

Etude de la survie des bactéries de contamination fécale (coliformes fécaux) dans les eaux de la zone ostréicole de la lagune de Oualidia (Maroc)

Khadija CHEDAD & Omar ASSOBEI

Université Chouaib Doukkali, Faculté des Sciences, Département de Biologie, Laboratoire BIOMARE, B.P. 20
24000 El Jadida, Maroc. e-mail : chedadkhadija@yahoo.fr; assobhei1@yahoo.fr

Résumé. Une étude de l'effet des facteurs abiotiques et biotiques sur la survie des coliformes fécaux (CF) en eau de mer provenant de la lagune de Oualidia a été réalisée au laboratoire et *in situ*. Les facteurs abiotiques étudiés au laboratoire sont le rayonnement solaire, la température, la salinité et le pH. Les résultats mettent en relief l'importance de la lumière et de la salinité de l'eau dans l'inactivation des coliformes fécaux. Les valeurs du T₉₀ des CF exposés et non exposés à la lumière sont respectivement de 65 h et 85 h. Les pourcentages de dormance peuvent atteindre 98% à forte salinité. D'autre part, dans les conditions naturelles, des chambres de diffusion ont été utilisées pour évaluer l'effet des facteurs biotiques et abiotiques sur la survie des coliformes fécaux au niveau de la lagune. Les résultats obtenus montrent une réduction des effectifs bactériens plus importante que lors de l'étude menée au laboratoire. L'étude a montré que les antagonistes microbiens (protozoaires) ont un effet sur la survie des coliformes fécaux et que cette dernière augmente avec la profondeur. L'étude comparative des techniques de comptage utilisées montre que les facteurs abiotiques et biotiques ont un effet bactéricide ou bactériostatique, ce qui entraîne la transformation des bactéries à un état viable non cultivable leur permettant de conserver leur caractère pathogène.

Mots clés: Lagune de Oualidia, Maroc, coliformes fécaux, pollution.

Study of the survival of the bacteria of faecal contamination (faecal coliforms) in the waters of the oyster-growing area of the Oualidia lagoon (Morocco).

Abstract. A study of the effect of abiotic and biotic factors on the survival of faecal coliforms (FC) of the Oualidia lagoon seawater was carried out in laboratory and in the lagoon, which is an oyster growing area. The studied abiotic factors are sunlight, temperature, salinity and pH. The results show the importance of light and salinity in the inactivation of FC. In fact, the T₉₀ values of FC exposed and not exposed to light are respectively 65 h and 85 h, and at high salinity, the percentage of bacterial dormancy may reach 98%. On the other hand, under natural conditions, diffusion chambers were used to measure the effects of biotic and abiotic factors on the survival of FC in Oualidia lagoon. Generally, the obtained results show that the reduction of FC number is higher than in laboratory. Results of this study show that the microbial antagonists (protozoa) have an effect on the survival of FC. On the other hand, the depth preserves the survival of FC. The comparative study of the two techniques of counting shows that abiotic and biotic factors have a bactericidal and a bacteriostatic effect; as a consequence, the bacteria will conserve their pathogenic effect.

Key words: Oualidia lagoon, Morocco, faecal coliforms, pollution.

INTRODUCTION

Au Maroc, 60% des eaux usées des villes côtières sont rejetés dans la mer sans aucun traitement préalable (Fatta *et al.* 2004). Ces rejets en mer constituent une menace sur la santé humaine (baignade, activité nautique, pêche....) et animale (ressources marines exploitables).

La lagune de Oualidia, située sur la côte atlantique marocaine, et célèbre pour son importante activité touristique estivale et ses richesses conchylicoles, est soumise à une forte pollution par les eaux usées de l'agglomération du village et les eaux de ruissellement des zones agricoles avoisinantes. Ces dernières contiennent de nombreux organismes pathogènes, représentant une menace pour la santé humaine et l'écosystème marin (Lamghari Moubarrad & Assobhei 2005). L'estimation de la contamination se fait par le biais de bactéries indicatrices de pollution fécale et de germes pathogènes. Ces indicateurs bactériens sont les coliformes fécaux (CF) et les streptocoques fécaux (SF). Il a été montré que les caractéristiques du milieu récepteur peuvent affecter la survie de ces indicateurs (Statham & McMeekin 1994).

Cette lagune a fait l'objet de nombreux travaux portant sur la courantologie (Orbi *et al.* 1998, Hilmi *et al.* 2005), sur le phytoplancton (Bennouna *et al.* 2002), sur le

zooplancton (Ouldessaib *et al.* 1998), sur les populations bactériennes (Chedad & Assobhei 2005) ainsi que sur la qualité et la salubrité du milieu (Bouchriti *et al.* 1992, El Attar & Assobhei 2001). Cependant, aucune étude sur la survie des CF dans les écosystèmes lagunaires en zone semi-aride n'a été menée.

Dans le but d'estimer le risque de contamination fécale auquel sont exposés les usagers, nous avons entrepris une étude sur la survie des bactéries de contamination fécale (CF) véhiculées par les eaux usées et rejetées dans les eaux de la lagune.

MATERIEL ET METHODES

Description du site d'étude

La lagune de Oualidia est située sur la côte atlantique à 76 km au sud d'El Jadida et 67 km au nord de Safi (Fig. 1). Elle s'étale sur une longueur de 7 km et une largeur de 0,5 km, soit une superficie totale de 3,5 km². Le régime hydrologique de la lagune est lié au rythme des marées, et le renouvellement des eaux est assuré par l'apport d'eau de mer qui envahit la totalité de la lagune à marée haute (Orbi *et al.* 1995, Hilmi *et al.* 2005). Notre étude a été réalisée au niveau du Parc 7 de la lagune (Fig. 2) en raison de son activité conchylicole et de son accessibilité quelle que soit

