

31074

M123-FER-E

# ETUDE EXPERIMENTALE DE LA COLONISATION PAR LES BACTERIES DE SURFACES IMMERGEES EN MILIEU MARIN

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL08537

FERA PHILIPPE  
BREST 1985



N° d'ordre : 242

T H E S E

PRESENTEE

A L'UNIVERSITE DE BRETAGNE OCCIDENTALE

pour l'obtention

DU DOCTORAT DE 3ÈME CYCLE

Spécialité : OCEANOGRAPHIE

Mention : BIOLOGIE

PAR

PHILIPPE FERA

ETUDE EXPERIMENTALE DE LA COLONISATION PAR LES BACTERIES  
DE SURFACES IMMERGEES EN MILIEU MARIN

Soutenu le 18 SEPTEMBRE 1985 devant la Commission d'Examen :

Président	M. LUCAS A.	Professeur à l'U.B.O.
Examineurs	M. BLOCK J.C.	Professeur à l'Université de Metz
	Mme CHAMROUX S.	Chargée de Recherche CNRS (Roscoff)
	M. GAUTHIER M.	Ingénieur à l'IFREMER
	M. GLÉMAREC M.	Professeur à l'U.B.O.
	M. PRIEUR D.	Chargé de Recherche CNRS (U.B.O.)

A mes parents,

En hommage à toute l'affection  
et tous les conseils avisés  
qu'ils m'ont prodigué tout au  
long de mes études.

A ma compagne Elisabeth,

En témoignage de ma profonde  
reconnaissance pour son soutien  
moral et sa présence réconfortante  
durant ce travail.

A mon frère Marc,

Pour l'estime et la confiance  
qu'il m'a toujours vouées.

A mes amis Florent, James, Gilles...

- AVANT-PROPOS -

-----

Le présent travail a été réalisé grâce à une bourse de l'Institut Français de Recherches et d'Etudes de la Mer. Je remercie ceux qui m'ont aidé à obtenir ce financement, notamment Messieurs L. LEMOINE et M. GAUTHIER qui ont appuyé ma candidature.

Monsieur le Professeur A. LUCAS, en m'acceptant à effectuer mes études d'Océanographie biologique dans son laboratoire, à la Faculté des Sciences de l'U.B.O., a rendu en grande partie possible ce travail. Je lui en suis extrêmement reconnaissant et le remercie de me faire l'honneur de présider ce jury.

En assurant la direction scientifique de ce travail, Monsieur D. PRIEUR m'a fait bénéficier de ses très larges connaissances en bactériologie marine. Malgré ses multiples occupations, il n'a cessé de m'encourager et de contribuer à l'élaboration de cette étude. Son expérience et son amitié m'ont été précieuses. Je l'en remercie chaleureusement.

Je remercie également les autres membres du jury d'avoir accepté de lire et de critiquer ce mémoire, Madame S. CHAMROUX et Messieurs M. GLEMAREC, J.C. BLOCK et M. GAUTHIER.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur J. GUEZENNEC, chimiste de l'équipe "Corrosion" du Centre Océanologique de Bretagne, pour son aide et sa collaboration à la fois efficace et amicale.

Je remercie vivement Monsieur G. SINQUIN qui, durant ce travail, a manipulé à la fois avec compétence et patience le microscope électronique à balayage de la Faculté des Sciences de Brest et m'a initié au maniement de cet appareil.

Je ne saurais oublier l'accueil amical et l'aide technique que m'ont apporté Messieurs A. MARHIC, A. LEMERCIER, A. PAIMBENI, M. CONTÈS et J.P. LEROUX, qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance.

Mes remerciements affectueux à ma compagne, E. PENISSON, qui a assuré la frappe de ce mémoire avec application et minutie.

Merci également à Mme CORVEST pour la frappe des annexes et au personnel de l'atelier Offset de l'U.B.O. qui s'est chargé du tirage de cet ouvrage.

Ce travail a été réalisé grâce au soutien du CNEXO (IFREMER), dans le cadre des contrats 83/7315 et 85/2 320024.

# S O M M A I R E

INTRODUCTION	1
--------------	---

<u>CHAPITRE 1</u>	9
-------------------	---

## MATERIEL ET METHODES

1 - LES SYSTEMES EXPERIMENTAUX	9
1.1. DESCRIPTION DES CIRCUITS D'ALIMENTATION	9
1.2. DESCRIPTION DES CELLULES D'ECHANTILLONNAGES	10
1.3. TYPES DE MATERIAUX UTILISES	12
2 - PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU MILIEU	14
3 - ANALYSES BACTERIOLOGIQUES QUANTITATIVES	14
3.1. TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGES DES BACTERIES FIXEES	14
3.1.1. Préparation des matériaux	14
3.1.2. Méthodes de prélèvement	15
3.1.3. Technique de dénombrement	15
3.1.4. Optimisation des comptages	16
3.1.5. Evaluation du volume cellulaire	18
3.2. TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGES DES BACTERIES LIBRES	19
3.2.1. Méthodes de prélèvement	19
3.2.2. Techniques de dénombrement	19

4 - ANALYSES BACTERIOLOGIQUES QUALITATIVES	20
4.1. BACTERIES FIXEES	20
4.1.1. Description des systèmes de prélèvements	20
4.1.2. Techniques d'échantillonnages	21
4.1.3. Milieux de culture	23
4.1.4. Description des souches	24
4.1.5. Traitement informatique des données	25
4.2. BACTERIES LIBRES	25

## CHAPITRE 2 29

LA COLONISATION BACTERIENNE  
DANS UN SYSTEME A CIRCULATION  
D'EAU DE MER OUVERT

1 - CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET BACTERIOLOGIQUES DU SITE	29
1.1. PHYSICO-CHIMIE	29
1.2. VARIATIONS ANNUELLES DE LA MICROFLORE TOTALE	30
1.3. VARIATIONS JOURNALIERES DE LA MICROFLORE	31
1.3.1. Variations quantitatives	32
1.3.2. Variations qualitatives	33
1.4. CONCLUSIONS	36
2 - VARIATIONS SAISONNIERES DE LA COLONISATION BACTERIENNE	36
2.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	36
2.2. ETUDE QUANTITATIVE	37
2.2.1. Evolution des densités	37
2.2.2. Evolution des vitesses de colonisation	41

2.3. ETUDE MORPHOLOGIQUE	45
2.3.1. Description des principaux types morphologiques	45
2.3.2. Variations saisonnières	52
2.4. EVOLUTION DU VOLUME CELLULAIRE DES BACTERIES FIXEES EN ETE ET EN HIVER	57
2.5. EVOLUTION DE LA DISTRIBUTION DES BACTERIES FIXEES	60
2.6. APPROCHE STATISTIQUE DES RESULTATS	66
2.7. CONCLUSIONS	66
3 - ETUDE QUALITATIVE DES PEUPEMENTS BACTERIENS COLONISANT LES SUBSTRATS	
3.1. ETUDE COMPARATIVE DES PEUPEMENTS BACTERIENS ASSOCIES AUX TROIS MATERIAUX ETUDIES	71
3.2. SUCCESSION DES PEUPEMENTS BACTERIENS SUR LES FILTRES DE POLYCARBONATE	73
3.2.1. En fonction de leurs caractères morphologiques, écologiques et biochimiques	73
3.2.2. En fonction de leur régime nutritionnel	76
3.2.3. Evolution des bactéries sulfatoréductrices	83
3.3. CONCLUSIONS	84
4 - INFLUENCE DE LA CHLORATION DE L'EAU SUR LA FIXATION BACTERIENNE, POUR DEUX VITESSES DE CIRCULATION	85
4.1. VITESSE DU COURANT 0,7 m.s <sup>-1</sup>	85
4.1.1. Evolution des densités bactériennes	85
4.1.2. Evolution des vitesses de colonisation	87
4.1.3. Evolution des types morphologiques	87
4.2. VITESSE DU COURANT 0,1 m.s <sup>-1</sup>	88
4.2.1. Evolution des densités bactériennes	88
4.2.2. Evolution des vitesses de colonisation	88
4.2.3. Evolution des types morphologiques	88
4.3. CONCLUSION	90
5 - DISCUSSION	92

ETUDE AU LABORATOIRE DE LA COLONISATION BACTERIENNE  
INFLUENCE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DES BACTERIES

