylé de la glycine est l'un des principaux composés organiques qui permettent la régulation de l'équilibre ionique chez les entérobactéries, par son accumulation à partir du milieu externe (transport transmembranaire) ou par la synthèse intracellulaire à partir de la choline (induite par le NaCl) (19). D'autres solutés, également impliqués dans l'osmorégulation des bactéries entériques (tréhalose, proline, glutamate), n'ont montré aucun effet protecteur sur la souche d'*E. coli* utilisée dans nos expériences.

Un autre processus permet le maintien de l'équilibre osmotique chez *E. coli*: il s'agit de l'accumulation intracellulaire de potassium (4). Divers tests ont montré que, dans une certaine mesure, la présence de K^+ dans le milieu de préculture confère aux cellules une capacité de survie accrue dans l'eau de mer, mais à un moindre degré par rapport à l'effet de la bêtaïne.

On doit donc maintenant considérer que, plus que les facteurs du milieu marin lui-même, les conditions dans lesquelles les bactéries entériques ont été cultivées (ou produites naturellement) avant leur rejet en mer influencent décisivement leur devenir dans ce milieu. Ce fait a une double signification. Il indique, à l'évidence, que les tests de survie effectués au laboratoire à l'aide de microcosmes d'eau de mer et de souches bactériennes pures nécessitent une grande rigueur dans la standardisation et que les résultats qu'ils fournissent doivent être interprétés avec beaucoup de prudence. D'un point de vue sanitaire, il suggère aussi que les entérobactéries issues de l'homme et des animaux, donc produites dans un milieu à pH alcalin ou acide, à température élevée et en anaérobiose, pourraient être plus fragiles que les souches pures produites et utilisées "in vitro", et qu'elles évoluent probablement plus vite vers l'état non cultivable. Par contre, dans tous les cas où ces bactéries peuvent se développer en présence de sels et de matières organiques, il est probable qu'elles acquièrent une résistance élevée au milieu marin et demeurent cultivables beaucoup plus longtemps (plus de 4 mois, pour nos tests les plus longs) On pourrait alors parler d'une véritable adaptation des entérobactéries pathogènes à l'environnement marin.

En ce qui concerne plus directement la suite de nos travaux, nous avons, dans toute la mesure du possible, essayé d'analyser parallèlement le devenir des cellules précultivées en milieu doux et en milieu salé.

2.1.1.2 Influence de la teneur en sels du milieu de dénombrement des cellules cultivables

L'ajout de chlorure de sodium au milieu utilisé pour le dénombrement des cellules restées cultivables dans les microcosmes d'eau de mer permet de récupérer une certaine fraction de la population devenue non cultivable sur milieu doux. Le facteur de récupération était cependant très variable selon le temps de contact des cellules avec l'eau de mer. Nous avons constaté qu'il passe par un optimum lors de la phase de décroissance logarithmique des cellules (soit après une période de contact avec l'eau de mer allant de 2 à 4-5 jours): on peut alors récupérer de 30 à 50

fois plus de bactéries sur milieu salé (15 à 20 g NaCl/l) que sur milieu doux. Ce gain s'annule ensuite très rapidement.

2.1.2 Aspects qualitatifs

Au cours de leur survie en eau de mer, les cellules d'*E. coli* subissent une évolution morphologique et physiologique qui démontre l'existence de modifications structurales et métaboliques complexes, touchant parfois leur pathogénicité ou empêchant leur identification sur les milieux de dénombrement usuels.

2.1.2.1 Evolution structurale des cellules

Une étude détaillée en microscopie électronique a montré que les cellules d'*E. coli* placées dans une eau de mer carencée en substances nutritives:

- diminuent de taille, le volume cellulaire diminuant de 2 à 5 fois;
- modifient leurs enveloppes. la membrane externe devient plus diffuse, avec une densification de l'espace périplasmique. Les cellules prennent une forme irrégulière, consécutive à une déformation de la paroi. Elles perdent par ailleurs très rapidement (moins de 24 h) leurs organites externes (pilis et flagelles) (ANNEXE 4). La perte des pilis laisse supposer celle des facteurs de colonisation (pilis de type 1 ou facteurs CFA), donc des potentialités de colonisation de l'intestin humain. Grimes et Colwell (1984) (6) ont cependant montré que ces cellules peuvent, lorsqu'elles sont replacées dans l'intestin, provoquer à nouveau l'apparition d'un syndrome diarrhéique. Il semblerait donc que cette perte de pilis ne soit que temporaire. D'ailleurs, nous avons montré que les plasmides codant pour la synthèse des CFA n'étaient pas perdus au cours de l'évolution décrite ci-dessus;
- perdent une importante quantité de protéines (50% en 4 à 6 jours). L'analyse qualitative, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, des protéines à différents moments de la survie, a montré que les cellules perdent effectivement certains de leurs constituants protéiques, mais que de nouvelles protéines sont synthétisées dans la membrane cytoplasmique. Ces protéines néoformées sont vraisemblablement analogues aux protéines de stress que l'on a décrit chez *E. coli* lors d'un choc thermique. **Il est très intéressant de noter que ces modifications sont très atténuées et beaucoup plus tardives dans le cas des cellules précultivées sur milieu salé;**
- perdent une partie de leurs glucides (environ 40% après 2 jours).

2.1.2.2 Evolution physiologique des cellules

Les modifications structurales décrites ci-dessus s'accompagnent d'une évolution des propriétés physiologiques et biochimiques. La respiration diminue rapidement, puis se stabilise à un niveau très faible après quelques jours de contact avec l'eau de mer.

Les activités enzymatiques sont également perturbées: certaines diminuent progressivement avec le temps de séjour dans l'eau de mer (comme la β -galactosidase), alors que d'autres augmentent: c'est le cas pour la phosphatase alcaline, diverses estérases et lipases et les protéases. Ceci montre l'importance des remaniements cellulaires au cours de l'adaptation à la survie en milieu salin carencé (ANNEXE 5). Le passage à l'état non cultivable chez *E. coli* se fait au prix d'une profonde évolution des structures cellulaires, ces changements étant, au-delà d'un seuil critique, responsables de l'incapacité des cellules stressées à se réadapter à la culture dans les milieux bactériologiques. On ne sait cependant pas encore à quel(s) niveau(x) se situent les modifications les plus significatives de ce point de vue. On ignore également si l'état non cultivable est irréversible: pour l'instant, aucun moyen n'a été trouvé pour ressusciter ces cellules

après un temps de contact avec l'eau de mer de plus de 6 à 8 jours. Par contre, le fait que l'on peut empêcher cette évolution en précultivant ces bactéries en milieu salé permet d'envisager une approche expérimentale de ce processus évolutif. Nos travaux actuels visent à déterminer quels sont les mécanismes, induits par la haute concentration ionique du milieu, qui permettent cette protection à long terme. Leur point de départ semble, en tout état de cause, lié aux processus d'osmorégulation.

2.2 Adaptation et modification d'*E. coli* en milieu sédimentaire

Des travaux antérieurs, publiés au cours des dix dernières années, ont clairement établi que les bactéries entériques persistent beaucoup plus longtemps dans les sédiments marins que dans l'eau (ANNEXES 2 et 5). Un simple ajout de sédiments à une eau de mer suffit pour y prolonger considérablement la durée de survie de ces germes.

Nous avons donc analysé, à la fois qualitativement et quantitativement, l'évolution d'*E. coli* dans le milieu sédimentaire marin.

2.2.1 Evolution quantitative

Les sédiments marins contiennent généralement de nombreux éléments biologiques défavorables à la survie des bactéries allochtones d'origine entérique: microflore antibioproductrice ou bactériolytique, et micro ou macroprédateurs, pour l'essentiel. Ces facteurs antagonistes sont variables selon le lieu et la saison, en quantité comme en qualité. Ils n'ont pas été pris en compte dans nos études. Par contre, les dépôts marins contiennent toujours d'importantes quantités de matières organiques qui sont favorables à la croissance de ces mêmes bactéries. Par l'emploi d'enceintes à dialyse, nous avons pu montrer qu'*E. coli* peut se multiplier dans ces dépôts, à des températures de 20° à 25° C, jusqu'à atteindre des densités élevées (ANNEXE 6).

2.2.2 Evolution qualitative

Comme nous l'avons signalé plus haut, les cellules d'*E. coli* qui se sont développées en milieu sédimentaire salé acquièrent une plus grande résistance à l'eau de mer et peuvent persister longtemps à la fois dans les sédiments et dans l'eau qui les recouvre s'ils y sont remis en suspension

Nous avons en outre observé qu'au cours de la croissance dans ce milieu, des modifications structurales et métaboliques apparaissent mais qu'elles n'affectent pas les potentialités de culture sur les milieux bactériologiques. Ces altérations provoquent une modification de la résistance des cellules aux antibiotiques, aux métaux lourds et aux bactériophages, que l'on peut interpréter comme une modification de la structure des enveloppes (membrane externe surtout) (ANNEXE 5).

Par ailleurs, les *E. coli* entéroadhésifs (ou hémagglutinants) cultivés dans des sédiments marins perdent, comme dans l'eau de mer, leurs pilis et leurs flagelles. Nous avons cependant montré que ces structures sont à nouveau synthétisées quand la bactérie est replacée dans des conditions optimales de milieu (ANNEXE 6).

3. CONCLUSION

Il paraît donc maintenant de plus en plus probable qu'*E. coli*, et vraisemblablement les autres entérobactéries, sont capables de s'adapter dans tous les compartiments du milieu marin. Cette adaptation est cependant très différente selon la richesse du milieu en substances nutritives et sa teneur en éléments utilisables pour l'osmoprotection. Dans les eaux oligotrophes, ces bactéries évoluent rapidement vers un état non cultivable, décrit depuis une dizaine d'années par les auteurs américains (groupe de R. Colwell, Université du Maryland, U.S.A.). Cet état semble

pour l'instant irréversible, bien que certains tests laissent à penser que les cellules qui y sont parvenues pourraient exprimer à nouveau leur virulence lors d'un retour au milieu intestinal. Dans les compartiments marins riches en éléments nutritifs et en solutés osmoprotecteurs (bétaines), les entérobactéries sont sans doute capables d'acquérir une plus grande résistance et de se maintenir à l'état actif, cultivable et potentiellement pathogène, pendant des périodes plus longues, de l'ordre de plusieurs mois au moins, si elles ne sont pas détruites par les éléments biologiques antagonistes naturels du milieu. Mais même dans cet état actif, leur mise en évidence au laboratoire peut être difficile car certaines modifications phénotypiques (β -galactosidase par exemple) peuvent altérer l'aspect de leurs colonies jusqu'à rendre celles-ci indistinguables sur les milieux sélectifs utilisés traditionnellement pour les dénombrer.

4. LES PERSPECTIVES D'AVENIR

Nos connaissances sur les mécanismes cellulaires qui sous-tendent ou guident l'évolution des bactéries entériques dans les différents compartiments du milieu marin sont encore très sommaires. Pourtant, un certain optimisme anime les microbiologistes qui s'intéressent à ce problème car la remise en question des anciens concepts d'épuration bactérienne et de mortalité de ces germes allochtones en mer, finalement assez dogmatiques, a ouvert de nombreuses voies de recherche qui sont en cours d'investigation.

La mise en dormance de ces bactéries dans les eaux pauvres en éléments nutritifs est le processus clé dont la reconnaissance a renouvelé la notion de risque attachée à leur présence dans ces milieux. On connaît cependant mal cet état latent des bactéries et l'on ne sait toujours pas s'il correspond à une forme de résistance réversible, comme on en décrit dans divers groupes bactériens, ou bien à une forme adaptée irrécupérable. Il paraît donc nécessaire de poursuivre les travaux dans ce sens, à un niveau plus fondamental, pour mieux connaître l'étendue des modifications cellulaires qui sont responsables de la perte des capacités de culture sur les milieux organiques, et leur éventuelle réversibilité. A notre sens, il est peut-être plus important encore, autant du point de vue fondamental qu'appliqué, d'analyser le devenir de ces bactéries dans les biotopes riches en substances nutritives, comme les sédiments. D'abord parce qu'elles y conservent leur activité et (probablement) leur virulence potentielle, ensuite parce que l'adaptation à ces milieux pourrait bien accroître encore leur résistance aux conditions marines. Ceci justifierait tout à fait que l'on accorde plus d'intérêt à la contamination de ces milieux par les rejets urbains.