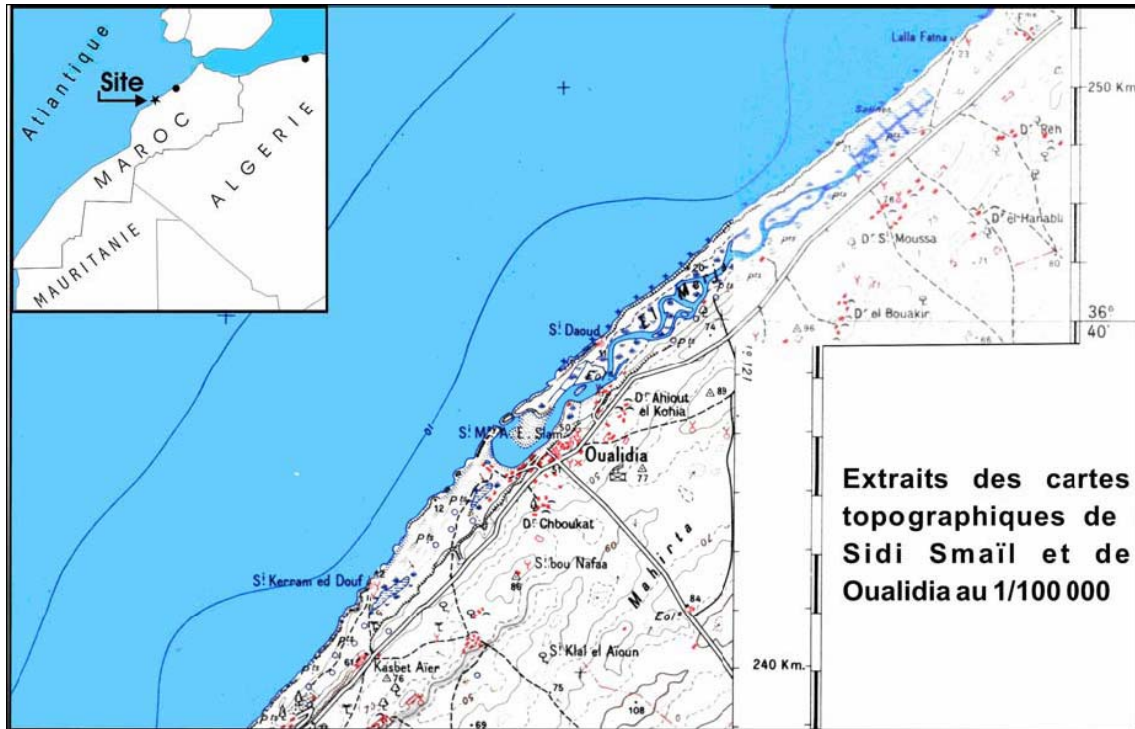


Figure 1. Localisation de la lagune de Oualidia.

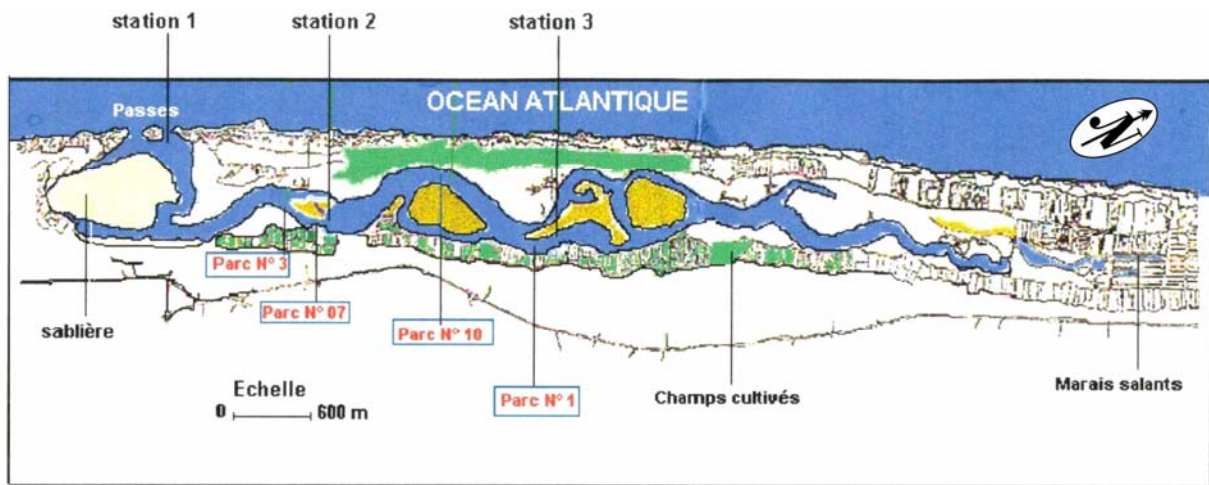


Figure 2. Localisation du site d'étude (Parc 7) au niveau de la lagune de Oualidia.

la marée. Cette étude a été réalisée durant deux campagnes : février 2006 et juin 2006.

Etude de l'effet des facteurs abiotiques sur la survie des CF

Les effets du rayonnement solaire, de la température, de la salinité et du pH sur la survie des CF ont été étudiés au laboratoire. Pour chaque expérience, les cristallisoirs sont remplis chacun de deux litres d'eau de mer filtrée sur membrane millipore (0,22 µm) et stérilisée par autoclavage. L'ensemencement a été effectué par une suspension de CF à une concentration de 10^8 UFC/ml.

Rayonnement solaire

Pour étudier l'effet du rayonnement solaire sur la survie des CF, deux cristallisoirs ont été utilisés : l'un est exposé aux radiations solaires devant une fenêtre; l'autre est protégé de la lumière par un tissu noir épais. L'expérience a été menée à pH 8 et à salinité 35‰. La température de l'eau des cristallisoirs au cours de l'incubation est de l'ordre de 20 °C.

Température

Une série de quatre cristallisoirs a été utilisée. A pH 8 et à salinité 35‰, les cristallisoirs sont incubés à l'obscurité à différentes températures (6 °C ; 20 °C ; 30 °C et 40 °C).

Salinité

Trois cristallisoirs ont été utilisés. Les différentes salinités utilisées sont 9‰, 35‰ et 70‰. La température ambiante au cours de l'expérience est de l'ordre de 21 °C. Les trois cristallisoirs sont protégés de la lumière par un tissu épais noir.

pH

Trois cristallisoirs ont été utilisés. Les pH utilisés sont 5 ; 7 et 8,5. Les trois cristallisoirs sont protégés de la lumière par un tissu épais noir. La température ambiante d'incubation est de l'ordre de 21 °C, la salinité est de 35‰.

Evaluation de l'effet des paramètres abiotiques sur la survie des bactéries

Les abondances bactériennes ont été suivies avec un pas de 24 heures pendant 10 jours par dénombrement direct en utilisant la technique du comptage direct par coloration à l'acridine orange (AO) (Rebillard & Torre 1993, Bensalah *et al.* 2004), et par dénombrement indirect après ensemencement sur des milieux de culture.

Les milieux de culture utilisés sont :

- Gélose lactosée au TTC et au tergitol 7 (GLT), milieu sélectif pour l'isolement et le dénombrement des CF (milieu préconisé par AFNOR).
- Tryptic soy agar (TSA) supplémenté par 3 g/l d'extrait de levure et par 0,5 g/l de glucose, milieu non sélectif à large spectre (Clesceri *et al.* 1989).

Les paramètres les plus courants pour caractériser les vitesses de disparition des bactéries fécales sont soit une constante de premier ordre (k exprimée soit en h^{-1} , soit en j^{-1}) ou le T_{90} , le temps nécessaire pour que 90 % de la population initiale ait disparu (Tab. I).

$$T_{90} = -t / \log (C / C_0)$$

C_0 et C sont respectivement les concentrations bactériennes initiale et à l'instant t mesurées en heures.

Les pourcentages de dormance des cellules bactériennes durant le temps t sont calculés par l'application de l'équation suivante :

Pourcentage des cellules en dormance = $1 - (\text{comptage sur milieu non sélectif au temps } t / \text{comptage par AO au temps } t) \times 100$.

Etude de l'effet des facteurs biotiques

Pour étudier l'effet des facteurs biotiques et abiotiques sur la survie des CF dans les conditions naturelles, nous avons utilisé des chambres de diffusion construites en plexiglas. Ces chambres sont sous forme d'un cube de 6 cm d'arête, percé au niveau de deux faces opposées sur un cercle de 4 cm de diamètre. Des filtres millipores stériles de 0,22 μm de porosité sont fixés au niveau des pores par deux plaques en plexiglas à l'aide de deux joints en carton. Les chambres possèdent une ouverture fermée par un bouchon qui permet la prise des échantillons à l'aide d'une seringue stérile. La stérilisation des chambres de diffusion est faite par UV à 360 nm.