1 - CHOIX DE LA SOUCHE BACTERIENNE	113
2 - CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE BACTERIENNE ETUDIEE	115
2.1. CARACTERES MORPHOLOGIQUES - ECOLOGIQUES - BIOCHIMIQUES	115
2.2. TAUX DE CROISSANCE	115
2.2.1. Protocole	115
2.2.2. Résultats	115
3 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL	118
3.1. CONDITIONS DE CULTURE	118
3.2. PROTOCOLE DE MISE EN ETAT DE JEÛNE	118
3.3. DESCRIPTION DU SYSTEME EXPERIMENTAL	118
3.4. MESURE DES VARIATIONS DE DENSITE ET DE VOLUME CELLULAIRE	120
3.5. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS	120
4 - RESULTATS	121
4.1. VARIATION DU VOLUME CELLULAIRE AU COURS DES MANIPULATIONS	121
4.2. DENSITES CELLULAIRES AU DEBUT DE L'EXPERIENCE	122
4.3. BACTERIES QUI N'ONT PAS SUBI DE JEÛNE	123
4.3.1. Evolution des bactéries en suspension	123
4.3.2. Evolution des densités et des vitesses de colonisation des bactéries fixées	124
4.3.3. Evolution des volumes cellulaires	126
4.4. BACTERIES AYANT JEÛNE PENDANT 60 HEURES	130
4.4.1. Evolution des bactéries en suspension	130



4.4.2. Evolution des densités et des vitesses de colonisation des bactéries fixées	131
4.4.3. Evolution des volumes cellulaires	134
5 - CONCLUSION	135
6 - DISCUSSION	138
CONCLUSION GENERALE	147
BIBLIOGRAPHIE	155
ANNEXES	173

I N T R O D U C T I O N

## INTRODUCTION

De nombreuses études effectuées dans le milieu naturel ont montré que toute structure nouvellement immergée en mer était rapidement colonisée par divers organismes marins (FLOODGATE, 1968 ; CORPE, 1970 ; MARSHALL et al., 1971 a ; MITCHELL, 1978). Il est ainsi possible de distinguer deux types de salissures : les microsalissures, qui regroupent les bactéries, les champignons, les algues unicellulaires, les protozoaires, et les macrosalissures qui sont représentées par les algues macroscopiques et les invertébrés.

La colonisation par les microorganismes, de surfaces immergées en eau de mer, a fait l'objet de nombreux travaux, dans le milieu naturel (MARSHALL et al., 1971 b ; CORPE, 1977) comme en laboratoire (FLETCHER et LOEB, 1979 ; KJELLEBERG et al., 1982). Pour certaines de ces expérimentations utilisant des souches pures, des systèmes expérimentaux à circulation ont été employés (Mc COY et COSTERTON, 1982 ; BOTT et MILLER, 1983).

D'après ces travaux, il apparaît que la formation du biofilm microbien se développe suivant une certaine succession d'évènements.

Dans les minutes qui suivent l'immersion, les surfaces se couvrent de matériel non vivant, ions, macromolécules organiques et inorganiques, qui étaient présents dans la phase liquide (NEIHOF et LOEB, 1972). Ces composés viennent s'adsorber à la surface des matériaux sous l'effet des phénomènes électrostatiques et électromagnétiques qui se développent au niveau de l'interface. Ainsi, BAIER (1972) note que les surfaces sont couvertes d'un film de glycoprotéines dont la composition et les propriétés varient suivant la composition du milieu (site) et la nature physico-chimique du matériel (énergie libre de surface) (ZISMAN, 1964).

Dans les heures qui suivent, des bactéries apparaissent fixées à la surface des matériaux (O'NEILL et WILCOX, 1971 ; GERCHAKOV et al., 1976 ; MARSZALEK et al., 1979). Deux étapes sont généralement observées dans la succession des types bactériens. Les premiers colonisateurs sont des bacilles de très petite taille (MARSHALL et al., 1971 b), suivis par une population morphologiquement plus diversifiée, notamment des formes pédonculées (CORPE, 1973). Les premiers colonisateurs sont identifiés comme étant en majorité des *Pseudomonas* et des *Flavobacterium*, dont les exigences nutritionnelles permettent de les assimiler à des organismes copiotrophes (POINDEXTER, 1981 b) ; les seconds comme des *Caulobacter* et des *Hyphomicrobium* de type oligotrophe (CORPE, 1973 ; KUZNETSOV et al., 1979).

Le phénomène d'adhésion des bactéries à une surface est habituellement décrit selon deux étapes : une adsorption initiale des cellules appelée phase réversible, suivie d'une adhésion ferme, due à la synthèse et à la sécrétion de polymères extracellulaires, dite phase irréversible (MARSHALL et al., 1971 a).

L'adsorption des bactéries aux surfaces est principalement régie par des phénomènes physiques (FLETCHER, 1977). Les forces physiques qui interviennent au niveau de cette phase sont multiples, les principales étant les forces de Van der Waals et les interactions électrostatiques (DANIELS, 1980). La théorie la plus simple, qui rend compte de ces phénomènes et qui tient compte de la formation d'une double couche ionique au niveau des deux surfaces en contact, est la théorie DLVO, du nom de ses auteurs : DERJAGUIN & LANDAU et VERWEY & OVERBEEK (ELLWOOD et al., 1982). Les propriétés de surface du matériau et de la bactérie, ainsi que la composition du milieu environnant, peuvent influencer l'adsorption bactérienne (DEXTER et al., 1975 ; FLETCHER et LOEB, 1979 ; ABSOLOM et al., 1983). Les mouvements qui permettent aux bactéries d'être suffisamment proches de la surface pour être influencées par ces phénomènes sont très variés. Ils peuvent être passifs (gravité, courant) ou actifs (utilisation d'un ou plusieurs flagelles, synthèse de vacuoles) (MARSHALL, 1979).

L'adhésion irréversible des bactéries aux supports se fait par la synthèse de polymères extracellulaires, qui forment des ponts de fixation entre la cellule et la surface. Ces sécrétions sont composées de polysaccharides et de protéines dont la nature peut varier suivant la souche bactérienne et suivant la composition du milieu environnant (MARSHALL, 1972 ; MARSHALL et CRUICKSHANK, 1973 ; CORPE, 1977 ; COSTERTON et al., 1978). Différentes structures externes de la surface cellulaire peuvent induire la fixation bactérienne : les flagelles (POINDEXTER, 1981 a ; DOW et al., 1976), les pili ou fimbriae (PEARCE et BUCHANAN, 1980) et la présence de zones hydrophobes qui sont rejetées de la phase aqueuse (MARSHALL et CRUICKSHANK, 1973 ; DAHLBACK et al., 1981).

Une fois fixées, si les conditions physico-chimiques de l'interface sont favorables, les bactéries se multiplient activement, formant ainsi des microcolonies (MILLS et MAUBREY, 1981). La fusion de ces amas cellulaires, enveloppés de leurs sécrétions, et la fixation de nouvelles cellules, constituent la phase de croissance du biofilm (CHARACKLIS et al., 1982). Dans le milieu naturel, à l'intérieur d'un système à circulation d'eau, la cinétique de croissance du biofilm varie suivant les conditions physico-chimiques du milieu, la nature du support et la vitesse du courant (CHARACKLIS, 1973).

Ce phénomène, généralement appelé microfouling ou microsaliissures, occasionne, par ses proliférations, de nombreux inconvénients dont les principaux sont : résistance accrue à l'avancement des navires, augmentation des pertes de charge, favorisation de la corrosion, etc...

Dans le cas des centrales à énergie thermique des mers, la formation d'un film bactérien, à l'intérieur des échangeurs de chaleur, augmente les forces de friction (Mc COY et al., 1981 ; Mc COY et COSTERTON, 1982), accélère les processus de corrosion (LAQUE, 1975 ; CHANTEREAU, 1980 ; COSTERTON et LASHEN, 1984) et entraîne une réduction du transfert de chaleur (AFTRING et TAYLOR, 1979 ; BERCK et al., 1981 ; CHARACKLIS et al., 1981).

Préalablement à la construction d'une centrale de ce type, l'Institut Français de Recherche et d'Etudes de la Mer (IFREMER), initiateur de ce travail, a construit une station expérimentale destinée à la mise au

point de techniques d'étude et de diverses méthodes de nettoyage de conduites d'eau de mer, face au développement des microsalissures.