A plusieurs reprises, nous avons insisté sur le fait que c'est peut-être par la connaissance détaillée des modifications structurales et métaboliques qui permettent l'adaptation à et par la salinité en milieu nutritif, que l'on pourra mieux comprendre, en retour, les phases déterminantes de l'évolution vers l'état de dormance en milieu carencé. Pour cela, il faudra vraisemblablement développer des recherches dans des domaines aussi divers que la biochimie, la physiologie, l'analyse structurale, mais aussi la biophysique et la génétique. Alors, et seulement alors, il sera possible de répondre à l'interrogation des hygiénistes sur la nécessité de tenir compte des formes stressées, puis dormantes des bactéries entériques pathogènes pour l'évaluation de l'état de contamination des eaux marines. Il nous paraît encore trop tôt pour le faire, mais nous avons de bonnes raisons de penser que ce devrait être possible dans un avenir assez proche.

5. BIBLIOGRAPHIE COMPLEMENTAIRE

1. AUBERT, M. *et al.*, *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, 61, 37, 1981.
2. BRACEWELL, L.W. *et al.*, *J. Wat. Poll. Control. Fed.*, 52, 2230, 1980.
3. CARLUCCI, A.F. *et* PRAMER, D. *Appl. Microbiol.*, 8, 247, 1960.
4. EPSTEIN, W. *FEMS Microbiol. Rev.*, 39, 73, 1986.

5. GRIMES, D.J. *et al.*, *Microb. Sci.* 3, 324, 1986.
6. GRIMES, D.J. & COLWELL, R.R., *FEMS Microbiol. Lett.*, 34, 161, 1986.
7. JONES, G.E. *J. Bacteriol.*, 87, 483, 1964.
8. KAPPUSCINSKI, R.B. et MITCHELL, R. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 670, 1981.
9. KETCHUM, B.H. *et al.*, *Ocean dumping of industrial wastes*. N.Y. 1981.
10. KOGURE, K. *et al.*, *Can. J. Microbiol.*, 25, 415, 1979.
11. MAXEY, R.B., *J. Milk Technol.*, 39, 445, 1970.
12. MORITA, R.Y. *Advances in Microbiol Ecology*, p. 171, 1982.
13. PAOLETTI, A. C.R. *Symp. Pollutions marines par les microorganismes et les produits pétroliers*, CIESMM, Monaco, p. 133, 1964.
14. PELLE, E.R. et COLWELL, R.R., *Can. J. Microbiol.*, 27, 1071, 1981.
15. POSTGATE, J.R. *Symp. of the Society for General Microbiology*, 26, 1, 1976.
16. SIEBURTH, J.McN. C.R. *Symp. Pollutions marines par les microorganismes et les produits pétroliers*, CIESMM, Monaco, p. 217, 1964.
17. STEVENS, P.A. *et al.*, *Proc. 8th Nat. Shellfish Sanit. Workshop*, p. 132, 1974.
18. STEVENSON, L.H. *Microb. Ecol.*, 4, 127, 1978.
19. STROM, A.R. *et al.*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 39, 79, 1986.
20. VACCARO, R.F. *et al.*, *Am. J. Pub. Health*, 33, 1257, 1950.
21. XU, H.S. *et al.*, *Microb. Ecol.* 8, 313, 1982.

EVOLUTION PHENOTYPIQUE ET GENETIQUE DES ENTEROBACTERIES PATHOGENES DANS LE MILIEU MARIN (SEDIMENTS, BIOMASSE)

par

Michel J. GAUTHIER

Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
Unité 303 "Mer et Santé"

1. INTRODUCTION

Le milieu marin reçoit des quantités très élevées de microorganismes d'origine tellurique, essentiellement par l'intermédiaire d'eaux continentales polluées (eaux fluviales, eaux de ruissellement, eaux usées domestiques et urbaines). Cette microflore, outre des virus, des champignons inférieurs, des levures, des protozoaires et des oeufs de métazoaires, contient de nombreuses espèces bactériennes d'origine entérique pathogènes pour l'homme. Les principales sont les salmonelles (*Salmonella typhi*, *S. paratyphi* A et B), le vibron du choléra (*Vibrio cholerae*), et quelques autres espèces ou groupes dont le pouvoir pathogène est moins préoccupant mais qui conservent une indéniable valeur sanitaire (*Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli* entéropathogènes, *Campylobacter jejuni*). En dehors de cette fraction dangereuse de la population bactérienne, les eaux d'origine terrestre apportent aussi au milieu marin une très grande variété de bactéries, entériques ou non.

Au cours des dix dernières années, de nombreuses études ont montré que les bactéries entériques peuvent, dans une certaine mesure, s'adapter aux conditions marines grâce à une profonde modification de leur structure et de leur métabolisme. Il est donc possible d'envisager une évolution phénotypique de ces bactéries dès leur contact avec l'eau de mer, puis à plus long terme dans tous les compartiments de ce milieu dans lesquels elles sont dispersées (voir Annexe 1).

D'autre part, on sait maintenant que les bactéries des eaux telluriques et plus particulièrement celles que l'on trouve dans les eaux usées, hébergent des éléments d'ADN mobiles (transposons, plasmides) portant des gènes qui codent pour des caractères impliqués plus ou moins directement dans l'expression du pouvoir pathogène, et qui peuvent être spontanément échangés dans les conditions naturelles soit entre les germes contaminants eux-mêmes, soit avec certains éléments de la flore bactérienne autochtone. Un tel transfert génétique a été démontré dans les milieux d'eaux douces et pourrait s'effectuer dans les conditions marines (voir Annexe 2). Cette constatation revêt une grande importance épidémiologique car elle laisse supposer qu'une dissémination de ces gènes peut s'effectuer dans les milieux naturels aquatiques et en particulier en mer.

Si l'on rapproche les deux ensembles d'observations, une hypothèse s'impose, selon laquelle il est tout à fait possible que le pouvoir pathogène des bactéries entériques rejetées en mer soit modifié lors de leur séjour dans ce milieu, ceci aussi bien au niveau somatique que génétique. C'est cette hypothèse qui a été testée au cours de ce travail. Il faut en effet bien considérer que toutes les études mentionnées ci-dessus ont été effectuées au laboratoire et que, d'un point de vue formel, les phénomènes qui ont été décrits restent à démontrer dans le milieu marin naturel. Plusieurs voies d'investigation étaient envisageables; nous avons choisi l'abord strictement environnemental, sans aucun recours à des tests de laboratoire. Les buts et méthodes retenus sont développés ci-après.

1.1 Buts et méthode du travail

Il existe plusieurs manières d'analyser la modification somatique et génétique de bactéries entériques placées dans des conditions marines naturelles:

- par des expériences "in situ" en milieu confiné, dans lesquelles on utilise essentiellement la technique des chambres à diffusion. Celles-ci permettent de maintenir une population bactérienne, contrôlée ou non (souche pure ou population complexe de l'eau usées), en contact avec le milieu ambiant grâce à la diffusion du fluide marin à travers les parois poreuses d'une chambre en matériau transparent (plexiglas) ou opaque (PVC);
- par des expériences en systèmes "in situ simulé", qui permettent d'analyser l'évolution des populations bactériennes des eaux usées dans l'eau de mer, à différentes dilutions et pour des temps de contact variés entre ces deux fluides. Elles s'effectuent dans des bacs de grand volume alimentés en continu et à des débits variables, par l'eau usée et l'eau de mer;
- par l'analyse directe des entérobactéries dans les populations bactériennes naturelles, au niveau de sites marins côtiers où des eaux résiduaires sont rejetées en un point unique. Il s'agit dans ce cas de déterminer statistiquement s'il existe des différences significatives entre le profil phénotypique et génétique des bactéries de l'eau usée et celui des bactéries homologues retrouvées dans l'eau, les sédiments et la biomasse marines à une distance plus ou moins importante du point de rejet

Le premier moyen, expérimentalement plus souple, peut apporter certaines précisions sur l'influence de facteurs environnementaux non contrôlables au laboratoire (substances ectocrines phytoplanctoniques, lumière solaire, par exemple) sur la survie des germes testés. Il ne permet cependant pas une investigation complète des modifications que peuvent subir les entérobactéries des eaux usées soumises à l'ensemble des facteurs de l'environnement marin, et en particulier celle du transfert de plasmides avec les bactéries autochtones. Le maintien de chambres à diffusion dans le milieu naturel est en outre délicat (vois, pertes) et le procédé conserve certains inconvénients des expériences de laboratoire

L'utilisation d'un système de rejet "in situ" simulé offre les avantages des deux méthodes et permet d'analyser l'évolution en mer des bactéries des eaux usées dans des conditions très voisines de celles du milieu naturel, tout en laissant la possibilité de contrôler le temps de résidence de ces germes dans l'eau de mer. Elle facilite également l'étude des entérobactéries qui contaminent les sédiments et les animaux marins. Ce type d'étude est cependant lui aussi fondé sur l'analyse de nombreuses souches bactériennes pures isolées du système, assortie d'un traitement mathématique des résultats. En outre, et c'est là son inconvénient majeur, il ne peut rendre compte des processus de transformation lents, qui nécessitent un long séjour des cellules bactériennes dans le milieu.

Compte tenu de l'ensemble de ces contraintes, nous avons opté pour l'analyse de populations naturelles, en nous restreignant à l'étude de deux sites, et à l'espèce Escherichia coli.

1.2 Le modèle Escherichia coli

L'espèce *Escherichia coli* a été choisie sur la base d'un certain nombre de critères épidémiologiques, écologiques et physiologiques. Elle est dominante dans la flore fécale anaérobie facultative et on en trouve de très nombreux représentants dans les eaux usées urbaines (coliformes fécaux). Elle est en outre particulièrement bien connue sur de nombreux plans: structure, physiologie, biochimie, biologie moléculaire, génétique, pouvoir pathogène, ce qui en fait une espèce-test de choix pour l'étude que nous voulions réaliser. Enfin, bien

qu'habituellement commensale de l'intestin de l'homme et des animaux, et universellement utilisée comme indicateur de contamination fécale des milieux hydriques, cette bactérie peut, dans certaines conditions, devenir pathogène.

Les souches d'*E. coli* pathogènes sont responsables d'infections intestinales (gastro-entérites) et urinaires (colibacilloses), de septicémies ou de méningites. Les plus fréquentes sont classées en quatre groupes, selon leur mode de virulence:

- les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), responsables des diarrhées du nourrisson, souvent mortelles dans les pays à bas niveau d'hygiène;
- les *E. coli* entéroadhésifs (EAEC) capables de coloniser l'intestin par adhérence spécifique aux entérocytes;
- les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), responsables des diarrhées et gastro-entérites communes ("tourista" ou diarrhée du voyageur);
- les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC), capables de pénétrer et de se développer dans les cellules de la paroi intestinale après avoir franchi la barrière épithéliale, elles sont responsables de dysentéries et d'infections extra-intestinales, voire de septicémies.

Ces infections résultent de la manifestation de facteurs intrinsèques de virulence, dont les principaux sont la production de toxines, d'adhésines et de facteurs de colonisation, d'antigènes spécifiques (responsables du pouvoir invasif), d'hémolysines, de colicines, de sidérophores et de divers moyens de résistance aux agents antibactériens. Ces facteurs sont tous dépendants de gènes portés par des plasmides: c'est là la raison majeure du choix de cette espèce pour notre étude.