Deux séries de chambres de diffusion ont été utilisées : l'une est remplie avec de l'eau de mer non stérile, prélevée *in situ* juste avant l'emplacement des chambres, pour étudier l'effet de la prédation par les protozoaires sur les CF ; l'autre est remplie avec de l'eau de mer filtrée et stérilisée par autoclavage préparée au laboratoire, afin d'annuler l'effet d'autres microorganismes.

Les chambres de diffusion sont ensemencées par une suspension bactérienne de CF à 10^8 UFC/ml et placées à des profondeurs de 0,2 m, 3 m et 6 m. L'évolution des effectifs bactériens dans les chambres de diffusion est suivie avec un pas de 4 heures pendant le premier jour, et de 12 heures après.

RESULTATS

Effet des facteurs abiotiques sur la survie des CF

Rayonnement solaire

L'évolution temporelle des abondances des CF dans l'eau de mer exposée et non exposée à la lumière est présentée dans les figures 3a et 3b. Les abondances bactériennes diminuent plus rapidement lors d'incubation en présence de la lumière visible qu'en obscurité. Les valeurs des T_{90} des CF exposés et non exposés à la lumière sont respectivement de 65 h et 85 h (Tab. I).

Les résultats de l'évolution des abondances bactériennes déterminées par comptage direct à l'acridine orange (Fig. 3c) montrent que la lumière ne provoque pas une diminution notable des effectifs bactériens. En effet, la réduction des effectifs bactériens est très faible aussi bien dans le cristallisoir exposé à la lumière solaire que dans celui protégé contre les radiations solaires. Les pourcentages de dormance des CF exposés et non exposés à la lumière après 72 h d'exposition à la lumière solaire sont respectivement de 85% et 49%.

Température

Les résultats de l'évolution des abondances des CF dans l'eau de mer incubée à différentes températures (Figs. 4a et 4b) montrent qu'aux températures 6 °C, 20 °C, 30 °C et 40 °C, les valeurs des T_{90} des CF sont respectivement de 125 h, 75 h, 60 h et 55 h. La température 40 °C a donc le plus d'effet sur la valeur du T_{90} des CF (Tab. I).

Le comptage direct par l'acridine orange (Fig. 4c) montre que le nombre de cellules viables reste relativement constant au cours de l'expérience. Les bactéries montrent généralement une légère diminution à 40 °C. Le pourcentage de dormance des cellules après 72 h d'exposition à 40 °C est de 89%.

Salinité

L'évolution temporelle des abondances des CF dans l'eau de mer ajustée à différentes salinités (9‰, 35‰ et 70‰) est illustrée sur les figures 5a et 5b. Dans les conditions du milieu d'incubation des bactéries (pH 8,3 en obscurité et à température ambiante), les courbes d'évolution des CF présentent en général les mêmes allures aux différentes salinités.

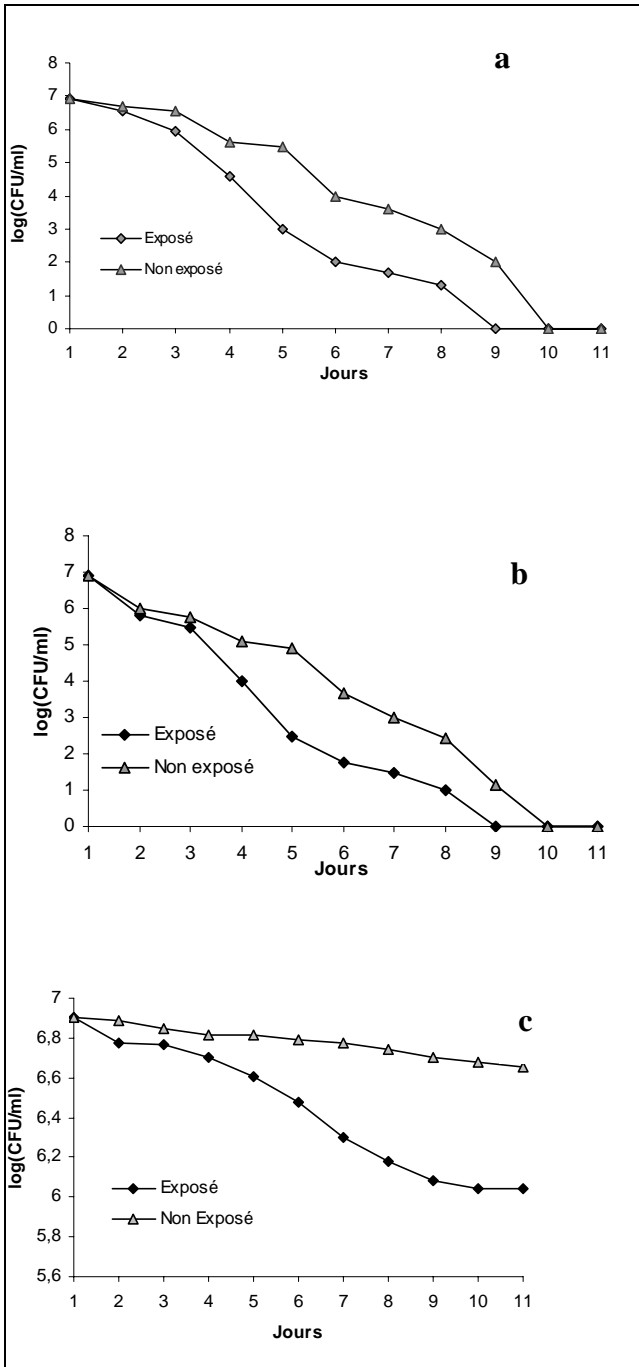


Figure 3. Abondance des CF dans l'eau de mer exposée et non exposée à la lumière. a, énumération sur milieu TSA ; b, énumération sur milieu GLT ; c, comptage direct.