Au cours de cette étude, la mesure de l'intensité de la colonisation bactérienne, à l'intérieur du système expérimental, constituait un paramètre nécessaire à l'évaluation de l'efficacité des techniques de nettoyage. Diverses méthodes d'estimation de la biomasse bactérienne peuvent être utilisées (COSTERTON, 1980). Ces méthodes peuvent être indirectes et consister en la mesure des modifications physiques du matériel colonisé (NICKELS et al., 1981 ; CHARACKLIS et al., 1982). Des méthodes biochimiques, basées notamment sur le dosage de lipides spécifiques des bactéries, ont également été employées (WHITE et al., 1979). Enfin, des méthodes d'observation directe permettent de dénombrer les microorganismes qui colonisent les surfaces (WEISE et RHEINHEIMER, 1978 ; DEMPSEY, 1981). Elles ont été retenues pour réaliser ce travail car elles fournissent également des informations sur les types morphologiques rencontrés. Les dénombrements ont été effectués par microscopie électronique à balayage sur des échantillons d'acier inoxydable et d'aluminium, et par microscopie à épifluorescence sur des filtres de polycarbonate, d'analyse plus pratique (MERLINAT, 1982). Compte tenu des variations saisonnières, des caractéristiques de l'eau de mer et notamment la température, sur le site étudié, ces mesures ont été réparties sur un cycle annuel.

L'aspect qualitatif de la colonisation bactérienne a été étudié à chaque saison, par observation microscopique des différents types morphologiques qui se succèdent à la surface des échantillons. De plus, deux analyses qualitatives des communautés bactériennes hétérotrophes ont été effectuées afin, d'une part, de comparer les flores bactériennes fixées simultanément sur les trois matériaux après huit jours d'immersion, et d'autre part de suivre l'évolution, au cours du temps, de la composition de la population, sur les filtres en polycarbonate.

En fonction de la quantité de matériel nutritif contenu dans le milieu d'isolement, il est possible de mettre en évidence deux groupes de bactéries hétérotrophes : les bactéries marines oligotrophes, capables de se développer dans un environnement faiblement nutritif (AKAGI et al., 1977) et les bactéries copiotrophes, qui demandent, pour se développer,

une concentration en matériel nutritif relativement élevée (POINDEXTER, 1981 b). En utilisant deux milieux de culture de valeur nutritive très différente, l'un très riche, l'autre très pauvre, l'évolution de la proportion de ces deux types de bactéries hétérotrophes, à l'intérieur de la microflore fixée, a été estimée durant la période estivale.

Afin de lutter contre le développement du biofilm microbien, différentes méthodes peuvent être utilisées : utilisation de peinture antifouling (DEMPSEY, 1981), irradiation des surfaces aux rayons ultraviolet (DISALVO et COBET, 1974 ; ZELVER et al., 1981), nettoyage mécanique des supports (CARON et SIEBURTH, 1981), traitement chimique de l'eau par des produits oxydant la matière organique (Hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène) (BERGER et al., 1985 ; NORRMAN et al., 1977) ou par des biocides (Amines, glutaraldéhyde) (RUESKA et al., 1982). Au cours de ce travail, l'influence de la chloration de l'eau de mer à 0,1 ppm, sur le développement du biofilm microbien, a été testée à deux saisons et suivant deux vitesses de circulation d'eau.

Les différentes méthodes utilisées pour estimer la biomasse bactérienne dans le milieu naturel reposent soit sur le dosage d'un composé cellulaire spécifique (acide muramique, lipides membranaires, ATP), soit sur la mesure du volume des cellules (VAN ES et MEYER-REIL, 1982). Dans ce travail, durant une période estivale et hivernale, l'évolution de la biomasse bactérienne fixée aux filtres de polycarbonate, a été estimée par la mesure du volume des cellules fixées. D'après NOVITSKY et MORITA (1976) puis de AMY et al. (1983), suivant son état de jeûne, une même bactérie peut présenter une forme et un volume différent.

Lors d'une étude en milieu expérimental, l'influence de l'état physiologique des cellules sur la colonisation a ensuite été évaluée, à l'aide d'un *Pseudomonas* sp. isolé de la surface de l'un des supports immergés en milieu naturel. Ainsi, avant d'être mise en contact avec une surface d'aluminium, une partie des cellules de cette souche bactérienne a subi une période de jeûne préalable. L'évolution de la fixation de cette bactérie aux surfaces a ensuite été étudiée, suivant son état de jeûne. Parallèlement, les variations des volumes cellulaires, ainsi que le nombre de cellules en division, ont été évalués au niveau des populations bactériennes libre et fixée.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES



## CHAPITRE I - MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1 - LES SYSTEMES EXPERIMENTAUX

#### 1.1. DESCRIPTION DES CIRCUITS D'ALIMENTATION

Toutes les études réalisées en eau de mer circulante ont été menées dans la rade de Brest, au niveau de l'anse de St Anne du Portzic, au pied du Centre Océanologique de Bretagne (IFREMER) (Figure 1). Deux circuits d'alimentation en eau de mer ont été utilisés.

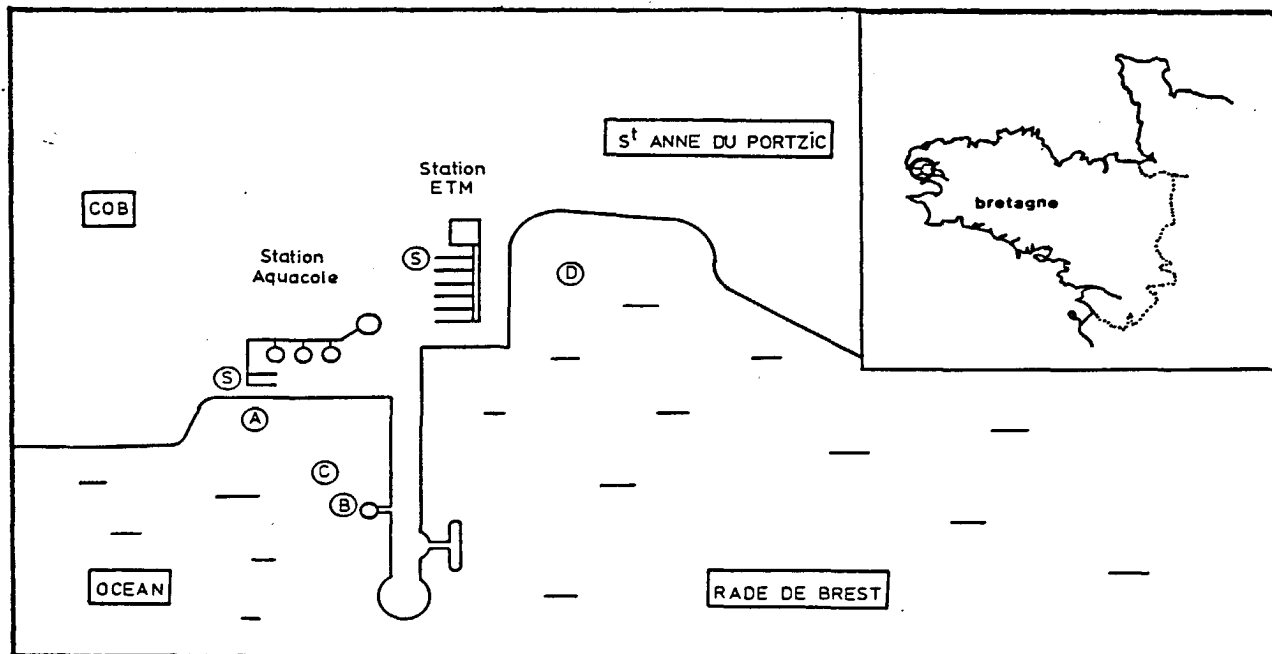


Figure 1 : Localisation du site d'étude

- A : Lieu de prélèvement pour les analyses bactériologiques de l'eau
- B : Lieu de prélèvement pour l'analyse des paramètres physico-chimiques de l'eau
- C : Prise d'eau de la station aquacole
- D : Prise d'eau de la station ETM.
- S : Systèmes de prélèvements

L'étude des variations quantitatives saisonnières de la formation du biofilm bactérien a été réalisée sur le môle de St Anne du Portzic, dans l'enceinte d'aquaculture de Centre Océanologique de Bretagne, site A. L'eau alimentant cette station est pompée à environ 200 mètres du bord, face au goulet de la rade. Elle est stockée dans une cuve souterraine, qui permet d'alimenter, en continu, les bassins d'aquaculture. Le système expérimental utilisé sur ce site est composé de deux cellules d'échantillonnages montées parallèlement, équipées chacune de deux vannes, qui permettent de les isoler indépendamment l'une de l'autre (Figure 2). Ce montage est relié perpendiculairement à l'extrémité terminale du réseau de canalisation de la station aquacole, par un tuyau de 15 mètres de long et de 100 mm de diamètre intérieur.