1.3 Principe méthodologique

L'idée centrale de notre étude était d'évaluer les différences phénotypiques (caractères d'identification et facteurs de virulence) et génétiques (contenu en plasmides, répartition de leur taille) qui peuvent exister entre les *E. coli* présents dans les eaux usées déversées dans deux zones côtières géographiquement très éloignées, et ceux que l'on peut isoler des sédiments et des animaux (coquillages: *Mytilus edulis*, crabes: *Pachygrapsus crassipes*) récoltés dans ces zones de rejet. La population de l'eau de mer elle-même autour des points de rejet n'a pas été analysée à cause de la trop grande variabilité temporelle de la contamination et du temps de séjour trop court des bactéries dans ce milieu.

Une telle analyse n'ayant de sens que statistiquement, nous avons dû respecter impérativement plusieurs conditions:

- choisir deux zones d'étude pour lesquelles la microflore contaminante des eaux, des sédiments et des animaux était bien liée à celle des eaux usées rejetées en un point unique;
- étaler dans le temps l'échantillonnage des souches d'*E. coli* afin de réduire les effets dus aux variations qualitatives éventuelles de la flore, ceci aussi bien pour les eaux usées que pour les échantillons marins;
- isoler et étudier, pour chaque matériel analysé (eau usée, sédiment marin, animaux) un nombre élevé de souches appartenant toutes à l'espèce *E. coli*, dans la mesure de faisabilité de l'étude.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Choix des sites de prélèvement des souches

Comme rappelé ci-dessus, la valeur écologique et épidémiologique des conclusions tirées de ce travail repose fondamentalement sur le choix des sites de prélèvements des souches analysées. Il est en effet nécessaire que les bactéries isolées du milieu marin (sédiments, coquillages, crustacés) soient bien issues des seules eaux usées dans lesquelles sont isolées par ailleurs les souches de référence "terrestres". Deux zones marines méditerranéennes ont été sélectionnées selon ce critère:

- la Baie du Lazaret, près de la Rade de Toulon (Var, France)(Fig.1);
- le point de rejet des eaux usées du hameau de Sayada (Sud de Monastir, Tunisie)(Fig.2).

Les deux rejets sont très différents. Dans le cas de la Baie du Lazaret, l'égout a un très faible débit et rejette dans le fond de la Baie les effluents d'un groupe d'habitations relativement réduit (quelques milliers d'habitants). Pour le rejet de Sayada, l'émissaire regroupe des rejets urbains et des eaux très contaminées en provenance des abattoirs de la ville de Monastir, installés depuis peu dans cette zone. Dans les deux cas, cependant, on note que les eaux de mer sont très peu renouvelées dans la zone du rejet, ce qui favorise le maintien sur place des eaux usées déversées et de leurs constituants microbiens.

2.2 Isolement des souches

La phase d'isolement des souches a été étalée sur plus d'un an pour la station française et sur plusieurs mois pour la station tunisienne. Ceci avait pour but d'intégrer la variabilité qualitative journalière et, dans une certaine mesure, saisonnière de la flore bactérienne des eaux usées et, par voie de conséquence, des échantillons marins

2.2.1 Nombre de souches isolées

Station de Toulon:

50 souches isolées de l'eau usée
45 souches isolées des sédiments marins
35 souches isolées de moules.

Site de Monastir:

43 souches isolées de l'eau usée
32 souches isolées des sédiments marins
32 souches isolées de crabes.

L'appartenance de chacune de ces souches à l'espèce *E. coli* a été systématiquement vérifiée sur galeries d'identification API 10E.

2.2.2 Technique d'isolement

L'isolement a été effectué sur milieu spécifique solide **mFC-agar** (Difco, Detroit; Mich.) non additionné d'acide rosolique, mais additionné de réactif fluorogène MUG (4-méthylumbelliféryl- β -glucuronide), ce qui permet de repérer assez spécifiquement les colonies d'*E. coli* sur les plaques de gélose mFC par leur fluorescence sous lumière ultra-violette (Gauthier *et al.*, 1989). Les boîtes de Pétri ont été incubées à 37° C pendant 24 à 48h. Les colonies fluorescentes ont été étalées et purifiées sur milieu non spécifique (Nutrient Agar, Difco)(NA). Les souches pures ont alors été incubées à 37° C en bouillon (Nutrient Broth, Difco)(NB) jusqu'en phase exponentielle; les

suspensions ont ensuite été additionnées de glycérol (10%, V/V), aliquotées et stockées dans l'azote liquide jusqu'à la réalisation des tests, ce qui évite la dérive génétique qui peut intervenir lorsque les souches subissent des repiquages successifs.

2.3 Examen morphologique

La forme des cellules et surtout la présence d'organites externes (flagelles, fimbriae et pili) a été observée au microscope électronique après coloration négative des cellules à l'acide phosphotungstique, selon Jann (1985). L'examen des préparations a été faite à l'aide d'un microscope électronique PHILIPS CM2, sous 100 kV (Centre de Microscopie Electronique, Université de Nice, France). Les photographies ont été prises à l'aide de ce même appareil.

2.4 Analyse phénotypique

Dans l'état actuel du travail, nous avons évalué, pour l'ensemble des 227 souches isolées, les caractères physiologiques suivants:

2.4.1 Profil phénotypique sur galeries API 10E

En utilisant une suspension de chaque souche en eau physiologique stérile. Les résultats ont été notés après 24 heures d'incubation à 37° C.

2.4.2 Halotolérance

Etablie par croissance en milieu minéral glucosé M9 (Maniatis *et al.*, 1982) additionné de 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 et 100 grammes de NaCl/litre.

2.4.3 Thermotolérance

Par incubation des souches sur NA à 8° C, 20° C, 30° C, 37° C et 45° C.

2.4.4 Profil de sensibilité aux antibiotiques

Il a été réalisé par la méthode de l'antibiogramme standard (Chabbert, 1962), sur milieu Mueller-Hinton (25 ml par boîte diamètre 10cm), à l'aide des Bio-discs préchargés commercialisés par les Ets Mérieux (Marcy l'Etoile, France). Les plaques de milieu ont été inoculées par inondation à l'aide d'une culture de chaque souche en bouillon Mueller-Hinton (24h, 37° C) diluée au 1/1000ème. Les résultats ont été notés après 24h d'incubation à 37° C. 18 antibiotiques ont été testés (entre parenthèses: code abrégé pour chaque antibiotique, et quantité d'antibiotique dans le disque en microgrammes):

β lactamines:	pénicilline G (P 10) oxacilline (OX 5) ampicilline (AM 10) céphaloridine (CD 30) céfurixime (CXM 30)
Aminosides:	streptomycine (S 10) kanamycine (K 30) tobramycine (NN 10) gentamycine (GM 10)
Tétracyclines:	tétracycline (TE 30)

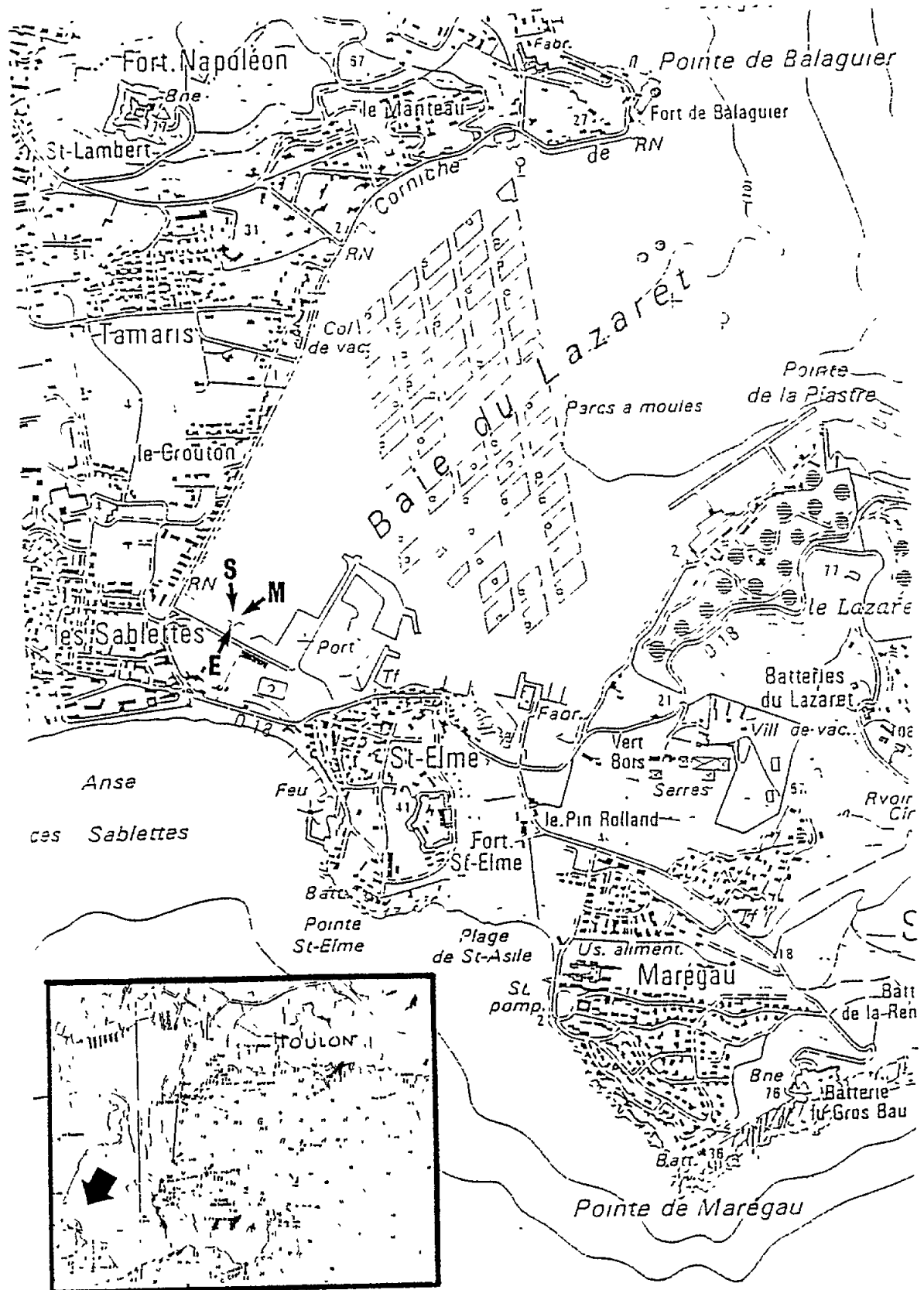


Fig.1: Position des stations de prélèvement des eaux usées (E), des sédiments (S) et des moules (M) dans la Baie du Lazaret (Toulon, France)

Fig.2: Position des stations de prélèvements des eaux usées (E), des sédiments (S) et des crabes (C) le long du littoral de Sayada (Monastir, Tunisie)

Macrolides:	érythromycine (E 15) lincomycine (L 15) oléandomycine (OL 15) spiramycine (SP 100) virginiamycine (SA 15)
Phénicol:	chloramphénicol (C 30)
Quinolones:	acide nalidixique (NA 30)
Divers:	novobiocine (NB 30)

2.4.5 Présence de facteurs de colonisation (CFA I)

Ces facteurs CFA I (Colonization Factors Antigens) sont des protéines d'enveloppe (ou adhésines) qui reconnaissent des molécules présentes à la surface des entérocytes et permettent ainsi une fixation spécifique des cellules bactériennes à la paroi intestinale; ils sont donc impliqués dans la phase la plus précoce du pouvoir pathogène (Parry et Rooke, 1985). Leur recherche directe est relativement complexe car elle nécessite l'emploi de préparations fraîches de cellules intestinales humaines (Girardeau, 1980). Elle peut cependant être réalisée par un test plus simple, bien que moins spécifique: celui de l'agglutination d'hématies humaines du groupe A sur carreau de faïence refroidi. Ce test a été décrit par Duguid *et al.* (1979), puis par Odd (1985). Il a été effectué à l'aide de cellules cultivées en bouillon CFA puis isolées par centrifugation (5000g, 4° C, 10min) après 24h d'incubation à 37° C. Le milieu CFA est très favorable à la synthèse de facteurs CFA par *E. coli* (Evans *et al.* 1977); sa composition est la suivante: casamino-acids, 1g; yeast extract, 1,5g; MgSO₄, 0,1g; MnCl₂, 0,1 ml d'une solution aqueuse à 79 mg/ml, eau distillée, 1 litre, pH 7.4

Le test d'agglutination est effectué en présence ou non de mannose (1%, P/V) afin de déterminer la nature des facteurs de colonisation: les CFA I agglutinent les hématies humaines A+ en présence de mannose (hémagglutination mannose résistance, ou HAMR), les piliis communs provoquant une hémagglutination mannose sensible (HAMS) qui ne se fait pas en présence du sucre (Evans *et al.*, 1979).