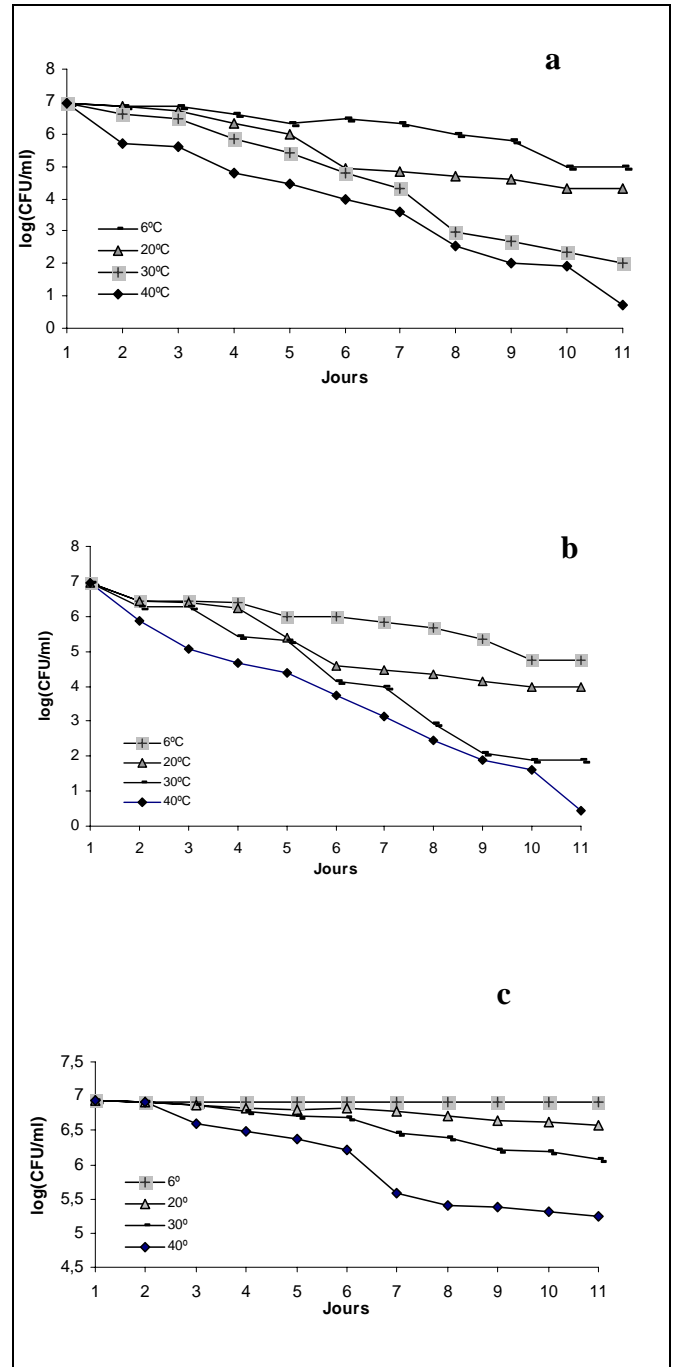


Figure 4. Abondance des CF dans l'eau de mer à différentes températures. a, énumération sur milieu TSA ; b, énumération sur milieu GLT ; c, comptage direct.

Tableau I. Valeurs des T_{90} des coliformes fécaux incubés dans les conditions du laboratoire.

Facteur	Lumière		Température			
	Exposé	Non exposé	6°C	20°C	30°C	40°C
T_{90}	65 h	85 h	125 h	75 h	60 h	55 h

Facteur	Salinité			pH		
	9‰	35‰	70‰	5	7	8
T_{90}	45 h	27 h	15 h	75 h	25 h	20 h

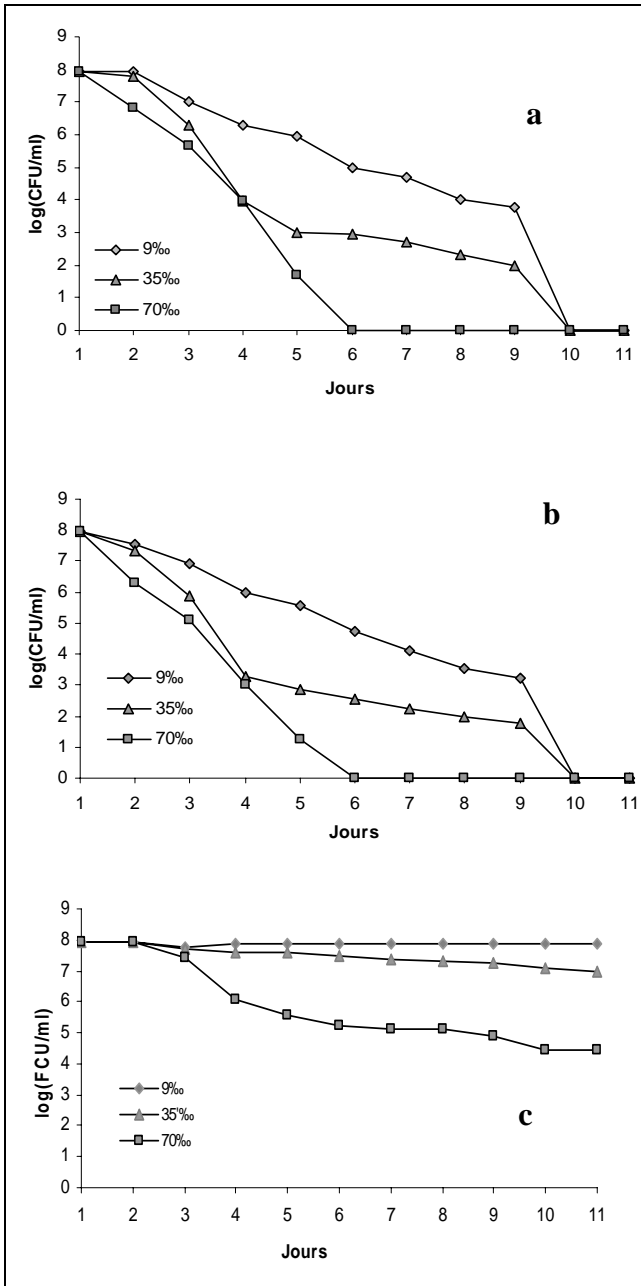


Figure 5. Abondance des CF dans l'eau de mer à différentes salinités. a, énumération sur milieu TSA ; b, énumération sur milieu GLT ; c, comptage direct.

Aux salinités élevées (70‰), les abondances bactériennes diminuent très rapidement. Aux salinités 9‰ et 70‰, les valeurs des T_{90} sont respectivement de 45 h et 15 h (Tab. I).

L'évolution de l'abondance des CF dénombrés par comptage direct (Fig. 5c) montre que le nombre de cellules viables reste relativement constant. Cependant, à la salinité 70‰, le nombre de cellules viables diminue plus rapidement qu'aux autres salinités étudiées. Dans ce cas le pourcentage de dormance après 72 h est de 98%.

pH

L'évolution de l'abondance des CF dans l'eau de mer stérile tamponnée à pH 5 ; 7 et 8,3 (Figs. 6, a-b) sont

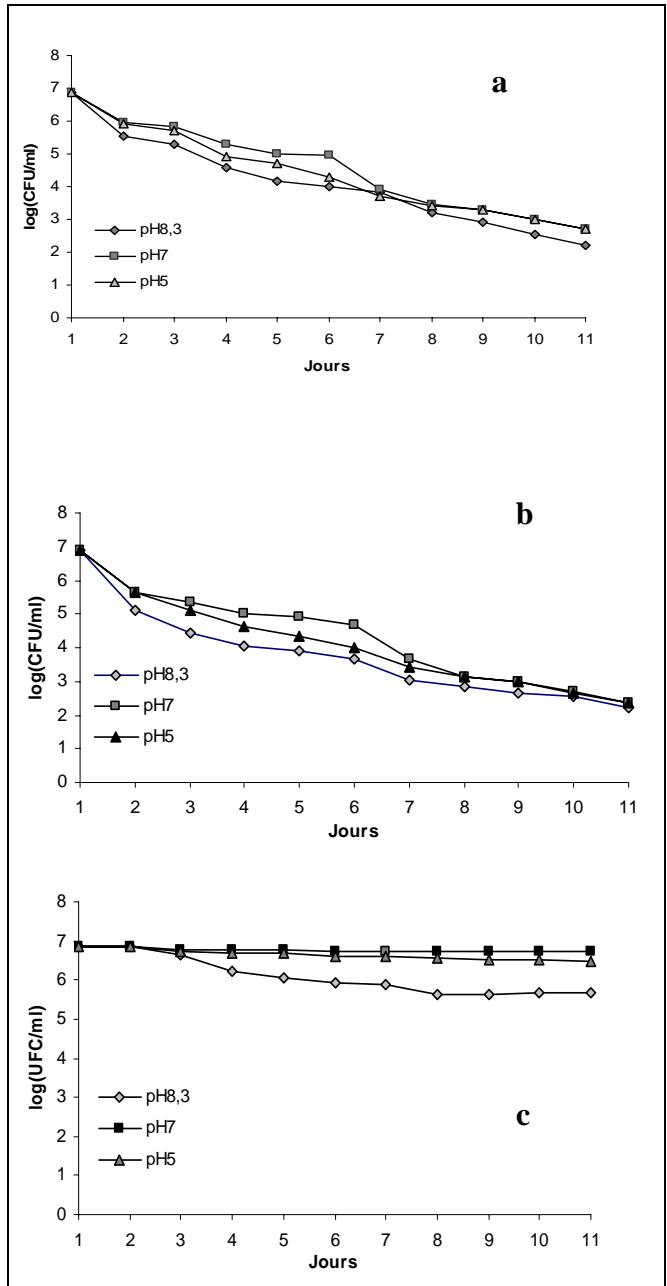


Figure 6. Abondance des CF dans l'eau de mer à différents pH. a, énumération sur milieu TSA ; b, énumération sur milieu GLT ; c, comptage direct.