Les études qualitatives du biofilm bactérien et les essais de nettoyage par chloration ont été réalisés sur la station expérimentale Energie Thermique des Mers (ETM), site B. L'eau qui alimente cette station est pompée à environ 50 mètres du bord, à l'intérieur même de l'anse, qui est protégée des forts courants de marée et de la houle du large par un môle.

Le système expérimental utilisé sur ce site est composé de quatre cellules d'échantillonnages montées parallèlement et qui peuvent être, là aussi, isolées par des vannes (Figure 3). D'autres types de cellules d'échantillonnages, qui permettent d'étudier le biofilm par des méthodes chimiques, sont fixées à cette structure. Ce montage est relié perpendiculairement à la conduite d'alimentation générale de la station, à la sortie du bac de rétention, par un tuyau de 2 mètres de long et de 100 mm de diamètre intérieur.

Un montage identique, composé de quatre cellules d'échantillonnages biologiques et chimiques, est relié à la conduite générale, 20 mètres en aval. Il reçoit en permanence une eau de mer chlorée à 0,1 ppm.

## 1.2. DESCRIPTION DES CELLULES D'ECHANTILLONNAGES

Quel que soit le site d'étude et le circuit d'alimentation expérimental utilisé, le type de cellule d'échantillonnage biologique a toujours été le même.

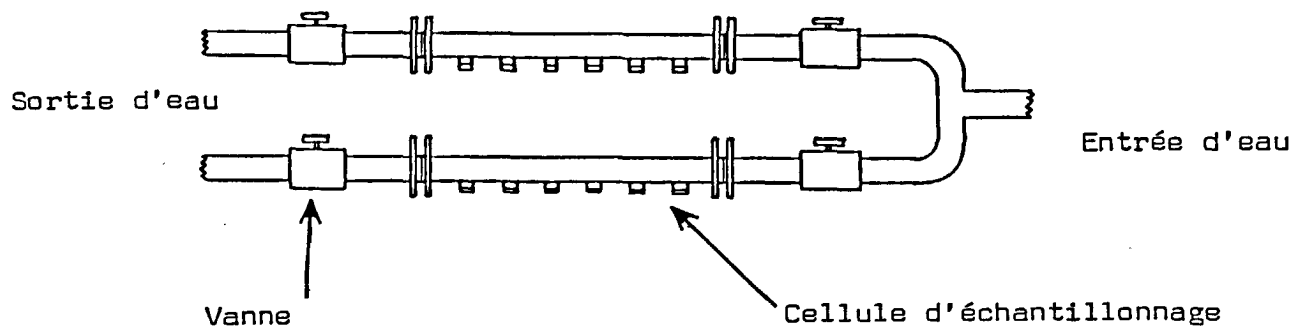


Figure 2 : Schéma du système expérimental de la station aquacole.

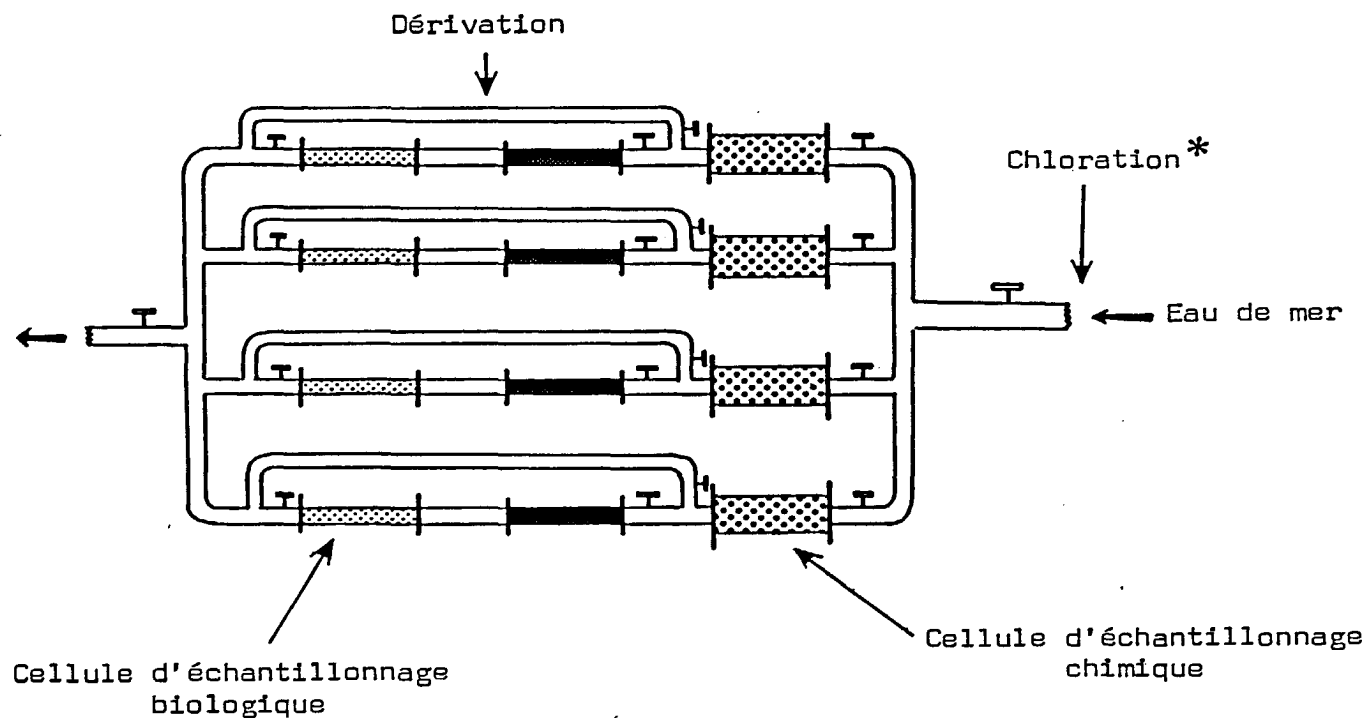


Figure 3 : Schéma du système expérimental de la station E.T.M.

\* facultative.

Chaque cellule d'échantillonnage est composée d'un tuyau de PVC de 50 cm de longueur et 40 mm de diamètre intérieur (Figure 4). Ces tubes sont percés de six trous filetés où viennent se visser des bouchons porte-échantillons, ce qui permet de tester simultanément six échantillons.

Etant donné le faible rayon de courbure de ce tuyau et le diamètre des échantillons, une fois en place, les plots sont légèrement surélevés par rapport à la surface interne de la conduite (Figures 5 et 6).

### 1.3. TYPES DE MATERIAUX UTILISES

Cette étude a été effectuée sur trois matériaux de composition différente : deux substrats métalliques, l'acier inoxydable UB 6 et l'aluminium AG 4, susceptibles d'être utilisés pour la construction des échangeurs thermiques d'une centrale à énergie thermique des mers et un matériel de substitution, des filtres en polycarbonates (Nucléopore) de porosité 0,2  $\mu\text{m}$  et de diamètre 25 mm.

Une étude préliminaire faite en milieu marin montre que les bactéries colonisent quantitativement ce type de filtre et l'acier inoxydable de façon identique.

Les alliages métalliques présentent une résistance différente face à la corrosion, du fait de leurs propriétés physico-chimiques distinctes. L'aluminium s'oxyde dès les premières heures d'immersion de façon ponctuelle (par piqûre), la pellicule d'oxydes d'aluminium ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ) ainsi produite s'étend ensuite rapidement sur toute la surface du métal, ce qui ralentit le processus de corrosion. L'acier inoxydable présente une meilleure résistance à l'oxydation et est plus stable en milieu marin.

Les filtres en polycarbonates sont stables en milieu marin et permettent d'utiliser des techniques bactériologiques plus fines afin d'étudier le biofilm (microscopie électronique à transmission, culture directe sur milieu gélosé, autoradiographie...).