2.4.6 Production d'hémolysines

Elle a été recherchée sur gélose au sang (Institut Pasteur), additionnée de sang humain de groupe A. Seules les β hémolysines ont été notées (hémolyse totale autour des colonies).

2.4.7 Production de colicines

Il a été démontré que la présence de colicine dans les souches d'*E. coli* est liée à leur pouvoir pathogène (voir Griffiths, 1985).

L'existence éventuelle d'une activité colicine dans les souches sélectionnées a été recherchée sur milieu solide (Nutrient Agar, Difco)(NA) inoculée en masse par une culture d'*E. coli* HB101 en milieu liquide (Nutrient Broth, Difco)(NB) incubée pendant 24h à 37° C. Chaque souche a été effectuée après 48h d'incubation à 37° C. Les tests positifs se traduisent par l'apparition d'une auréole d'inhibition de la souche HB101 autour des colonies colicinogènes.

2.5 Etude génétique

Elle a consisté à analyser **le contenu en plasmides** de chaque souche et, pour les souches possédant un ou plusieurs de ces éléments extrachromosomiques, à déterminer **leur nombre et leur taille**.

2.5.1 Extraction des plasmides

L'ADN plasmidique de chaque souche a été classiquement extrait et purifié selon la méthode de lyse alcaline décrite par Birnboim et Doly (1979), à partir de cellules cultivées pendant 24h à 37° C en bouillon LB (Luria-Bertani), dont la composition est la suivante: tryptone, 10g; yeast extract, 5g; NaCl, 10g, eau distillée, 1 litre; pH 7.5 avec NaOH.

2.5.2 Analyse du profil plasmidique par électrophorèse

L'ADN de chaque souche a été séparé par électrophorèse sur gel d'agarose (à 0,8% d'agarose), selon la méthode décrite par Maniatis et al. (1982), et visualisé à l'aide d'un transilluminateur UV (Macrovue LKB 2011). La taille de l'ADN de chaque bande apparaissant dans ces gels a été évaluée (approximativement) par référence à deux standards de poids moléculaire (digestion de phage lambda par deux enzymes de restriction).

2.6 Analyse statistique des résultats

Elle a été effectuée par le test du Chi2 et, dans certains cas, par une analyse de variance (Schwartz, 1975).

3. RESULTATS

3.1 Phénotype des souches

3.1.1 Profils API

Toutes les souches utilisées ont été identifiées à l'espèce *E. coli* (Tableau 1). Leur profil phénotypique sur galeries API10E différait cependant sur certaines enzymes (arginine dihydrolase, lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase) et la production d'H₂S. Pour les deux sites d'étude, les souches provenant d'animaux (moules ou crabes) possédaient plus fréquemment une LDC. Par ailleurs des souches possédant une ADH et/ou produisant de l'hydrogène sulfuré n'ont été détectées que dans les trois lots provenant de Monastir.

3.1.2 Halotolérance

Pour chaque site, les souches isolées d'échantillons marins (sédiments, organismes) étaient significativement plus tolérantes au NaCl que celles issues des eaux usées (Tableau 2). Toutes les souches étudiées se sont développées en présence de 40 g de NaCl/litre et aucune d'entre elles n'a dépassé le seuil de tolérance de 70 g NaCl/litre.

3.1.3 Thermotolérance

Toutes les souches étudiées se sont développées entre 20° C et 37° C (Tableau 3). Environ 90% d'entre elles étaient capables de le faire (lentement) à 8° C, aucune différence significative n'étant notée sur ce point entre les lots de souches venant de Toulon ou de Monastir. La tolérance à une haute température (45° C) concernait également environ 90% des souches; celles qui provenaient des sédiments de Monastir avaient une plus grande sensibilité que l'ensemble des autres (significatif au seuil 1%).

3.1.4 Résistance aux antibiotiques

D'un point de vue général (Tableau 4), on constate que les souches provenant de Monastir étaient un peu plus résistantes aux aminosides (S10, K30, NN10, GM10) que celles isolées à Toulon. Là n'est cependant pas l'intérêt principal des résultats. Si l'on compare, au

niveau de chacun des deux sites, la fréquence des souches résistantes dans l'eau usée et dans les échantillons marins, on constate deux différences:

- * les souches "marines" étaient plus résistantes à la céphaloridine, à plusieurs aminosides (kanamycine, tobramycine, gentamycine) et à l'acide nalidixique; cette différence est hautement significative (seuil 0,001%);
- * les souches "terrestres" des eaux usées étaient plus résistantes à la novobiocine et à la tétracycline (seuil 5%) pour Toulon, et à l'érythromycine (seuil 5%) pour Monastir.

En ce qui concerne la polyrésistance des souches (Tableau 5), une différence est apparue entre les deux sites étudiés. Dans le cas des souches provenant de Toulon, les souches "terrestres" présentaient une polyrésistance plus élevée que celles isolées d'échantillons marins, avec cependant une proportion moins élevée de souches simultanément résistantes à 5, 6, 7, 8 et 9 antibiotiques. Pour les souches isolées à Monastir par contre, la polyrésistance était plus élevée pour les souches "marines", et plus particulièrement pour celles isolées de crabes.

3.1.5 Production de colicines

Aucune différence significative n'a été observée de ce point de vue entre les souches "marines" et "terrestres", aux deux sites choisis (Tableau 6). On notera simplement une incidence plus grande des souches colicinogènes dans les échantillons prélevés à Monastir.

3.1.6 Activité hémolytique

Ici encore, l'activité des souches de Monastir était beaucoup plus élevée que celles des souches isolées à Toulon (Tableau 6). Parmi les souches provenant de Monastir, celles qui ont été isolées du milieu marin étaient très significativement (seuil 0,001%) moins hémolytiques que celles provenant des eaux usées.

3.1.7 Activité hémagglutinante

Comme pour la production de colicines et d'hémolysines, on note que les souches de Monastir étaient plus actives que celles de Toulon et que, parmi les premières, les souches capables d'agglutiner les hématies humaines A+ étaient significativement (seuil 0,01%) moins nombreuses dans les échantillons marins, aussi bien pour l'activité HAMR que HAMS (Fig. 3).

3.2 Profil plasmidique

Les souches isolées à Monastir contenaient plus fréquemment des plasmides que celles isolées à Toulon (Tableau 7). De ce point de vue, aucune différence significative n'est apparue entre les souches "terrestres" et les souches "marines" pour le lot de souches isolées à Toulon. Par contre, pour celles provenant de Monastir, on note que les souches isolées des sédiments marins et, plus encore, celles provenant de crabes, contenaient moins fréquemment des plasmides (quelle que soit la taille de ceux-ci).

En ce qui concerne le profil des plasmides (nombre et taille dans chaque souche), on notera que, pour les deux sites étudiés, les souches provenant des eaux usées contenaient un plus grand nombre de plasmides par souche (Tableau 8) (significatif à 1%); par contre il n'existait aucune différence significative nette dans la répartition des tailles de ces éléments d'ADN extrachromosomique, pour les deux sites, selon la provenance "terrestre" ou "marine" des souches (Tableau 9); les plasmides les plus fréquents avaient un poids moléculaire compris entre 21 et 40 kilobases, avec quelques variations de détail autour de cette valeur. Il semblerait ainsi que les souches isolées de crabes à Monastir contenaient plus fréquemment des petits plasmides (11 à 30 kilobases). Un exemple de profils plasmidiques obtenus avec quelques souches est donné dans la Fig. 4.

Tableau 1

Profil phénotypique sur galeries API10E
des souches isolées à Toulon et à Monastir

Provenance	Caractères phénotypiques API10E*
TOULON	Toutes les souches ONPG+, ADH-, CIT-, H ₂ S-, URE-, TDA, IND+, VP- Caractères différentiels: eau usée: LDC+: 65%, ODC+: 35% sédiment: LDC+: 66%, ODC+: 57% moules : LDC+: 86%, ODC+: 42%
MONASTIR	Toutes les souches ONPG+, CIT-, URE-, TDA-, IND+, VP- Caractères différentiels eau usée : ADH+: 4,6%, LDC+: 69%, ODC+: 48%, H ₂ S+: 4,6% sédiment : ADH+: 3,1%, LDC+: 72%, ODC+: 54%, H ₂ S+: 12,5% crabes : ADH+: 36%, LDC+: 80%, ODC+: 47%, H ₂ S+: 4,5%

*ONPG: β galactosidase
CIT: utilisation du citrate
URE. uréase (en anaérobiose)
TDA: tryptophane déaminase
IND. production d'indole
VP: réaction de Voges-Proskauer (production d'acétoïne)
ADH: arginine dihydrolase (en anaérobiose)
LDC: lysine décarboxylase (en anaérobiose)
ODC: ornithine décarboxylase (en anaérobiose)
H₂S: production d'hydrogène sulfuré (en anaérobiose)

Tableau 2

Halotolérance des souches isolées à Toulon et à Monastir;
% de souches à croissance + dans chaque lot, par rapport au nombre des souches du lot

Provenance		Concentration en NaCl (g/l)									
		0	10	20	30	40	50	60	70	80	100
TOULON	E*	100	100	100	100	100	60	24	0	0	0
	S*	100	100	100	100	100	95	55	0	0	0
	M*	100	100	100	100	100	72	43	0	0	0
MONASTIR	E*	100	100	100	100	100	54	18	0	0	0
	S*	100	100	100	100	100	82	49	0	0	0
	C*	100	100	100	100	100	80	42	0	0	0

* E: eau usée; S: sédiment; M: moule; C: crabes

Tableau 3

Thermotolérance des souches isolées à Toulon et à Monastir;
% de souches à croissance + dans chaque lot, par rapport à
l'ensemble des souches du lot

Provenance		Température d'incubation (°C)				
		8	20	30	37	45
TOULON	E*	90	100	100	100	95
	S*	95	100	100	100	89
	M*	89	100	100	100	88
MONASTIR	E*	86	100	100	100	95
	S*	92	100	100	100	74
	C*	90	100	100	100	90

* E: eau usée; S: sédiment; M: moule; C: crabes

Tableau 4

Phénotype de résistance aux antibiotiques des souches isolées
à Toulon et à Monastir (% de souches **résistantes** dans chaque lot
par rapport à l'ensemble des souches du lot)

	Provenance					
Antibiotique	TOULON			MONASTIR		
	E*	S*	M*	E*	S*	C*
P 10	100	100	100	100	100	100
AM 10	53	53	56	39	45	43
OX 5	100	100	100	100	100	100
CD 30	67	33	27	74	37	41
CXM 30	20	20	22	12	10	10
S 10	53	53	40	73	71	68
K 30	40	7	4	58	20	12
NN 10	34	13	10	45	28	24
GM 10	27	7	10	45	12	21
NB 30**	74	93	86	100	100	100
TE 30	80	100	100	94	100	100
E 15	87	87	100	72	81	79
L 15	100	100	100	100	100	100
OL 15	100	100	100	100	100	100
SP 100	94	100	100	100	100	100
SA 15	94	93	100	98	91	95
C 30	13	13	16	19	25	23
NA 30**	20	7	14	37	25	23