variables en fonction du pH utilisé. Les résultats montrent qu'en général les pH basiques ont un effet létal sur les CF. En effet, les valeurs des T_{90} des CF aux pH 5 ; 7 et 8,3 sont respectivement de 75 h, 25 h et 20 h (Tab. I).

Les résultats de l'évolution des CF déterminée par comptage direct (Fig. 6c) montrent une légère diminution du nombre des CF surtout à pH basique. Le pourcentage de dormance des CF calculé après 72 h d'exposition à pH basique est de 95%.

Etude de la survie des CF dans les chambres de diffusion

Survie en eau de mer stérile

Les figures 7a et 7b résument l'évolution temporelle des abondances des CF incubés dans les chambres de diffusion

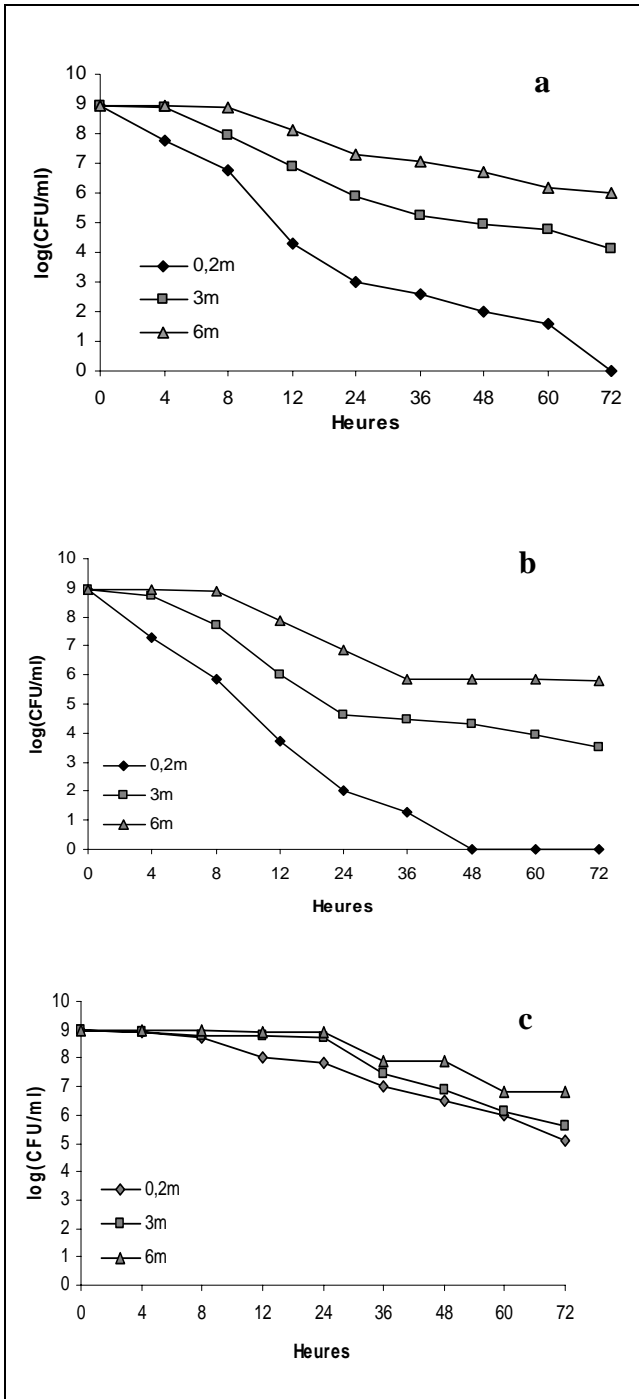


Figure 7. Abondance des CF dans les chambres de diffusion (eau de mer stérile). a, énumération sur milieu TSA ; b, énumération sur milieu GLT ; c, comptage direct.

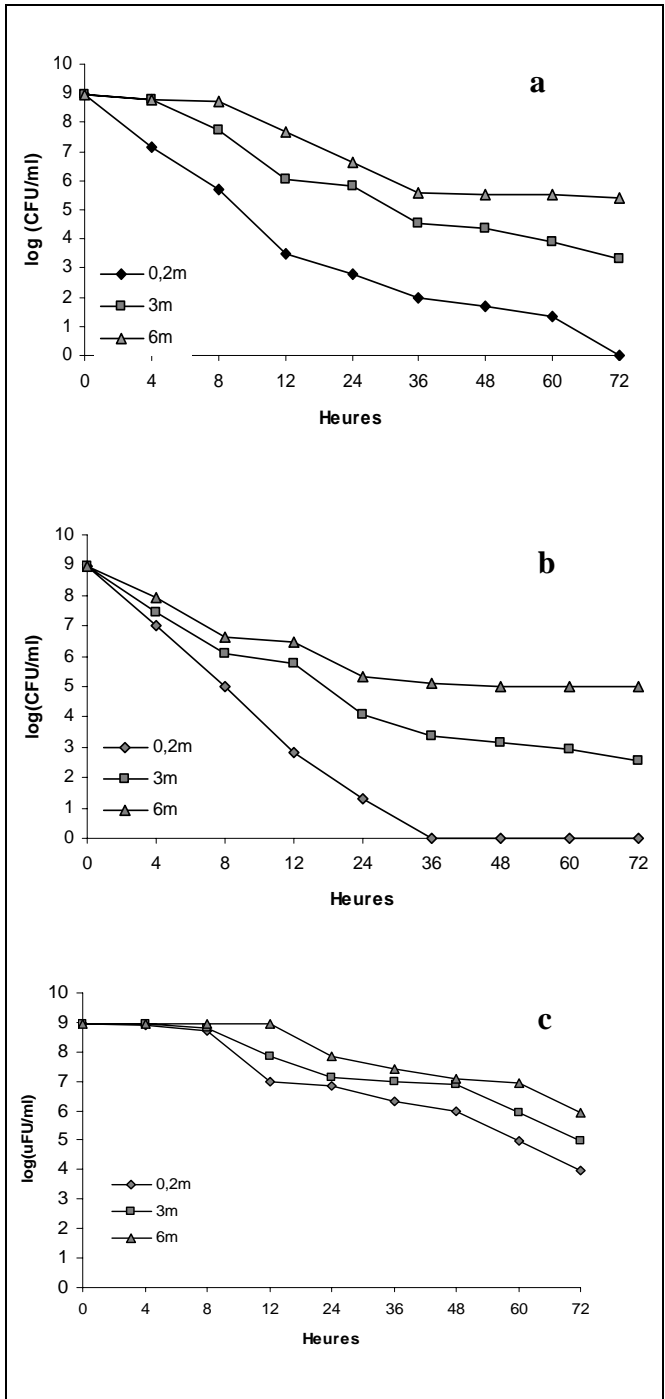


Figure 8. Abondance des CF dans les chambres de diffusion (eau de mer non stérile). a, énumération sur milieu TSA ; b, énumération sur milieu GLT ; c, comptage direct.