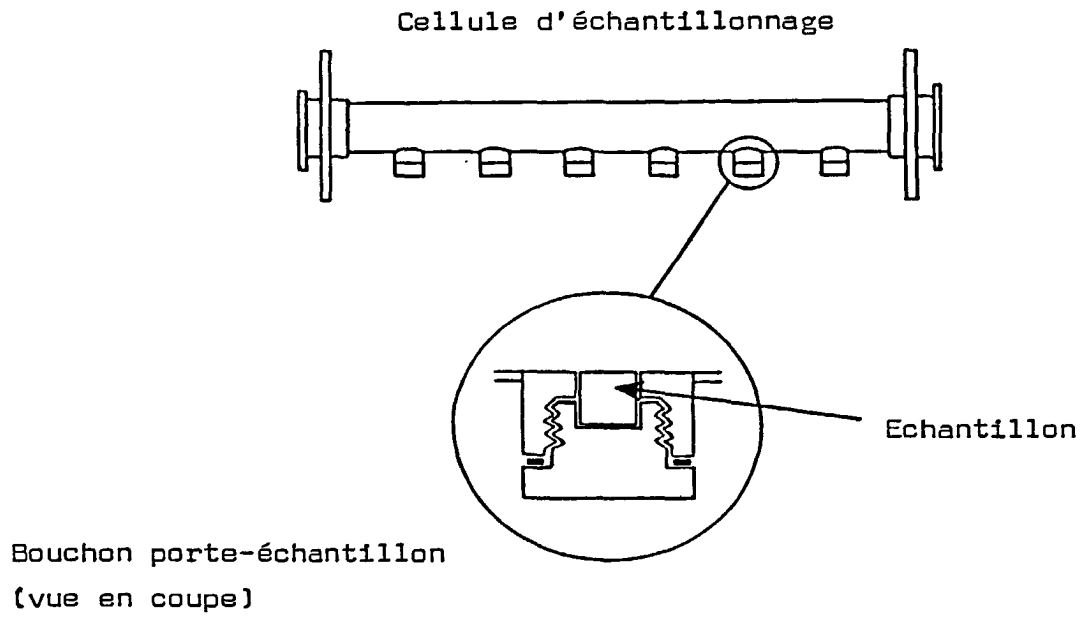


Figure 4 : Schéma d'un système de prélèvement

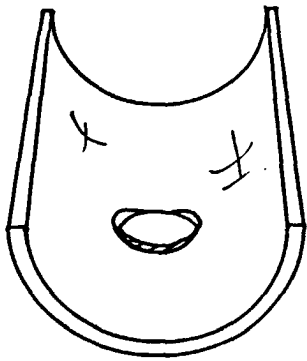


Fig. 5 : Position de l'échantillon dans le tube

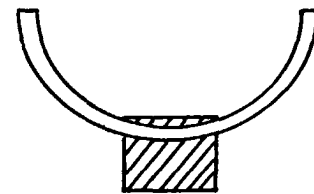


Fig. 6 : Coupe transversale du tube au niveau de l'échantillon

## 2 - PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES DU MILIEU

Pendant toute la durée de l'expérience annuelle, de mai 1983 à mai 1984, chaque semaine à marée haute, différents paramètres physico-chimiques de l'eau de mer ont été mesurés. Les différents sites de prélèvements sont représentés sur la figure 1. L'eau est prélevée à l'aide d'une bouteille de type Sampler-Hydro-Products XRB 135 et ramenée au laboratoire pour analyses. L'oxygène dissous est mesuré selon la méthode de Winkler, le pH à l'aide d'un pH mètre Tacussel Minisis et la salinité avec un salinomètre Guildline. La température est mesurée directement sur le site, lors des prélèvements, grâce à un thermomètre gradué au 1/10e de degré centigrade.

## 3 - ANALYSES BACTERIOLOGIQUES QUANTITATIVES

### 3.1. TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGES DES BACTERIES FIXEES

#### 3.1.1. Préparation des matériaux

Les échantillons métalliques, acier inoxydable et aluminium de 5 mm d'épaisseur, sont découpés dans des barreaux de 10 mm de diamètre.

Afin qu'ils soient identiques au niveau de leur état de surface, ils sont polis pour obtenir une surface de type "miroir". Dans un premier temps, ils sont polis manuellement sur une polisseuse à papier abrasif type Knut rotor, en utilisant successivement des disques de granulométrie 800 et 1 200, puis mécaniquement sur une polisseuse Struers DP 10 à paille diamant, en passant par des diamètres de pailles de 7  $\mu$ m, 3  $\mu$ m et 1  $\mu$ m. Ils sont stockés dans une huile de coupe très fine (Isocut, Buehler, U.S.A.). Juste avant leur utilisation, les échantillons sont dégraissés dans deux bains d'acétone et stérilisés au four Pasteur à 150°C pendant 1 h 30.

Les filtres en polycarbonate sont noircis au Noir Irgalan (HOBBIE et al., 1977), puis rincés deux fois dans de l'eau distillée stérile. Du fait de leur souplesse, ils sont fixés sur des plots de PVC de diamètre 10 mm et de hauteur de 10 mm à l'aide d'une bague de caoutchouc. Ils sont ensuite stérilisés 24 heures par rayonnement ultraviolet.

Tous les échantillons sont placés dans des piluliers stériles et transportés sur le site d'étude.

Afin de voir si le noir Irgalan n'avait pas un effet nocif sur les bactéries, deux tests préliminaires ont été effectués (Annexe I). Le premier pour vérifier qu'il ne diffusait pas dans le milieu de substances qui auraient un effet létal sur la flore bactérienne environnante ; le deuxième afin de voir s'il n'était pas répulsif et s'il n'empêchait pas la bonne fixation des microorganismes sur les filtres nuclépores. Au vu des résultats de ces expériences, il ne semble pas que ce produit agisse sur le comportement de la flore bactérienne.

### 3.1.2. Méthodes de prélèvement

Au niveau du site de prélèvement, chaque échantillon est sorti de son pilulier stérile et déposé dans un des six bouchons à vis porte-échantillon, qui vient se fixer sur les cellules d'échantillonnage. Deux échantillons de chaque matériau sont testés simultanément. La position occupée par chacun sur la cellule d'échantillonnage, par rapport au courant d'eau, est toujours la même.

Sens du courant : Acier - Aluminium - Filtre - Acier - Aluminium - Filtre  
→

Dès leur émergence, les échantillons métalliques sont sortis de leur bouchon porte-échantillon et directement fixés dans du glutaraldéhyde (2,5 % dans de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm). Les filtres Nucléopore sont séparés de leur support en PVC et fixés dans du formaldéhyde (2 % dans de l'eau de mer filtrée à 0,2 µm). Ils sont ensuite transportés au laboratoire pour analyses.

### 3.1.3. Technique de dénombrement

Les échantillons métalliques sont préparés pour être observés au microscope électronique à balayage. Ils sont rincés et déshydratés par bains successifs d'éthanol, puis séchés par la méthode du point critique au CO<sub>2</sub> (ANDERSON, 1951). Après métallisation, ils sont observés sur un microscope JEOL JSM 35 à 35 Kv. Les grossissements utilisés pour les dénombrements sont de 4 000 X ou 2 000 X suivant la densité bactérienne rencontrée.

Les filtres en polycarbonate sont colorés à l'acridine orange (0,01 % dans de l'eau distillée filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$ ) pendant deux minutes, selon la technique de HOBBIÉ et al. (1977). Ils sont ensuite rincés deux fois dans de l'eau distillée stérile, filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$  et observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (BAUSCH et LOMB "Balplan") à un grossissement de 1 000 X.

Un simple test a été effectué pour comparer ces deux techniques de numération, épifluorescence et microscopie électronique. Il a confirmé les résultats de BOWDEN (1977), à savoir qu'il n'y a pas de différence entre elles (Annexe I).

#### 3.1.4. Optimisation des comptages

Pour ce type d'expérience répétitive en milieu naturel, il faut que le nombre de champs microscopiques comptés soit suffisant pour que l'estimation soit représentative de la réalité, mais pas trop important pour permettre l'étude d'un grand nombre d'échantillons. Le choix de dénombrement des différents auteurs, qui ont étudié des peuplements bactériens, soit fixés naturellement à des surfaces, soit déposés à la surface d'un filtre après filtration, sont de trois types.

Certains définissent un nombre de champs à compter, d'autres fixent un nombre minimum de bactéries à dénombrer, d'autres enfin tiennent compte du nombre de champs et d'un nombre minimum de cellules à compter par champs (Tableau 1).