* E: eau usée; : sédiment; M: moules; C: crabes

** antibiotiques auxquels aucune résistance plasmidique n'a été détectée

Tableau 5

Polyrésistance aux antibiotiques des souches isolées à Toulon et à Monastir

Origine des souches	Pourcentage de souches simultanément résistantes à:																
	2AB	3AB	4AB	5AB	6AB	7AB	8AB	9AB	10AB	11AB	12AB	13AB	14AB	15AB	16AB	17AB	18AB
Toulon	E ^r	100	100	100	94	94	94	88	80	68	54	46	40	34	20	3	2
	S ^r	100	100	100	100	100	100	100	93	67	33	13	13	7	0	0	0
	M ^r	100	100	100	100	100	100	100	100	74	60	34	20	14	7	0	0
Monastir	E ^r	100	100	100	100	96	93	93	83	76	51	46	46	30	21	10	4
	S ^r	100	100	100	100	100	100	100	97	90	74	60	51	40	24	13	8
	C ^r	100	100	100	100	100	100	100	100	88	80	80	55	42	24	6	0

* E: Eau usée; S: Sédiment; M: Moules; C: Crabes

Tableau 6

Activité colicinogène, β hémolytique et hémagglutinante (hématites humaines groupe A+) des souches isolées à Toulon et à Monastir. (% de souches présentant ces activités dans chaque lot, par rapport au nombre total de souches du lot)

Provenance		Production de colicines	β hémolyse	Hémagglutination*	
				HAMR	HAMR
TOULON	E**	20	0	0	0
	S**	20	0	0	0
	M**	16	0	0	0
MONASTIR	E**	36	22	22	16
	S**	34	12	12	6
	C**	30	8	14	6

* HAMR: agglutination résistante au mannose

HAMS: agglutination sensible au mannose

**E: eau usée; S: sédiment; M: moules; C: crabes

Tableau 7

Proportion (nombre absolu et pourcentage) de souches hébergeant un ou plusieurs plasmides dans chaque lot de souches isolées à Toulon et à Monastir

Provenance		Nombre total	Souches sans plasmides	Souches avec plasmides
TOULON	E'	50	35 (70%)	15 (30%)
	S'	45	34 (75,3%)	11 (24,4%)
	M'	35	25 (71,4%)	10 (28,5%)
MONASTIR	E'	43	18 (42%)	25 (58%)
	S'	32	19 (59,3%)	13 (40,7%)
	C'	32	21 (66%)	11 (34%)

* E: eau usée; S: sédiment; M: moules; C: crabes

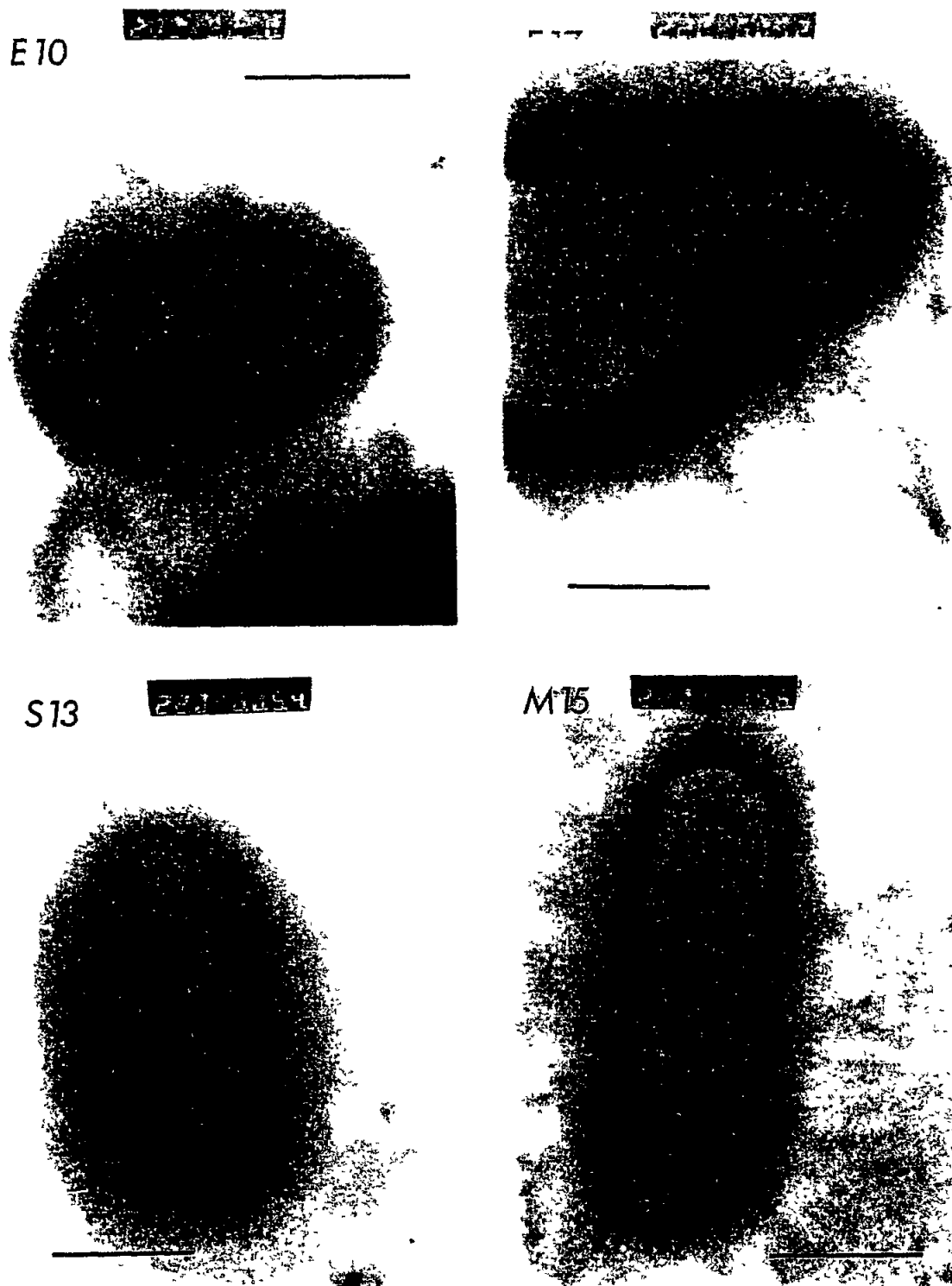


Fig. 3: Electronographies des souches d'*E. coli* E10 et E17 (eau usée), S13 (sédiments) et M15 (moules) après coloration négative par l'acide phosphotungstique. Les fimbriae CFAI (E10, E17 et S13, HAMR) et les pilis communs (M15, HAMS) apparaissent nettement à la périphérie des cellules. Les barres représentent 1 μm

Tableau 8

Nombre de plasmides simultanément hébergés par les souches isolées à Toulon et à Monastir

Provenance		Nombre (et % par rapport au nombre total de souches de chaque lot) de souches hébergeant le nombre suivant de plasmides				
		1	2	3	4	5
TOULON	E*	2 (4%)	4 (8%)	5 (10%)	2 (4%)	2 (4%)
	S*	3 (6,6%)	5 (11%)	3 (6,6%)	0 (0)	0 (0)
	M*	1 (2,8%)	5 (14,3%)	3 (8,6%)	1 (2,8%)	0 (0)
MONASTIR	E*	4 (9,3%)	1 (2,3%)	7 (16,3%)	11 (25,6%)	2 (4,6%)
	S*	3 (9,3%)	2 (6,2%)	4 (12,5%)	4 (12,5%)	0 (0)
	C*	1 (3,1%)	1 (3,1%)	3 (9,3%)	6 (18,8%)	0 (0)

* E: eau usée; S: sédiment; M: moule; C: crabes

Tableau 9

Taille des plasmides hébergés par les souches isolées à Toulon et à Monastir

Provenance		Nombre total de plasmides	Nombre (et % par rapport au nombre total de plasmides hébergés par les souches du lot) de souches hébergeant des plasmides dont la taille (en kilobases) est						
			<5	6-10	11-20	21-30	31-40	41-60	>60
	E*	43	10 (23,2)	2 (4,6)	6 (14)	12 (28)	6 (14)	5 (11,6)	2 (4,6)
	S*	22	4 (18)	1 (4,5)	1 (4,5)	5 (22,7)	9 (41)	1 (4,5)	1 (4,5)
	M*	24	5 (20,8)	2 (8,3)	1 (4,1)	10 (41,6)	3 (12,5)	1 (4,1)	2 (4,5)
MONASTIR	E*	81	13 (16)	8 (10)	10 (12,3)	22 (27)	16 (19,8)	8 (10)	4 (4,9)
	S*	35	5 (4,3)	3 (8,6)	2 (5,7)	9 (25,7)	12 (34,3)	2 (5,7)	2 (5,7)
	C*	36	6 (16,7)	1 (2,8)	16 (44,4)	11 (30,6)	1 (2,8)	2 (5,6)	0 (0)

* E: eau usée; S: sédiment; M: moule; C: crabes

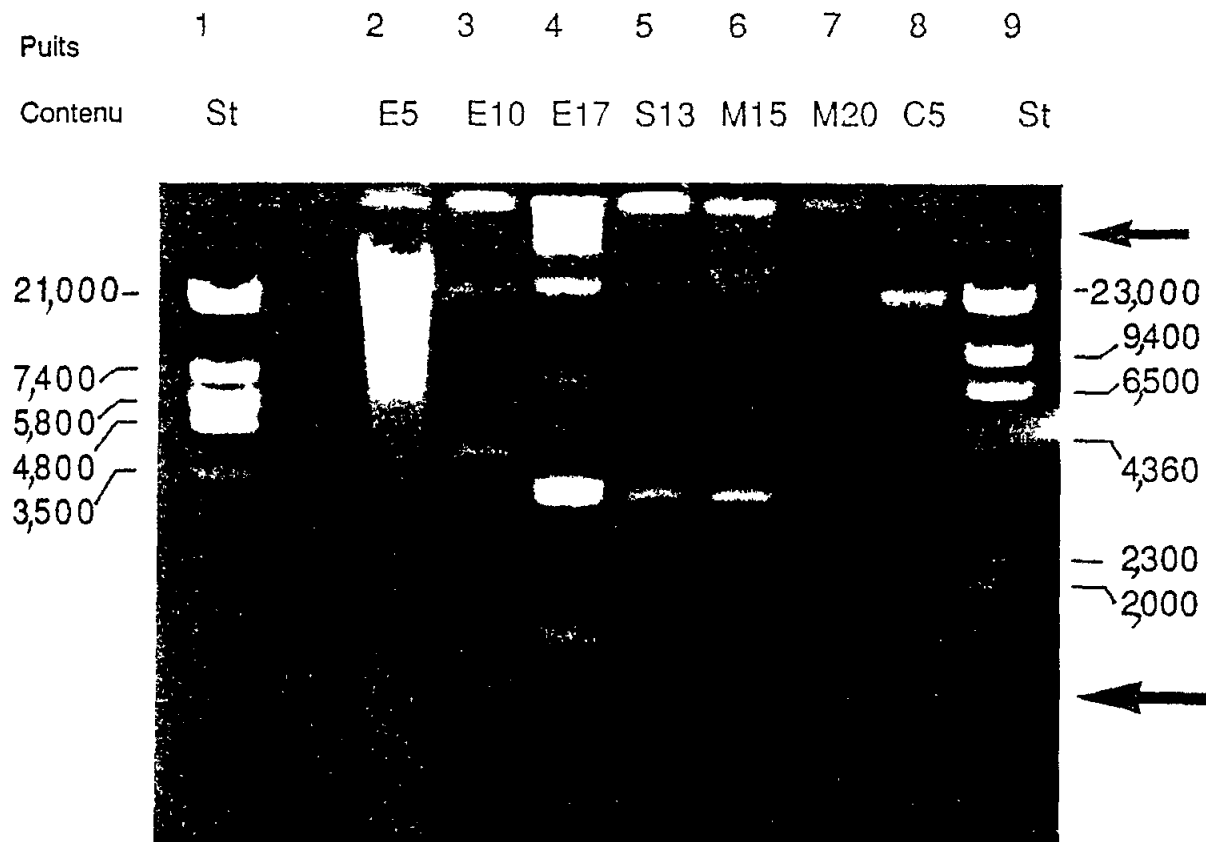


Fig. 4: Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique extrait des souches E5, E10, E17, S13, M15, M20 et C5. Les bandes correspondant aux plasmides sont présentes dans la zone comprise entre les deux flèches. Les puits 1 et 9 contiennent deux standards de calibration des poids moléculaires (valeurs indiquées, en kilobases)