à différentes profondeurs et dénombrés par comptage indirect sur le milieu sélectif gélosé (GLT) et sur le milieu TSA.

Les résultats montrent qu'après 48 h et à 0,2 m de la surface, aucune cellule n'est détectable sur le milieu sélectif (GLT), alors que 100 UFC/ml ont été dénombrées sur le milieu TSA. A 3 m de profondeur, et après le même temps d'exposition, 2.10^3 UFC/ml ont pu être dénombrées sur le milieu sélectif (GLT) et 4.10^3 UFC/ml sur le milieu TSA. A la profondeur 6 m, 7.10^5 UFC/ml ont été dénombrées sur le milieu sélectif (GLT) et 5.10^6 UFC/ml sur le milieu TSA.

Ceci montre que les effectifs des CF ont été réduits après séjour en eau de mer et que leur survie augmente avec la profondeur. Le comptage direct (Fig. 7c) montre qu'après 48 h, l'effectif des CF restant est de 8.10^6 UFC/ml, 5.10^7 UFC/ml et 8.10^7 UFC/ml respectivement aux profondeurs 0,2 m, 3 m et 6 m. La majorité des cellules incubées en chambre de diffusion reste donc viable mais non cultivable sur les milieux de culture. Les pourcentages de dormance calculés après 24 h d'incubation en eau de mer sont de 98 % à 0,2 m de la surface, 86% à 3 m de profondeur et 10% à 6 m de profondeur.

Survie en eau de mer non stérile

Les résultats de l'évolution des abondances bactériennes des CF incubés dans l'eau de mer non stérile (Figs. 8a et b) montrent qu'après 36 h seulement d'exposition, et à 0,2 m de la surface, aucune cellule n'est détectable sur le milieu sélectif (GLT). Sur le milieu TSA et après le même temps d'exposition, 90 UFC/ml ont été dénombrées. A 3 m de profondeur et après le même temps d'exposition, 5.10^4 UFC/ml ont été dénombrées sur le milieu sélectif et 4.10^5 UFC/ml sur le milieu TSA. A 6 m, et après 36 h d'exposition, le nombre de cellules ayant été dénombré sur le milieu sélectif est de $1,3.10^5$ UFC/ml, alors que sur le milieu TSA, le nombre d'UFC/ml dénombré est de 10^6 .

Par comptage direct (Fig. 8c), l'effectif des CF restant après 36 h de séjour dans l'eau de mer non stérile en chambres de diffusion est de l'ordre de 2.10^6 , 10^7 et $2,5.10^7$ UFC/ml respectivement aux profondeurs: 0,2 m, 3 m et 6 m. Les pourcentages de dormance calculés après 24 h d'incubation en eau de mer sont de 99% à 0,2 m de la surface, 91% à 3 m de profondeur et 38% à 6 m de profondeur.

La comparaison entre les résultats de la survie des CF en eau de mer stérile et non stérile montre que l'effectif des CF diminue plus rapidement en eau de mer non stérile qu'en eau de mer stérile. Les cellules des CF sont altérées non pas seulement par les facteurs de stress abiotiques mais aussi par les prédateurs qui peuvent être contenus dans l'eau de mer non stérile.

DISCUSSION

L'étude de la survie des bactéries indicatrices de la pollution fécale a fait l'objet de nombreux travaux *in situ* et *in vitro*. Ces études ont montré l'effet prépondérant de la lumière et des conditions climatiques sur la survie des coliformes fécaux en mer (Arana *et al.* 1992, Martin *et al.* 1998, Sinton *et al.* 1999, Sinton *et al.* 2002, Noble *et al.* 2004, Richard *et al.* 2004). Cependant, les résultats sont très variables du fait que ces études n'ont pas été faites dans les mêmes conditions expérimentales. Jusqu'à présent, aucune étude sur la survie des CF dans les écosystèmes lagunaires en zone semi-aride n'a été menée.

La comparaison de l'évolution bactérienne des CF en présence et en absence de la lumière montre que dans l'eau de mer, ces bactéries sont très sensibles à la lumière solaire. En effet, en présence de la lumière, les T_{90} ont été réduits d'un peu plus que la moitié, alors que les pourcentages des cellules en dormance sont beaucoup plus importants. Ces résultats concordent avec ceux d'autres travaux qui ont montré que la lumière solaire joue un rôle important dans l'élimination des bactéries de pollution fécale en eau de mer (Davies *et al.* 1991, Sinton *et al.* 1994, Martin *et al.* 1998, Noble *et al.* 2004, Richard *et al.* 2004). Ceci peut être expliqué par l'effet bactéricide de la fraction UV des radiations solaires sur la cellule, en induisant des dommages par libération des ions peroxyde qui agissent sur la cellule en la rendant perméable aux sels inorganiques, ce qui fait varier alors sa pression osmotique (Curtis *et al.* 1992). Nous avons également montré que les basses températures (6 °C) favorisent la survie des CF dans l'eau de mer. En effet, à basse température, la bactérie limite ses

dépenses énergétiques par diminution de son activité métabolique, ce qui lui permet de survivre beaucoup plus de temps qu'aux températures élevées. Ce résultat rejoint ceux de nombreux auteurs qui ont montré que les basses températures prolongent la survie des coliformes fécaux (Smith *et al.* 1994, Kevin & Hughes 2003, Noble *et al.* 2004). Les résultats montrent aussi que la température 40 °C a plus d'effet sur la survie des CF que les autres températures. Ainsi, la valeur du T_{90} est la plus basse et les pourcentages des cellules en dormance sont les plus importants.

La salinité est aussi un facteur de stress très important que subissent les bactéries de pollution fécale en arrivant au milieu marin (Kevin & Hughes 2003), où la bactérie doit rétablir l'équilibre osmotique entre le milieu extérieur et son cytoplasme. Ce rétablissement met en jeu des mécanismes complexes qui font appel à l'augmentation de la concentration de certains solutés (osmo-régulateurs) dans la bactérie. Nos résultats ont montré l'effet néfaste de l'augmentation de la salinité sur la survie des CF; ainsi, à la salinité 70‰, le T_{90} n'est que de 15 h, alors que le pourcentage de dormance des cellules bactériennes peut atteindre 98%. Cet effet peut être expliqué par le fait qu'on a incubé les bactéries dans une eau de mer filtrée et stérilisée par autoclavage et par conséquent, pauvre en matière en suspension. Ce résultat rejoint ceux d'autres travaux qui ont montré que les fortes salinités font diminuer le taux des coliformes fécaux dans l'eau (Bordalo *et al.* 2002).

La survie des CF a aussi été influencée par le pH du milieu d'incubation. En effet, les pH basiques entraînent une nette diminution de la survie des CF : la valeur du T_{90} est la plus basse et les pourcentages des cellules en dormance sont les plus importants. Ce résultat concorde avec nombreux autres travaux qui ont montré que l'augmentation du pH affecte l'abondance des CF (Mayo 1995).