Dans cette étude, le nombre de champs microscopiques est de dix lorsque la densité est supérieure à 100 cellules par champ et de vingt lorsqu'elle est inférieure. De plus, dans le cas de densités trop importantes, la surface dénombrée est réduite. Suivant la technique d'analyse utilisée, deux méthodes sont employées :

- Microscopie électronique à balayage : augmentation du grossissement de 2 000 X (surface 2 560  $\mu\text{m}^2$ ) à 4 000 X (surface 642  $\mu\text{m}^2$ ) ;
- Microscopie à épifluorescence : le grossissement est constant 1 000 X. La surface est réduite grâce à l'utilisation d'un réticule 10 x 10 de 69  $\mu\text{m}$  de côté (surface totale 29 800  $\mu\text{m}^2$ , surface du réticule 4 761  $\mu\text{m}^2$ ).



		NOMBRE DE CHAMPS COMPTES				NOMBRE DE CELLULES PAR CHAMPS		NOMBRE TOTAL DE CELLULES COMPTÉES		REPLICATS		
		10	15	20	25	10 à 30	< 50	200	1 000	2	3	5
Marshall et al., 1971b	FX 0+S	+								+		
Corpe, 1973	FX 0			+						+		
Corpe, 1974	FX 0				+					+		
Disalvo & Cobet, 1974	FX 0	+										
Dawson et al., 1981	FX 0	+										
Dahlbäck & Pedersen, 1982	FX 0					+						
Bryant et al., 1983	FX 0+S				+							
Stanley, 1983	FX 0							+			+	
Hobbie et al., 1977	0 F	+						+				
Watson et al., 1977	0 F			+					+			
Peele & Colwell, 1981	0 F	+										
Kirchman et al., 1982	0 F	+	+									+
Amy & Morita, 1983	0 F	+								+		

FX : Etudes sur des bactéries fixées sur un support.

0 : Microscopie optique.

F : Etudes sur des bactéries déposées à la surface d'un filtre après filtration.

S : Microscopie électronique à balayage.

Tableau 1 : Techniques de dénombrement microscopique utilisées par différents auteurs.

### 3.1.5. Evaluation du volume cellulaire

Au cours des expériences de janvier et de mai 1984, les évolutions du volume des cellules bactériennes en forme de coques et de bâtonnets, qui étaient fixées à la surface des filtres Nucléopore, ont été évaluées séparément par microscopie à épifluorescence, selon la méthode de FRY et DAVIES (1984) modifiée comme suit.

Les volumes cellulaires sont évalués à l'aide d'un analyseur d'image Optamax PS2. Etant donnée la trop faible lumière émise par les cellules, par rapport à celle de la surface du filtre, il n'a pas été possible de travailler en prise directe sur le microscope. Lors des comptages effectués sur les échantillons, des photographies de champs microscopiques sont prises à l'aide de films Ektachromes 200 ASA. Toutes ces prises de vue sont faites au même grossissement (1 000 X) et avec un même temps d'exposition. Afin d'éliminer les lumières parasites émises par des particules ou des amas de cellules, les photographies sont projetées sur écran et seules les bactéries aux contours parfaitement définis sont redessinées sur papier (noir sur blanc). Afin de rendre comparables toutes ces mesures, à chaque projection, un facteur de calibration est calculé à partir de la photographie d'un micromètre pris au même grossissement que les bactéries. Les données sont directement transformées et stockées sur fichier informatique à l'aide d'un Commodore 64 interfacé avec l'analyseur d'images.

#### Calcul des volumes cellulaires :

Chaque cellule en forme de coque est assimilée à une sphère. Le volume (V) des cellules est calculé à partir de leur surface (S) par la formule suivante :

$$V = \frac{4}{3} \times S \times \sqrt{\frac{S}{\pi}}$$

Les bactéries en forme de bâtonnet sont assimilées à des cylindres pourvus d'une demi-sphère à chaque extrémité. La largeur (l) de chaque cellule est estimée à partir de la mesure de sa surface (S) et de sa longueur (L) par la formule suivante :

$$l = \frac{-L + \sqrt{L^2 - 4 \times \left(\frac{\pi}{4} - 1\right) \times (-S)}}{2 \left(\frac{\pi}{4} - 1\right)}$$

Cette valeur est ensuite introduite dans l'équation suivante, afin de calculer le volume des cellules :

$$V = \left(-\frac{\pi}{12}\right) \times l^3 + \left(\frac{\pi}{4} \times l^2 \times L\right)$$

Dans la mesure du possible, 100 à 200 cellules de chaque forme sont mesurées par échantillon (ZIMMERMAN, 1977). Ceci n'a pas été possible pour les échantillons qui sont immergés très peu de temps. En effet, le nombre de cellules fixées visibles par champ microscopique sur ces échantillons est compris entre 0 et 5 cellules. Avec de telles densités, la quantité de photographies nécessaires pour obtenir les 100 à 200 individus requis aurait entraîné un coût financier trop élevé.

### 3.2. TECHNIQUES D'ECHANTILLONNAGES DES BACTERIES LIBRES

Pendant toute la durée de l'expérience annuelle, de mai 1983 à mai 1984, chaque semaine à marée haute, l'abondance en bactéries de l'eau de mer de surface (30 cm), au niveau du site d'étude et de l'eau de mer alimentant les systèmes expérimentaux, a été mesurée. Les différents sites de prélèvements sont représentés sur la figure 1.

#### 3.2.1. Méthodes de prélèvement

A chaque niveau de prélèvement, deux échantillons sont collectés simultanément dans des flacons stériles. L'un est directement fixé dans du formaldéhyde (concentration finale 2 %), l'autre est conservé frais. Les quatre prélèvements ainsi obtenus sont rapidement transportés au laboratoire pour analyses.

#### 3.2.2. Techniques de dénombrement

##### - Numération de la flore bactérienne totale

Pour chaque échantillon formolé, 5 ml sont colorés à l'acridine orange (concentration finale 0,01 %) pendant deux minutes, puis filtrés sur un filtre Nucléopore (porosité 0,2 µm) préalablement noirci au noir Irgalan (HOBBIE et al., 1977). Les numérations se font par épifluorescence sur un microscope Bausch et Lomb "Balplan" par comptage de 10 champs à un grossissement de 1 000 X.

- Numération de la flore bactérienne viable

Le nombre de bactéries viables est déterminé à partir de l'échantillon frais, par étalement sur milieu gélosé 2216 E (OPPENHEIMER et ZOBELL, 1952) de 0,1 ml de l'échantillon, à la dilution appropriée. Chaque étalement est doublé. Les dénombrements sont effectués après huit jours d'incubation à 20°C.

4 - ANALYSES BACTERIOLOGIQUES QUALITATIVES

4.1. BACTERIES FIXEES

4.1.1. Description des systèmes de prélèvements

Au cours de l'année d'expérimentations, deux études bactériologiques qualitatives du biofilm ont été réalisées. Suivant la nature de l'expérience, deux systèmes de prélèvements différents ont été utilisés.

- Durant le mois de novembre 1984, des prélèvements sont effectués simultanément sur les trois substrats après huit jours d'immersion. Pour cette étude, les matériaux sont préparés de la même façon que celle décrite au paragraphe 3.1.1. et immergés à l'aide du système de prélèvement schématisé sur la figure 4.

- Durant le mois de mai 1984, l'évolution de la population bactérienne au cours des quinze premiers jours d'immersion est suivie sur un seul matériel, les filtres en polycarbonates. Les prélèvements sont effectués après un jour, huit jours et quinze jours d'immersion.

Pour cette étude, des filtres de diamètre 47 mm (porosité 0,2 µm) sont utilisés afin d'augmenter la surface d'échantillonnage. Après coloration au noir Irgalan, ils sont fixés sur un tuyau de PVC de 16 mm de diamètre à l'aide d'une membrane de caoutchouc souple percée de quatre trous de 35 mm de diamètre. Ce système est stérilisé aux rayons ultra-violet pendant 24 heures, enveloppé dans une feuille d'aluminium stérile puis transporté sur le site d'étude où il est inséré à l'intérieur des cellules biologiques (Figure 7).