4. DISCUSSION - CONCLUSIONS

En dehors des différences phénotypiques et génétiques, bien compréhensibles, qui sont apparues entre les souches isolées à Toulon et à Monastir, nous avons donc observé pour les deux sites, certaines différences entre les souches isolées des eaux usées ("terrestres") d'une part, et d'échantillons marins (sédiments et animaux)("marines") d'autre part. On peut les récapituler comme suit:

- les souches "marines" étaient:
 - plus tolérantes à la salinité du milieu de croissance
 - plus sensibles aux hautes températures (sédiments de Monastir)
 - plus résistantes à certains antibiotiques (céphaloridine, aminosides, acide nalidixique)
 - plus polyrésistantes aux antibiotiques (seulement pour Monastir)
 - moins hémolytiques (Monastir)
 - moins hémagglutinantes (Monastir);
- les souches "terrestres" étaient plus résistantes à la novobiocine, à la tétracycline (Toulon) et à l'érythromycine (Monastir)

En ce qui concerne la tolérance à la salinité, ces résultats suggèrent que le séjour des cellules d'*E. coli* dans le milieu marin, pour une période non encore précisée, puisse conduire à une augmentation de leur capacité à se développer dans les milieux salés, donc à une augmentation de leur halotolérance intrinsèque. Une observation analogue a été faite récemment à l'IFREMER (Centre de Brest, France), pour des souches d'entérobactéries diverses prélevées dans des sédiments marins côtiers intertidaux du littoral atlantique (Dupray E., Pommepuy M. et Cormier M., communication personnelle). Il serait intéressant d'analyser cette propriété après de nombreux repiquages sur milieux salés ou non, afin d'évaluer le maintien de l'halotolérance à long terme. Il semble en outre que cette halotolérance accrue, même si elle s'avère transitoire, peut s'accompagner d'une diminution, modeste mais significative, de la tolérance à la température. Dans l'état actuel des connaissances, il n'est pas possible de dire si l'évolution de ces deux propriétés est liée ou si elle peut s'effectuer d'une manière indépendante. Quoi qu'il en soit, cette évolution phénotypique statistiquement vérifiée sur un nombre important de souches, est en accord avec les résultats d'études effectuées au laboratoire, qui montrent qu'*E. coli* et d'autres entérobactéries sont capables de s'adapter à la haute osmolarité de l'eau de mer (voir Annexe 1), et que cette adaptation est partiellement rémanente (Munro et al., 1989).

En ce qui concerne la résistance aux antibiotiques, il est sanitaire important de constater que, dans une certaine mesure au moins, le niveau de résistance des coliformes fécaux à certains de ces inhibiteurs peut être plus élevé dans les populations de ces germes "adaptées" au milieu marin. La cause de cette évolution reste tout à fait inconnue. Quelle qu'elle soit, l'adaptation des cellules se fait, sur ce point, dans le sens d'une **augmentation du risque sanitaire**.

La moindre incidence de l'activité hémolytique et hémagglutinante dans les populations "marines" d'*E. coli* suggère de nouveau fortement une **modification des propriétés phénotypiques des coliformes fécaux en mer**. Dans ce cas, il s'agit de deux propriétés immédiatement impliquées dans l'expression du pouvoir pathogène, donc ayant une importance sanitaire élevée. Leur évolution dans les sédiments et les organismes marins se fait dans le sens d'une **diminution de ce pouvoir pathogène, donc d'une diminution du risque**. Une telle disparition des propriétés d'hémolyse et d'agglutination peut s'expliquer (1) par une moins bonne survie dans l'environnement marin des cellules hébergeant certains marqueurs de résistance plasmidiques, (2) par une moins bonne stabilité des plasmides porteurs de ces marqueurs dans ces conditions, (3) par l'abolition, temporaire ou définitive, de l'expression des gènes ou des mécanismes cellulaires de résistance après séjour dans le milieu marin. L'hypothèse d'une perte de certains plasmides dans les sédiments ou les organismes marins contaminés paraît, en partie au moins, supportée par l'observation d'une diminution du nombre de souches hébergeant des plasmides, au moins pour celles provenant de Monastir, et d'un nombre moins élevé de plasmides par souche pour les

deux sites étudiés. Sous réserve d'une confirmation sur un nombre plus élevé de souches, isolées au niveau de sites plus divers, **ces résultats suggèrent que le milieu marin possède un certain "pouvoir curant" qui élimine, chez les bactéries allochtones, les plasmides les moins stables.** Ceci semble *a posteriori* logique: on sait en effet que les plasmides portant les facteurs CFA, par exemple, sont très instables et peuvent disparaître spontanément au cours de repiquages répétés au laboratoire.

En conclusion de ce travail, il nous semble important de souligner que l'analyse phénotypique et génétique, même relativement sommaire, des populations de coliformes fécaux avant et après leur rejet en mer, met en évidence leur évolution somatique et/ou génétique sous l'influence de facteurs spécifiquement marins dont la nature reste inconnue. Elle confirme ainsi *in situ* les conclusions auxquelles sont parvenues de nombreuses études effectuées en laboratoire à l'aide de souches pures. Il serait évidemment nécessaire de confirmer ces résultats sur un nombre beaucoup plus élevé de souches, provenant de sites plus variés. Les résultats, très encourageants, de la présente étude paraissent le justifier.

6. REFERENCES

- BIRNBOIM, H.C., et DOLY, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, **7**: 1513-1523.
- CHABBERT, Y.A. 1962. L'Antibiogramme. Ed. La Tourelle, St. Mandé.
- DUGUID, J.P., CLEGG, S. et WILSON, M.I. 1979. The fimbrial and non-fimbrial hemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, **12**: 213-227.
- EVANS, D.G., EVANS D.J., et TJOA, W. 1977. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhoea: correlation with colonization factor. *Infect. Immun.*, **18**: 330-337.
- EVANS, D.J., EVANS D.G., YOUNG, L.S. et PITT, J. 1980. Hemagglutination typing of *Escherichia coli*. Definition of seven hemagglutination types. *J. Clin. Microbiol.*, **12**: 235-242.
- GAUTHIER, M.J., BORREGO, J.J. et TORREGROSSA, V. 1988. Evaluation de la spécificité et de la sensibilité d'une méthode fluorimétrique de dénombrement d'*Escherichia coli* dans les échantillons d'eau et de sédiments marins par hydrolyse du 4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide. *Rapp. O.M.S.-P.N.U.E.*, 37pp.
- GIRARDEAU, J.P. 1980. A new *in vitro* technique for attachment to intestinal villi using enteropathogenic *Escherichia coli*. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, **131B**: 31-37.
- GRIFFITHS, E. 1985. Candidate virulence markers. In: *The virulence of Escherichia coli, reviews and methods*. Ed. M. Susman. Soc. Gen. Microbiol., Academic Press, London, pp. 193-226.
- JANN, K. 1985. Isolation and characterization of fimbriae from *Escherichia coli*. In: *The virulence of Escherichia coli : reviews and methods*. Ed. M. Sussman, Soc. Gen. Microbiol., Academic Press, London, 1985, pp. 381-388.
- MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., et SAMBROOK, J. 1982. Molecular cloning. A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 149-172.
- MUNRO, P.M., GAUTHIER, M.J., et BONGIOVANNI, J. 1989. Influence of osmoregulation processes on starvation survival of *Escherichia coli* in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 2017-2024.

- ODD, D.C. 1985. Hemagglutination methods in the study of *Escherichia coli*. In: *The virulence of Escherichia coli, reviews and methods*. Ed. M. Susman, Soc. Gen. Microbiol., Academic Press, London, pp. 287-314.
- PARRY, S.H., et ROOKE, D.M. 1985. Adhesins and colonization factors of *Escherichia coli*. In: *The virulence of Escherichia coli : reviews and methods*. Ed. M. Susman, Soc. Gen. Microbiol., Academic Press, London, 1985, pp. 79-156.
- SCHWARTZ, D. 1980. Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes. Flammarion, Paris, pp. 173-187.

PUBLICATIONS OF THE MAP TECHNICAL REPORTS SERIES

1. UNEP/IOC/WMO: Baseline studies and monitoring of oil and petroleum hydrocarbons in marine waters (MED POL I). MAP Technical Reports Series No. 1. UNEP, Athens, 1986 (96 pages) (parts in English, French or Spanish only).
2. UNEP/FAO: Baseline studies and monitoring of metals, particularly mercury and cadmium, in marine organisms (MED POL II). MAP Technical Reports Series No. 2. UNEP, Athens, 1986 (220 pages) (parts in English, French or Spanish only).
3. UNEP/FAO: Baseline studies and monitoring of DDT, PCBs and other chlorinated hydrocarbons in marine organisms (MED POL III). MAP Technical Reports Series No. 3. UNEP, Athens, 1986 (128 pages) (parts in English, French or Spanish only).
4. UNEP/FAO: Research on the effects of pollutants on marine organisms and their populations (MED POL IV). MAP Technical Reports Series No. 4. UNEP, Athens, 1986 (118 pages) (parts in English, French or Spanish only).
5. UNEP/FAO: Research on the effects of pollutants on marine communities and ecosystems (MED POL V). MAP Technical Reports Series No. 5. UNEP, Athens, 1986 (146 pages) (parts in English or French only).
6. UNEP/IOC: Problems of coastal transport of pollutants (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens, 1986 (100 pages) (English only).
7. UNEP/WHO: Coastal water quality control (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens, 1986 (426 pages) (parts in English or French only).
8. UNEP/IAEA/IOC: Biogeochemical studies of selected pollutants in the open waters of the Mediterranean (MED POL VIII). MAP Technical Reports Series No. 8. UNEP, Athens, 1986 (42 pages) (parts in English or French only).
8. Add. UNEP: Biogeochemical studies of selected pollutants in the open waters of the Mediterranean (MED POL VIII) Addendum, Greek Oceanographic Cruise 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens, 1986 (66 pages) (English only).
9. UNEP: Co-ordinated Mediterranean pollution monitoring and research programme (MED POL - PHASE I). Final report, 1975-1980. MAP Technical Reports Series No. 9. UNEP, Athens, 1986 (276 pages) (English only).
10. UNEP: Research on the toxicity, persistence, bioaccumulation, carcinogenicity and mutagenicity of selected substances (Activity G). Final reports on projects dealing with toxicity (1983-85). MAP Technical Reports Series No. 10. UNEP, Athens, 1987 (118 pages) (English only).
11. UNEP: Rehabilitation and reconstruction of Mediterranean historic settlements. Documents produced in the first stage of the Priority Action (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 11. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1986 (158 pages) (parts in English or French only).
12. UNEP: Water resources development of small Mediterranean islands and isolated coastal areas. Documents produced in the first stage of the Priority Action (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 12. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parts in English or French only).