A partir des résultats obtenus au cours des expériences menées au laboratoire sur les effets des facteurs abiotiques pris individuellement sur la survie des CF, on peut conclure que la lumière et la salinité ont le plus d'effet sur la survie de ces bactéries. Le comptage direct par la méthode d'acridine orange montre qu'au cours des expériences menées au laboratoire, les effectifs bactériens restent relativement constants alors que les pourcentages des cellules en dormance varient. Ceci nous mène à déduire que les facteurs de stress étudiés n'entraînent pas la mort des cellules mais seulement leur altération (dormance). Ainsi, les cellules restent viables sous l'effet du stress mais perdent leur aptitude à former des colonies sur les milieux de culture classiques.

Dans les conditions naturelles, les résultats montrent une réduction des effectifs des CF beaucoup plus importante que lors de l'étude menée au laboratoire. En effet, dans les conditions naturelles, ces bactéries subissent un stress combiné de tous les paramètres environnementaux entraînant ainsi une réduction des effectifs bactériens plus marquée que lors de l'étude réalisée au laboratoire. Ainsi, les pourcentages de dormance peuvent parfois atteindre jusqu'à 99% (après 24 h d'exposition à 0,2 m de la surface

dans l'eau de mer non stérile). Les résultats montrent aussi que l'effectif des CF diminue plus rapidement dans l'eau de mer non stérile que dans l'eau de mer stérile. Cette différence entre le milieu stérile et non stérile suggère que les CF sont affectés non pas seulement par les facteurs de stress abiotiques mais aussi par des facteurs biotiques. En effet, l'eau de mer non stérile peut contenir des antagonistes microbiens (protozoaires) qui sont capables de consommer les bactéries faisant ainsi diminuer leur taux dans l'eau de mer (Barcina *et al.* 1991, Gonzalez *et al.* 1992, Rosena & Belkina 2001).

Les résultats obtenus pour les profondeurs 0,2 m ; 3 m et 6 m indiquent logiquement une augmentation de la durée de survie avec la profondeur. En effet, les valeurs des T₉₀ augmentent alors que les pourcentages des cellules en dormance diminuent avec la profondeur. Un résultat similaire a été rapporté par Martin *et al.* (1998). Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'effet létal de la lumière sur les bactéries s'atténue avec la profondeur ce qui engendre une augmentation de la survie.

Enfin, il est nécessaire d'évoquer le problème posé par l'utilisation des milieux de culture classiques dans la détermination des effectifs bactériens. En effet, les pourcentages de dormance sont variables en fonction du milieu de culture utilisé. De même, l'effectif des bactéries dénombrées par comptage direct est beaucoup plus élevé que celui déterminé par comptage indirect sur les milieux de culture classiques. Ces bactéries présentant une certaine activité mais incapables de se multiplier en culture sont intitulées « Bactéries Viables mais Non Cultivables ». Cet état VBNC a été mis en évidence pour des bactéries autochtones du milieu aquatique mais aussi pour diverses bactéries entériques dans le milieu aquatique (Grimes & Colwell 1986, Roszak & Colwell 1987). En effet, une fois rejetées dans le milieu naturel, ces bactéries se trouvent confrontées à des conditions défavorables telles que la lumière, la limitation en nutriments, le stress osmotique, de faibles températures et des variations de pH ainsi que face à de multiples prédateurs. Une partie de ces bactéries peut survivre à ces conditions défavorables en entrant dans l'état VBNC (Trousselier *et al.* 1998, Rozen & Belkina 2001, Oliver 2005) et perd assez rapidement sa faculté de croître dans ou sur les milieux spécifiques utilisés pour leur

dénombrement mais conserve beaucoup plus longtemps certaines activités métaboliques (Barcina *et al.* 1989, Lleo *et al.* 2005). Ces bactéries actives mais non cultivables pourraient conserver leur caractère pathogène (Rozen & Belkin. 2001, Pruzzo *et al.* 2002, Maalej *et al.* 2004). Si ces bactéries entériques VBNC présentes dans l'eau de mer lagunaire sont effectivement capables de « ressusciter » de ce stade « dormant » et de se reproduire, le risque sanitaire au quel sont exposés les usagers de cet écosystème serait alors systématiquement sous-estimé par les méthodes de dénombrement par mise en culture.

Ceci impose la nécessité de continuer les recherches de nouvelles techniques d'identification de ces formes viables non cultivables car leur activité pathogène pour l'homme s'en trouve vraisemblablement modifiée.

CONCLUSION

La présente étude a permis de mettre en relief l'importance de la lumière et de la salinité dans la perte de viabilité des CF. L'effet létal de la lumière sur ces bactéries induit une augmentation de leur survie avec la profondeur. La prédation par les protozoaires joue aussi un rôle important dans l'élimination de ces bactéries.

Cette étude montre aussi clairement que la survie des CF diminue, mais leur disparition rapide est loin d'être totale. Les techniques classiques de comptage de ces bactéries ne permettent pas d'évaluer correctement leur effectif et donc le risque auquel sont exposés les usagers de cet écosystème d'où l'intérêt croissant pour le développement de nouvelles méthodes de dénombrement spécifiques capables de détecter les bactéries fécales dans l'état VBNC dans les eaux marines.

Remerciements

Ce travail, réalisé dans le cadre de la préparation de la thèse d'Etat, a été financé par la coopération franco-marocaine spécifique au réseau REMER (Réseau national des sciences et techniques de la mer) que nous tenons à remercier vivement. Nous remercions également les évaluateurs pour leurs remarques et commentaires qui ont permis d'améliorer le manuscrit initial.

Références

- Arana I., Muela A., Ribera J., Egea L. & Barcina I. 1992. Role of hydrogen peroxide in loss of culturability mediated by visible light in *Escherichia coli* in a freshwater ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 12, 3903-3907.
- Barcina I., Gonzalez J.M., Iriberry J. & Egea L. 1989. Effect of visible-light on progressive dormancy of *Escherichia-coli*-cells during the survival process in natural fresh-water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55, 1, 246-251.
- Barcina I.O., González J.M., Iriberry J. & Egea L. 1991. Role of protozoa in the regulation of enteric bacteria populations in seawater. *Mar. Microb. Food*, 5, 179-187.
- Bennouna A., Assobhei O., Berland B & El Attar J. 2000. Study of phytoplankton populations of Oualidia lagoon (Morocco); potentially harmful dinoflagellates. *Mar. Life*, 10, 1-2, 3-18.
- Bennouna A., Berland B., El Attar J. & Assobhei O. 2002. *Lingulodinium polyedrum* (Stein) Dodge red tide in shellfish areas along Doukkala coast (Moroccan Atlantic). *Oceanol. Acta*, 25, 159-170.
- Bensalah M., Prensier G., Senaud J., Jouany J.P. & Bohatier J. 2004. Mise au point de deux techniques de dénombrements des bactéries du rumen: coloration à l'Acridine Orange et immunofluorescence indirecte. *Rev. Méd. Vét.*, 155, 4, 205-211.
- Bordalo A.A., Onrassami R. & Dechsakulwatana C. 2002. Survival of faecal indicator bacteria in tropical estuarine waters (Bangpakon River, Thailand). *J. Appl. Microbiol.*, 93, 5, 864-871.
- Bouchriti N., El Marrakchi A. & Fahim A. 1992. The microbiological contamination of an oyster growing area in Morocco, the Oualidia lagoon. *Hydroécol. Appl.*, 4, 12, 189-202.
- Clesceri L.S., Greenberg A.E., Trussell R.R. 1989. Standard Methods for the examination of water and wastewater.