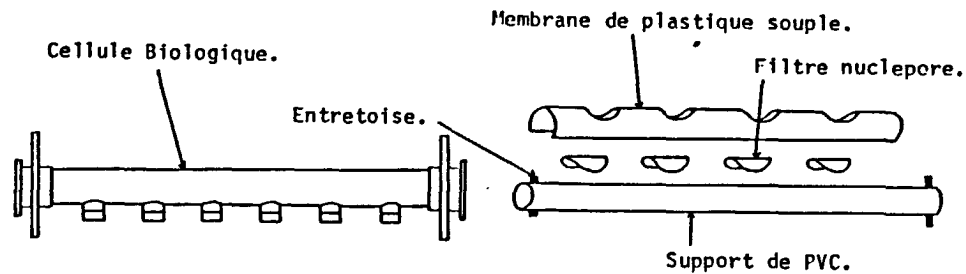


Figure 7 : Schéma du montage permettant l'isolement des bactéries colonisatrices sur les filtres

#### 4.1.2. Techniques d'échantillonnages

Dès leur émerision, les échantillons sont séparés de leur support, immergés dans de l'eau de mer stérile et transportés au laboratoire pour analyses.

Afin d'étudier les bactéries fixées, la méthode généralement employée consiste à les décrocher de leur support pour les remettre en suspension dans de l'eau de mer stérile. Les isollements sont ensuite effectués par étalement de cette eau sur milieu gélosé.

Les bactéries peuvent être décrochées soit en frottant le support avec un tampon d'ouate sec (CORPE, 1970, 1973) ou imbibé d'une solution de Tween 80 (DEMPSEY, 1981), soit en grattant la surface avec un "Rubber Policeman" (scalpel en caoutchouc) (AFTRING et TAYLOR, 1979) ou un scalpel en téflon (EATON et al., 1980) ou en acier au carbone (GERCHAKOV et al., 1976).

Afin de comparer qualitativement les bactéries fixées sur les trois matériaux, après une même période d'immersion (huit jours), les trois échantillons sont tout d'abord rincés cinq fois dans de l'eau de mer stérile, pour ôter les cellules non fixées (CORPE, 1974 ; DEXTER, 1979). Puis les surfaces sont frottées avec un morceau de gaze stérile (1 cm<sup>2</sup>). Ce tampon est ensuite placé dans un sac de plastique stérile contenant 20 ml d'eau de mer stérile et agité violemment pendant dix minutes dans un stomacher "Lab-Blender 400", afin de faire ressortir les bactéries des fibres de la gaze (FRY et HUMPHREY, 1978).

L'évolution qualitative de la flore bactérienne fixée, au cours du temps, sur les filtres Nucléopore, a été suivie au cours d'une autre expérience. Les filtres sont préalablement rincés dans un tube à essai contenant 15 ml d'eau de mer stérile, par agitation du tube sur Vortex pendant 15 secondes, suivie d'un rinçage doux dans de l'eau de mer stérile. Les essais qui ont permis de choisir cette technique de rinçage entre deux autres sont présentés et discutés dans l'Annexe II.

Au cours d'une expérience, en mai 1984, le nombre des cellules bactériennes viables fixées à la surface des filtres a été estimé par la méthode suivante : après rinçage, les filtres sont déposés directement sur un milieu de culture gélosé et les bactéries sont dénombrées après huit jours ou quatre semaines d'incubation à 20°C, suivant le milieu de culture utilisé (NOVITSKY et MORITA, 1976).

Les prélèvements proprement dit, qui ont servi à l'étude de l'évolution qualitative de la flore bactérienne fixée aux filtres Nucléopore au cours du temps, ont été effectués en août 1984. Après rinçage, les bactéries sont décrochées des filtres par agitation violente, selon une technique utilisée pour étudier la flore épiphyte d'algues (FRY et HUMPHREY, 1978). Les filtres sont mis dans un sac plastique stérile contenant 10 ml d'eau de mer stérile filtrée à 0,2 µm, et agités violemment pendant 10 minutes dans un stomacher "Lab-Blender 400". Les essais qui ont permis de choisir cette méthode de décrochage, parmi deux autres, sont présentés et discutés dans l'Annexe III.

Que ce soit pour les matériaux métalliques ou les filtres Nucléopore, lorsque les bactéries sont décrochées des supports, les dénombrements de la flore bactérienne viable se font soit par étalement de 0,1 ml de l'eau d'agitation, à la dilution appropriée, sur le milieu de culture choisi, soit par la méthode NPP (nombre le plus probable) (Mc GRADY, 1918) en milieu liquide. Les lectures sont faites après des temps d'incubation variables suivant le milieu utilisé. L'isolement des souches bactériennes se fait à partir des colonies qui se sont développées sur les milieux gélosés.

Pour chaque prélèvement, l'étude qualitative se fait sur vingt souches prises au hasard sur une boîte de Petri. Ces souches peuvent être stockées à 14°C en tube, sur milieu gélosé incliné.

#### 4.1.3. Milieux de culture

La plupart des études bactériologiques sont faites sur des bactéries isolées sur un milieu de culture enrichi en peptones et en extraits de levure. Quelles que soient les études, la quantité de peptone est toujours importante, pour permettre un bon développement des bactéries hétérotrophes, mais peut varier suivant les auteurs : 1 g.l<sup>-1</sup> (FLETCHER et LOEB, 1979), 3 g.l<sup>-1</sup> (FLOODGATE, 1966), 4 g.l<sup>-1</sup> (GERCHAKOV et al., 1976), 5 g.l<sup>-1</sup> (CORPE, 1975).

Le milieu qui a été utilisé pour l'étude de la flore bactérienne hétérotrophe est le 2216 E de OPPENHEIMER et ZOBELL (1952), qui contient 4 g.l<sup>-1</sup> de peptones. Il a été utilisé sous forme liquide ou solide, par addition de 15 grammes d'Agar (Bacto agar Difco) pour un litre de milieu. Il est préparé à partir d'une eau de mer vieillie, filtrée sur membrane Sartorius 0,2 µm et d'eau distillée (composition en Annexe IV).

Le dénombrement et l'isolement des bactéries oligotrophes, fixées aux filtres Nucléopore, ont été faits selon la méthode décrite par AKAGI et al. (1977). Une fois rincés, les filtres sont déposés dans des boîtes de Petri de diamètre 5,5 cm, sur deux filtres en fibre de verre (Whatman GF/C, diamètre 5,5 cm), imbibés d'un milieu liquide très pauvre, ne contenant que 16,8 mg de carbone par litre (AK), dont la composition est donnée en Annexe IV. Ils sont incubés trois semaines à 17°C. Afin que les bactéries oligotrophes ainsi sélectionnées se développent en colonies visibles à l'oeil, les filtres sont ensuite déposés sur le même milieu gélosé (15 g.l<sup>-1</sup> d'Agar) et à nouveau incubés pendant huit jours.

Pour l'étude de la succession de la flore bactérienne sur les filtres Nucleopore, un autre milieu (LX), de valeur nutritive intermédiaire aux deux précédents (3,5 g.l<sup>-1</sup> de composés carbonés), a aussi été utilisé (TORELLA et MORITA, 1981). Il est préparé de la même façon que le milieu gélosé 2216 E. Sa composition est donnée dans l'Annexe IV.

Les bactéries anaérobies sulfatoréductrices fixées à la surface des supports ont été dénombrées par la méthode NPP en milieu liquide (DELILLE et LAGARDE, 1974). Les bactéries ont été isolées sur deux milieux gélosés, milieu

de Starkey modifié (POSTGATE, 1966) et de Baars (CHANTEREAU, 1980) suivant deux méthodes :

- Par étalement de 0,1 ml de la solution de prélèvement sur ces milieux gélosés et incubation des boîtes dans des jarres anaérobies (gaz H<sub>2</sub> + CO<sub>2</sub>) à 25°C pendant trois semaines ;

- Par ensemencement de 0,1 ml de la solution de prélèvement dans des tubes de milieux semi-liquides à 40°C. Ils sont incubés huit jours à 25°C après dépôt d'une couche de paraffine stérile à la surface du milieu solidifié.

Les compositions de ces milieux sont données dans l'Annexe IV.

#### 4.1.4. Description des souches

L'étude qualitative a été faite par 30 tests écologiques et biochimiques.

##### - Caractères morphologiques

Chaque souche est examinée par microscopie à contraste de phase afin de définir la morphologie, la mobilité et la présence de spore sur des cultures âgées de 24 heures sur milieu 2216 E.

Chaque frottis est ensuite utilisé pour la coloration de Gram.

##### - Caractères écologiques

La thermotolérance (5°C, 20°C, 30°C) et la tolérance à un milieu de salinité "nulle" (milieu à l'eau douce) de chaque souche sont déterminées sur milieu 2216 E (modifié pour le milieu à l'eau douce) après huit jours d'incubation.