13. UNEP: Specific topics related to water resources development of large Mediterranean islands. Documents produced in the second phase of the Priority Action (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 13. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parts in English or French only).
14. UNEP: Experience of Mediterranean historic towns in the integrated process of rehabilitation of urban and architectural heritage. Documents produced in the second phase of the Priority Action (1986). MAP Technical Reports Series No. 14. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (500 pages) (parts in English or French only).
15. UNEP: Environmental aspects of aquaculture development in the Mediterranean region. Documents produced in the period 1985-1987. MAP Technical Reports Series No. 15. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (101 pages) (English only)
16. UNEP: Promotion of soil protection as an essential component of environmental protection in Mediterranean coastal zones. Selected documents (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 16. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (424 pages) (parts in English or French only).
17. UNEP: Seismic risk reduction in the Mediterranean region. Selected studies and documents (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 17. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (247 pages) (parts in English or French only).
18. UNEP/FAO/WHO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by mercury and mercury compounds. MAP Technical Reports Series No. 18. UNEP, Athens, 1987 (354 pages) (English and French).
19. UNEP/IOC: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by petroleum hydrocarbons. MAP Technical Reports Series No. 19. UNEP, Athens, 1988 (130 pages) (English and French).
20. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and health effects (1983-86). MAP Technical Reports Series No. 20. UNEP, Athens, 1988 (156 pages) (English only).
21. UNEP/UNESCO/FAO: Eutrophication in the Mediterranean Sea: Receiving capacity and monitoring of Long term effects. MAP Technical Reports Series No. 21. UNEP, Athens, 1988 (200 pages) (parts in English or French only).
22. UNEP/FAO: Study of ecosystem modifications in areas influenced by pollutants (Activity I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988 (146 pages) (parts in English or French only).
23. UNEP: National monitoring programme of Yugoslavia, Report for 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988 (223 pages) (English only).
24. UNEP/FAO: Toxicity, persistence and bioaccumulation of selected substances to marine organisms (Activity G). MAP Technical Reports Series No. 24. UNEP, Athens, 1988 (122 pages) (parts in English or French only).

25. UNEP: The Mediterranean Action Plan in a functional perspective: A quest for law and policy. MAP Technical Reports Series No. 25. UNEP, Athens, 1988 (105 pages) (English only).
26. UNEP/IUCN: Directory of marine and coastal protected areas in the Mediterranean Region. Part I - Sites of biological and ecological value. MAP Technical Reports Series No. 26. UNEP, Athens, 1989 (196 pages) (English only).
27. UNEP: Implications of expected climate changes in the Mediterranean Region: An overview. MAP Technical Reports Series No. 27. UNEP, Athens, 1989 (52 pages) (English only).
28. UNEP: State of the Mediterranean marine environment. MAP Technical Reports Series No. 28. UNEP, Athens, 1989 (225 pages) (English only).
29. UNEP: Bibliography on effects of climatic change and related topics. MAP Technical Reports Series No. 29. UNEP, Athens, 1989 (143 pages) (English only).
30. UNEP: Meteorological and climatological data from surface and upper measurements for the assessment of atmospheric transport and deposition of pollutants in the Mediterranean Basin: A review. MAP Technical Reports Series No. 30. UNEP, Athens, 1989 (137 pages) (English only).
31. UNEP/WMO: Airborne pollution of the Mediterranean Sea. Report and proceedings of a WMO/UNEP Workshop. MAP Technical Reports Series No. 31. UNEP, Athens, 1989 (247 pages) (parts in English or French only).
32. UNEP/FAO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K). MAP Technical Reports Series No. 32. UNEP, Athens, 1989 (139 pages) (parts in English or French only).
33. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of organotin compounds as marine pollutants in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 33. UNEP, Athens, 1989 (185 pages) (English and French).
34. UNEP/FAO/WHO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by cadmium and cadmium compounds. MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989 (175 pages) (English and French).
35. UNEP: Bibliography on marine pollution by organotin compounds. MAP Technical Reports Series No. 35. UNEP, Athens, 1989 (92 pages) (English only).
36. UNEP/IUCN: Directory of marine and coastal protected areas in the Mediterranean region. Part I - Sites of biological and ecological value. MAP Technical Reports Series No. 36. UNEP, Athens, 1990 (198 pages) (French only).
37. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with eutrophication and plankton blooms (Activity H). MAP Technical Reports Series No. 37. UNEP, Athens, 1990 (74 pages) (parts in English or French only).
38. UNEP: Common measures adopted by the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against pollution. MAP Technical Reports Series No. 38. UNEP, Athens, 1990 (100 pages) (English, French, Spanish and Arabic).
39. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by organohalogen compounds. MAP Technical Reports Series No. 39. UNEP, Athens, 1990 (224 pages) (English and French).

40. UNEP/FAO: Final reports on research projects (Activities H,I and J). MAP Technical Reports Series No. 40. UNEP, Athens, 1990 (125 pages) (English and French).
41. UNEP. Wastewater reuse for irrigation in the Mediterranean region. MAP Technical Reports Series No. 41. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1990 (330 pages) (English and French).
42. UNEP/IUCN: Report on the status of Mediterranean marine turtles. MAP Technical Reports Series No. 42. UNEP, Athens, 1990 (204 pages) (English and French).
43. UNEP/IUCN/GIS Posidonia: Red Book "Gérard Vulgnier", marine plants, populations and landscapes threatened in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 43. UNEP, Athens, 1990 (250 pages) (French only)
44. UNEP: Bibliography on aquatic pollution by organophosphorus compounds. MAP Technical Reports Series No. 44. UNEP, Athens, 1990 (98 pages) (English only).
45. UNEP/IAEA: Transport of pollutants by sedimentation: Collected papers from the first Mediterranean Workshop (Villefranche-sur-Mer, France, 10-12 December 1987). MAP Technical Reports Series No. 45. UNEP, Athens, 1990 (302 pages) (English only).
46. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and rotavirus-induced gastroenteritis among bathers (1986-88). MAP Technical Reports Series No.46, UNEP, Athens, 1991 (64 pages) (English only).
47. UNEP: Jellyfish blooms in the Mediterranean. Proceedings of the II Workshop on Jellyfish in the Mediterranean Sea. MAP Technical Reports Series No.47. UNEP, Athens, 1991 (320 pages) (parts in English or French only).
48. UNEP/FAO: Final reports on research projects (Activity G). MAP Technical Reports Series No. 48. UNEP, Athens, 1991 (126 pages) (parts in English or French only).

PUBLICATIONS "MAP TECHNICAL REPORTS SERIES"

1. PNUE/COI/OMM: Etudes de base et surveillance continue du pétrole et des hydrocarbures contenus dans les eaux de la mer (MED POL I). MAP Technical Reports Series No. 1. UNEP, Athens, 1986 (96 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
2. PNUE/FAO: Etudes de base et surveillance continue des métaux, notamment du mercure et du cadmium, dans les organismes marins (MED POL II). MAP Technical Reports Series No. 2. UNEP, Athens, 1986 (220 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
3. PNUE/FAO: Etudes de base et surveillance continue du DDT, des PCB et des autres hydrocarbures chlorés contenus dans les organismes marins (MED POL III). MAP Technical Reports Series No. 3. UNEP, Athens, 1986 (128 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
4. PNUE/FAO: Recherche sur les effets des polluants sur les organismes marins et leurs peuplements (MED POL IV). MAP Technical Reports Series No. 4. UNEP, Athens, 1986 (118 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
5. PNUE/FAO: Recherche sur les effets des polluants sur les communautés et écosystèmes marins (MED POL V). MAP Technical Reports Series No. 5. UNEP, Athens, 1986 (146 pages) (parties en anglais ou français seulement).
6. PNUE/COI: Problèmes du transfert des polluants le long des côtes (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens, 1986 (100 pages) (anglais seulement).
7. PNUE/OMS: Contrôle de la qualité des eaux côtières (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens, 1986 (426 pages) (parties en anglais ou français seulement).
8. PNUE/AIEA/COI: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED POL VIII). MAP Technical Reports Series No. 8. UNEP, Athens, 1986 (42 pages) (parties en anglais ou français seulement).
8. Add. PNUE: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED POL VIII). Addendum, Croisière Océanographique de la Grèce 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens, 1986 (66 pages) (anglais seulement).
9. PNUE. Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée (MED POL -PHASE I). Rapport final, 1975-1980. MAP Technical Reports Series No. 9. UNEP, Athens, 1986 (276 pages) (anglais seulement).
10. PNUE: Recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la cancérogénicité et la mutagénicité de certaines substances (Activité G). Rapports finaux sur les projets ayant trait à la toxicité (1983-85). MAP Technical Reports Series No. 10. UNEP, Athens, 1987 (118 pages) (anglais seulement).
11. PNUE: Réhabilitation et reconstruction des établissements historiques méditerranéens. Textes rédigés au cours de la première phase de l'action prioritaire (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 11. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1986 (158 pages) (parties en anglais ou français seulement).

12. PNUE: Développement des ressources en eau des petites îles et des zones côtières isolées méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la première phase de l'action prioritaire (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 12. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parties en anglais ou français seulement).
13. PNUE: Thèmes spécifiques concernant le développement des ressources en eau des grandes îles méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la deuxième phase de l'action prioritaire (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 13. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parties en anglais ou français seulement).
14. PNUE. L'expérience des villes historiques de la Méditerranée dans le processus intégré de réhabilitation du patrimoine urbain et architectural. Documents établis lors de la seconde phase de l'Action prioritaire (1986). MAP Technical Reports Series No. 14. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (500 pages) (parties en anglais ou français seulement).
15. PNUE: Aspects environnementaux du développement de l'aquaculture dans la région méditerranéenne. Documents établis pendant la période 1985-1987. MAP Technical Reports Series No. 15. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (101 pages) (anglais seulement).
16. PNUE: Promotion de la protection des sols comme élément essentiel de la protection de l'environnement dans les zones côtières méditerranéennes. Documents sélectionnés (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 16. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (424 pages) (parties en anglais ou français seulement).
17. PNUE: Réduction des risques sismiques dans la région méditerranéenne. Documents et études sélectionnés (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 17. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (247 pages) (parties en anglais ou français seulement).
18. PNUE/FAO/OMS. Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le mercure et les composés mercuriels. MAP Technical Reports Series No. 18. UNEP, Athens, 1987 (354 pages) (anglais et français).
19. PNUE/COI: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les hydrocarbures de pétrole. MAP Technical Reports Series No. 19. UNEP, Athens, 1988 (130 pages) (anglais et français).
20. PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur le projet sur la relation entre la qualité microbienne des eaux marines côtières et les effets sur la santé (1983-86). MAP Technical Reports Series No. 20. UNEP, Athens, 1988 (156 pages) (anglais seulement).
21. PNUE/UNESCO/FAO: Eutrophisation dans la mer Méditerranée: capacité réceptrice et surveillance continue des effets à long terme. MAP Technical Reports Series No. 21. UNEP, Athens, 1988 (200 pages) (parties en anglais ou français seulement).
22. PNUE/FAO: Etude des modifications de l'écosystème dans les zones soumises à l'influence des polluants (Activité I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988 (146 pages) (parties en anglais ou français seulement).