- American Public Health Association. American Water Works Association, Water Pollution Control Federation, pp. 9, 54 – 153.
- Chedad Kh. & Assobhei O. 2005. Etude des populations bactériennes de la lagune de Oualidia (Maroc). *Reviews in Biology and Biotechnology*, 4, 2, 33-42.
- Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J., Roszak D.B., Huq S.A & Palmier L.M. 1985. Viable but non culturable *Vibrio Cholerae* and related pathogens in the environment. Implication for release of genetically engineered microorganisms *Biotechnology*, 3817-82.
- Curtis T.P., Mara D.D & Silva S.A. 1992. Influence of pH, oxygen, and humic substances on ability of sunlight to damage FC in waste stabilization pond water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 4, 1335-1343.
- Davies C.M & Evison L.M. 1991. Sunlight and the survival of enteric bacteria in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 3, 265-274.
- Davies C.M., Bell R.G. & Donnison A.M. 1994. Sunlight inactivation of *enterococci* and fecal coliforms within sewage effluent diluted in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 6, 2049-2058.
- El Attar J. & Assobhei O. 2001. Study of faecal pollution in Moroccan oyster growing area Oualidia lagoon. *Mar. Life*, 11, 1-2, 39-47.
- Fatta D., Salem Z., Mountadar M., Assobhei O & Loizidou M. 2004. Urban wastewater treatment and reclamation for agricultural irrigation: the situation in Morocco and Palestine. *The Environmentalist*, 24, 4, 227-236.
- González J.M., Iriberrí J., Egea L & Barcina I. 1992. Characterization of culturability, protistan grazing, and death of enteric bacteria in aquatic ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3, 998-1004.
- Grimes D.J. & Colwell R.R. 1986. Viability and virulence of *Escherichia coli* suspended by membrane chamber in semitropical ocean water. *FMS. Mic.*, 34, 2, 161-165.
- Grimes D.J., Atwell R.W., Brayton P.R., Palmer L.M., Rollins D.M., Roszak D.B., Singleton F.L., Tamplin M.L & Colwell R.R. 1986. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiol. Sci.*, 3, 11, 324-329.
- Hilmi K., Orbi A., Lakhdar J.I & Sarf F. 2005. Etude courantologique de la lagune de Oualidia (Maroc) en automne. *Bull. Inst. Sci.*, sect. Sci. Vie, 26-27, 67-71.
- Hughes K.A. 2003. Influence of seasonal environmental variables on the distribution of presumptive fecal coliforms around an antarctic research station. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 4884-4891.
- Lamghari Moubarrad F.Z. & Assobhei O. 2005 a. Impact of urban effluents on intestinal helminth infections in the wastewater discharge zone of the city of El Jadida, Morocco. *Manag. Environ. Quality*, 16, 1, 6-16.
- Lamghari Moubarrad F.Z. & Assobhei O. 2005 b. The health effects of wastewater on the prevalence of ascariasis among the children of the discharge zone of El Jadida, Morocco. *Intern. J. Environ. Health Res.*, 15, 2, 135-142.
- Lleo M.M., Bonato B., Tafi M.C., Signoretto C., Pruzzo C & Canepari P. 2005. Molecular vs culture methods for the detection of bacterial faecal indicators in groundwater for human use. *Lett. App. Microbiol.*, 40, 4, 289-294.
- Maalej S., Gdoura R., Dukan S., Hammami A. & Bouain A. 2004. Maintenance of pathogenicity during entry into and resuscitation from viable but nonculturable state in *Aeromonas hydrophila* exposed to natural seawater at low temperature. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 3, 557-565.
- Martin Y., Troussellier M & Bonnefont J.L. 1998. Adaptive responses of *E. coli* to marine environmental stresses: a modelling approach based on viability and dormancy concepts. *Oceanol. Acta*, 21, 6, 951-964.
- Mayo A.W. 1995. Modeling coliform mortality in waste stabilization ponds. *J. Environ. Engineer.*, 121, 2, 140-152.
- Noble R.T., Lee I & Mand Schif K.C. 2004. Inactivation of indicator micro-organisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater. *J. Appl. Microbiol.*, 96, 3, 464-72.
- Orbi A., Zizah S, Larissi J & Hilmi K. 1998. Principales caractéristiques des paramètres océanographiques de la côte atlantique marocaine de 1993 à 1998. *Trav. Doc*, 90, INRH, 120 p.
- Ouldessaib E.T., El Khalki A. & Moncef M. 1998. Etude qualitative et quantitative du peuplement de copépodes de la lagune de Oualidia (côtes atlantiques du Maroc). *Mar. Life*, 8, 1-2, 29-37.
- Pruzzo C., Tarsi R., Lleo M.D., Signoretto C., Zampini M., Colwell R.R. & Canepari P. 2002. In vitro adhesion to human cells by viable but nonculturable *Enterococcus faecalis*. *Cur. Microbiol.*, 45, 2, 105-110.
- Oliver J.D. 2005. The viable but nonculturable state in bacteria. *J. Microbiol.*, 43, 93-100.
- Rebillard J.P. & Torre M. 1993. Numération bactérienne en épifluorescence par la méthode couplée DAPI-INT: application à un cas concret. *Rev. Sc. Eau*, 6, 153-174.
- Richard L., Whitman B., Meredith N., Ginger C., Muruleedhara K & Byappanahalli N. 2004. Solar and temporal effects on *Escherichia coli* Concentration at a Lake Michigan swimming beach. *Appl. Environ. Microbiol.*, 70, 7, 4276-4285.
- Rosena Y & Belkina S. 2001. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25, 5, 513-529.
- Roszak D.B. & Colwell R.R. 1987. Metabolic-activity of bacterial-cells enumerated by direct viable count. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 12, 2889-2983.
- Sinton L.W., Davies-Colley R.J. & Bell R.G. 1994. Inactivation of *enterococci* and fecal coliforms from sewage and meatworks effluents in seawater chambers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 6, 2040-2048.
- Sinton L.W., Finlay R.K & Lynch P.A. 1999. Sunlight Inactivation of fecal bacteriophages and bacteria in sewage-polluted seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 8, 3605-3613.
- Sinton L.W., Hall C.H., Lynch P.A & Davis-Colley R.J. 2002. Sunlight inactivation of fecal indicator bacteria and bacteriophages from waste stabilization pond effluent in fresh and saline waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68, 3, 1122-1131.
- Smith J.J., Howington J.P & McFeters G.A. 1994. Survival, physiological response and recovery of enteric bacteria exposed to a polar marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 8, 2977-2984.
- Statham J.A. & McMeekin T.A. 1994. Survival of fecal bacteria in Antarctic coastal waters. *Antarct. Sci.*, 6, 333-338.
- Troussellier M., Bonnefont J.L., Courties C., Derrien A., Dupray E., Gauthier M., Gourmelon M., Joux F., Lebaron P., Martin Y. & Pommepuy M. 1998. Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanol. Acta*, 21, 965-981.

Manuscrit reçu le 12 avril 2007
Version modifiée acceptée le 12 juillet 2007