23. PNUE: Programme national de surveillance continue pour la Yougoslavie, Rapport pour 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988 (223 pages) (anglais seulement).
24. PNUE/FAO: Toxicité, persistance et bioaccumulation de certaines substances vis-à-vis des organismes marins (Activité G). MAP Technical Reports Series No. 24. UNEP, Athens, 1988 (122 pages) (parties en anglais ou français seulement).
25. PNUE: Le Plan d'action pour la Méditerranée, perspective fonctionnelle; une recherche juridique et politique. MAP Technical Reports Series No. 25. UNEP, Athens, 1988 (105 pages) (anglais seulement).
26. PNUE/UICN: Répertoire des aires marines et côtières protégées de la Méditerranée. Première partie - Sites d'importance biologique et écologique. MAP Technical Reports Series No. 26. UNEP, Athens, 1989 (196 pages) (anglais seulement).
27. PNUE: Implications des modifications climatiques prévues dans la région méditerranéenne: une vue d'ensemble. MAP Technical Reports Series No. 27. UNEP, Athens, 1989 (52 pages) (anglais seulement).
28. PNUE: Etat du milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 28. UNEP, Athens, 1989 (225 pages) (anglais seulement).
29. PNUE: Bibliographie sur les effets des modifications climatiques et sujets connexes. MAP Technical Reports Series No. 29. UNEP, Athens, 1989 (143 pages) (anglais seulement).
30. PNUE: Données météorologiques et climatologiques provenant de mesures effectuées dans l'air en surface et en altitude en vue de l'évaluation du transfert et du dépôt atmosphériques des polluants dans le bassin méditerranéen: un compte rendu. MAP Technical Reports Series No. 30. UNEP, Athens, 1989 (137 pages) (anglais seulement).
31. PNUE/OMM: Pollution par voie atmosphérique de la mer Méditerranée. Rapport et actes des Journées d'étude OMM/PNUE. MAP Technical Reports Series No. 31. UNEP, Athens, 1989 (247 pages) (parties en anglais ou français seulement).
32. PNUE/FAO: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K). MAP Technical Reports Series No. 32. UNEP, Athens, 1989 (139 pages) (parties en anglais ou français seulement).
33. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation des composés organostanniques en tant que polluants du milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 33. UNEP, Athens, 1989 (185 pages) (anglais et français).
34. PNUE/FAO/OMS: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le cadmium et les composés de cadmium. MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989 (175 pages) (anglais et français).
35. PNUE: Bibliographie sur la pollution marine par les composés organostanniques. MAP Technical Reports Series No. 35. UNEP, Athens, 1989 (92 pages) (anglais seulement).
36. PNUE/UICN: Répertoire des aires marines et côtières protégées de la Méditerranée. Première partie - Sites d'importance biologique et écologique. MAP Technical Reports Series No. 36. UNEP, Athens, 1990 (198 pages) (français seulement).
37. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche consacrés à l'eutrophisation et aux efflorescences de plancton (Activité H). MAP Technical Reports Series No. 37. UNEP, Athens, 1990 (74 pages) (parties en anglais ou français seulement).

38. PNUE: Mesures communes adoptées par les Parties Contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution. MAP Technical Reports Series No. 38. UNEP, Athens, 1990 (100 pages) (anglais, français, espagnol et arabe).
39. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution par les composés organohalogénés. MAP Technical Reports Series No. 39. UNEP, Athens, 1990 (224 pages) (anglais et français).
40. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche (Activités H, I et J). MAP Technical Reports Series No. 40. UNEP, Athens, 1990 (125 pages) (anglais et français).
41. PNUE Réutilisation agricole des eaux usées dans la région méditerranéenne. MAP Technical Reports Series No. 41. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1990 (330 pages) (anglais et français).
42. PNUE/UICN: Rapport sur le statut des tortues marines de Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 42. UNEP, Athens, 1990 (204 pages) (anglais et français).
43. PNUE/UICN/GIS Posidonie: Livre rouge "Gérard Vuignier" des végétaux, peuplements et paysages marins menacés de Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 43. UNEP, Athens, 1990 (250 pages) (français seulement).
44. PNUE: Bibliographie sur la pollution aquatique par les composés organophosphorés. MAP Technical Reports Series No. 44. UNEP, Athens, 1990 (98 pages) (anglais seulement).
45. PNUE/AIEA: Transfert des polluants par sédimentation: Recueil des communications présentées aux premières journées d'études méditerranéennes (Villefranche-sur-Mer, France, 10-12 décembre 1987). MAP Technical Reports Series No. 45. UNEP, Athens, 1990 (302 pages) (anglais seulement).
46. PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur le projet sur la relation entre la qualité microbienne des eaux marines côtières et la gastroentérite provoquée par le rotavirus entre les baigneurs (1986-88). MAP Technical Reports Series No. 46. UNEP, Athens, 1991 (64 pages) (anglais seulement).
47. PNUE: Les proliférations de méduses en Méditerranée. Actes des 11èmes journées d'étude sur les méduses en mer Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 47. UNEP, Athens, 1991 (320 pages) (parties en anglais ou français seulement).
48. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche (Activité G). MAP Technical Reports Series No. 48. UNEP, Athens, 1991 (126 pages) (parties en anglais ou français seulement).

Issued and printed by:



Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme

Additional copies of this and other publications issued by
the Mediterranean Action Plan of UNEP can be obtained from:

Co-ordinating Unit for the Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
P.O. Box 18019
11610 Athens
GREECE

Publié et imprimé par:



Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l' Environnement

Des exemplaires de ce document ainsi que d' autres
publications du Plan d'action pour la Méditerranée
du PNUE peuvent être obtenus de:

Unité de coordination du Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l' Environnement
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
B.P. 18019
11610 Athènes
GRECE

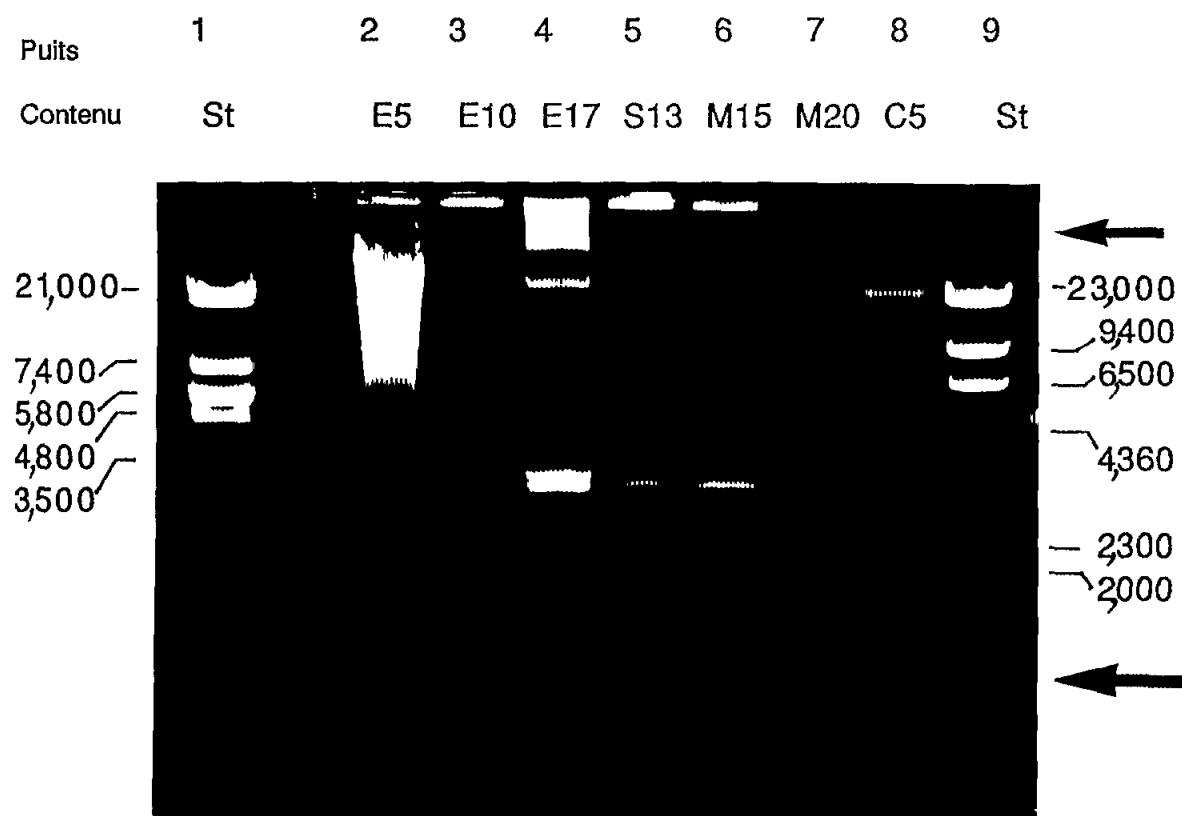


Fig. 4. Electrophorèse sur gel d'agarose de l'ADN plasmidique extrait des souches E5, E10, E17, S13, M15, M20 et C5. Les bandes correspondant aux plasmides sont présentes dans la zone comprise entre les deux flèches. Les puits 1 et 9 contiennent deux standards de calibration des poids moléculaires (valeurs indiquées, en kilobases)

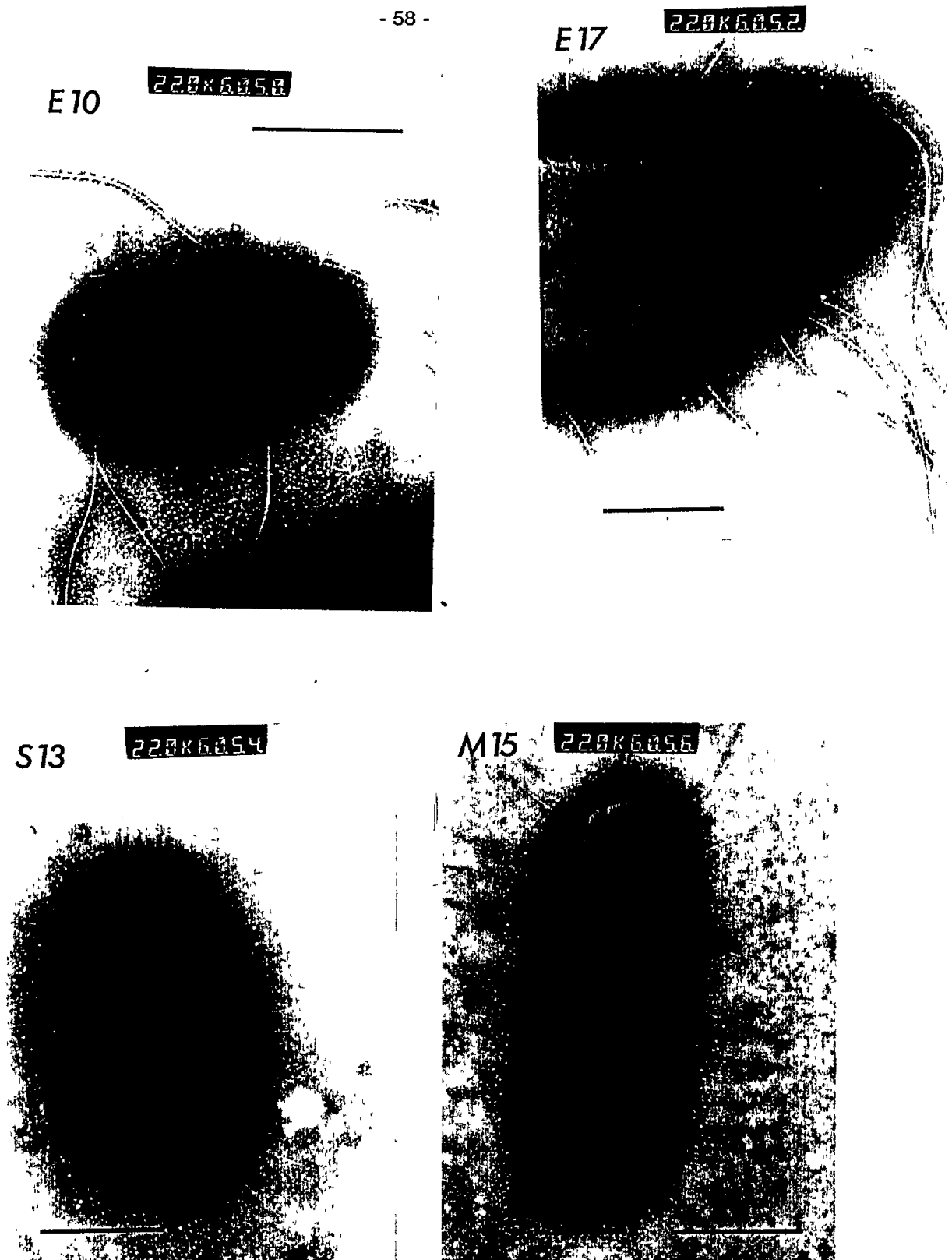


Fig. 3: Electronographies des souches d'*E. coli* E10 et E17 (eau usée), S13 (sédiments) et M15 (moules) après coloration négative par l'acide phosphotungstique. Les fimbriae CFAI (E10, E17 et S13; HAMR) et les piliis communs (M15; HAMS) apparaissent nettement à la périphérie des cellules. Les barres représentent 1 μ m