##### - Caractères biochimiques

Ces caractères ont été déterminés grâce aux tests des galeries API 20 B :

- Présence de certaines activités enzymatiques : oxydase, catalase, uréase, tryptophanase, β galactosidase et protéase (action sur la gélatine) ;



- Possibilité d'attaque de certains carbohydrates : saccharose, L-arabinose, mannitol, fructose, glucose, maltose, amidon, rhamnose, galactose, mannose, sorbitol et glycérol ;
- Réduction des nitrates en nitrites, formation d'H<sub>2</sub>S à partir de thiosulfate, production d'acétoïne à partir de l'acide pyruvique et utilisation du citrate comme seule source de carbone ;
- Possibilité de fermentation du glucose en condition anaérobie par la méthode de HUGH et LEIFSON (1953).

#### 4.1.5. Traitement informatique des données

Chaque souche est définie dans un fichier informatique par ses réponses aux 27 tests précédemment décrits (sauf les caractères écologiques).

Le programme de taxonomie numérique utilisé calcule le coefficient de similitude établi par SOKAL et MICHENER (1958), qui tient compte à la fois des similitudes positives et négatives. Les souches sont regroupées selon la variance. Pour chaque série de souches bactériennes, le programme calcule un indice moyen d'activité à partir des pourcentages de réponses positives à tous les tests et un indice d'activité fonctionnelle, basé sur la fréquence relative d'apparition de chaque caractère (TROUSSELLIER et LEGENDRE, 1981).

#### 4.2. BACTERIES LIBRES

Les bactéries en suspension dans le milieu sont prélevées de la façon décrite au chapitre 3.2.1. Les dénombrements et les isolements sont effectués par étalement de 0,1 ml d'eau des échantillons frais, à la dilution appropriée, sur les différents milieux de culture gélosés (15 g.l<sup>-1</sup> d'Agar).

Les méthodes d'étude et de traitement informatique des souches, ainsi isolées, sont les mêmes que celles décrites pour les bactéries fixées.

CHAPITRE II

LA COLONISATION BACTERIENNE DANS UN SYSTEME  
A CIRCULATION D'EAU DE MER OUVERT

## CHAPITRE II - LA COLONISATION BACTÉRIENNE DANS UN SYSTÈME À CIRCULATION D'EAU DE MER OUVERT

### 1 - CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES ET BACTERIOLOGIQUES DU SITE

#### 1.1. PHYSICO-CHIMIE

Durant la période d'étude, la concentration en oxygène dissous fluctue lentement entre un minimum de  $7,3 \text{ mg. l}^{-1}$  en été et un maximum de  $10,7 \text{ mg. l}^{-1}$  au début du printemps (Figure 8).

Le pH est sensiblement identique toute l'année et oscille autour de 8,1.

La salinité de l'eau de surface est assez stable durant l'été et l'hiver,  $34,8 \text{ ‰}$ , avec toutefois quelques chutes brusques jusqu'à  $32 \text{ ‰}$  à la fin de l'hiver 1984.

La température est le paramètre qui montre la plus grande amplitude de variation (Figure 9). A partir du mois de mai 1983 elle augmente progressivement pour atteindre un maximum de  $17,6^\circ\text{C}$  au mois d'août, puis recend, pour être minimale,  $7,9^\circ\text{C}$ , fin février et à nouveau amorcer une augmentation au début de mars.

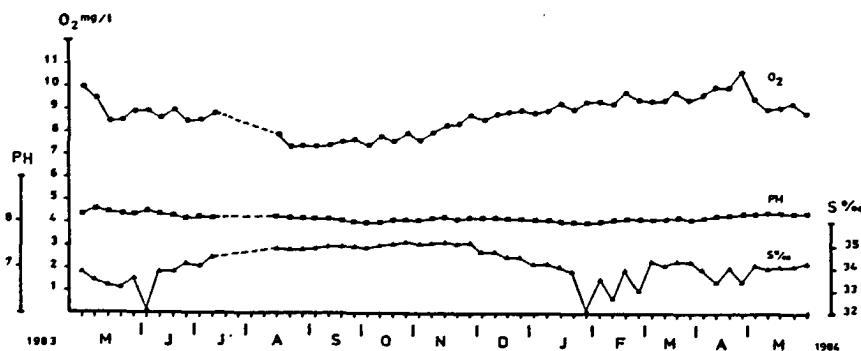


Figure 8 : Evolution des paramètres physico-chimiques du milieu durant l'année expérimentale.



Figure 9 : Evolution de la température de l'eau durant l'année expérimentale.

### 1.2. VARIATIONS ANNUELLES DE LA MICROFLORE TOTALE

Pendant 12 mois (mai 83 - mai 84) les densités de bactéries en suspension dans l'eau de mer de surface (30 cm) au niveau du site et de l'eau alimentant le système expérimental, ont été dénombrées de façon hebdomadaire selon deux techniques de numérations (Figure 10) :

- microscopie à épifluorescence ;
- étalement sur milieu de culture 2216 E.

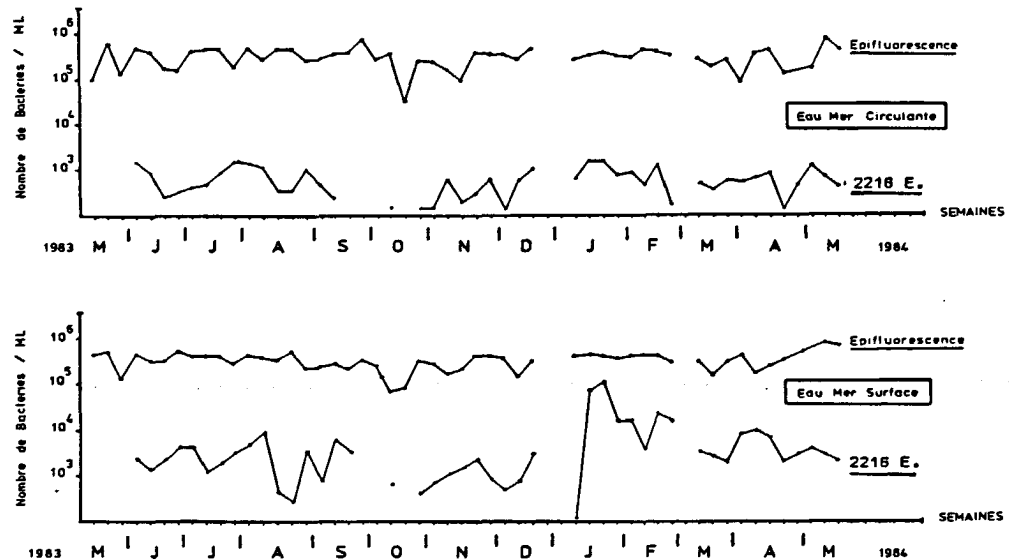


Figure 10 : Evolution de la densité bactérienne en suspension dans l'eau alimentant le circuit et dans l'eau de mer de surface, durant l'année expérimentale.

- Résultats par microscopie à épifluorescence

Les densités totales de bactéries sont restées stables tout au long de l'année. En eau de mer de surface, elles évoluent entre  $7,1.10^4$  et  $8,5.10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup> et entre  $3,2.10^4$  et  $7,8.10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup> pour l'eau des conduites.

Pour les deux niveaux de prélèvement, les minimums et les maximums sont apparus en même temps, respectivement le 17 octobre 83 et le 15 mai 84.

Après avoir testé leur normalité par la méthode de la droite de Henri (LIORZOU, 1973), les moyennes des deux distributions ont été comparées statistiquement par le test de Student (Annexe V). Il apparaît ainsi qu'elles ne sont pas significativement différentes et que les densités bactériennes sont similaires sur l'ensemble de l'année.

- Résultats sur milieu de culture

La flore viable subit des variations plus importantes au cours de l'année.

Dans l'eau alimentant le système expérimental, les densités varient entre  $1,4.10^2$  et  $1,7.10^3$  cellules.ml<sup>-1</sup> alors qu'en mer, elles évoluent entre  $1.10^2$  et  $1,14.10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup>.

C'est au cours du mois de janvier que les variations sont les plus importantes en mer. Il est intéressant de signaler que c'est durant cette période de l'année que les plus fortes tempêtes ont été enregistrées.

Cette brusque augmentation n'apparaît pas dans l'eau de mer des conduites. Le circuit d'alimentation semble avoir un effet régulateur sur les densités des bactéries en suspension.

1.3. VARIATIONS JOURNALIERES DE LA MICROFLORE

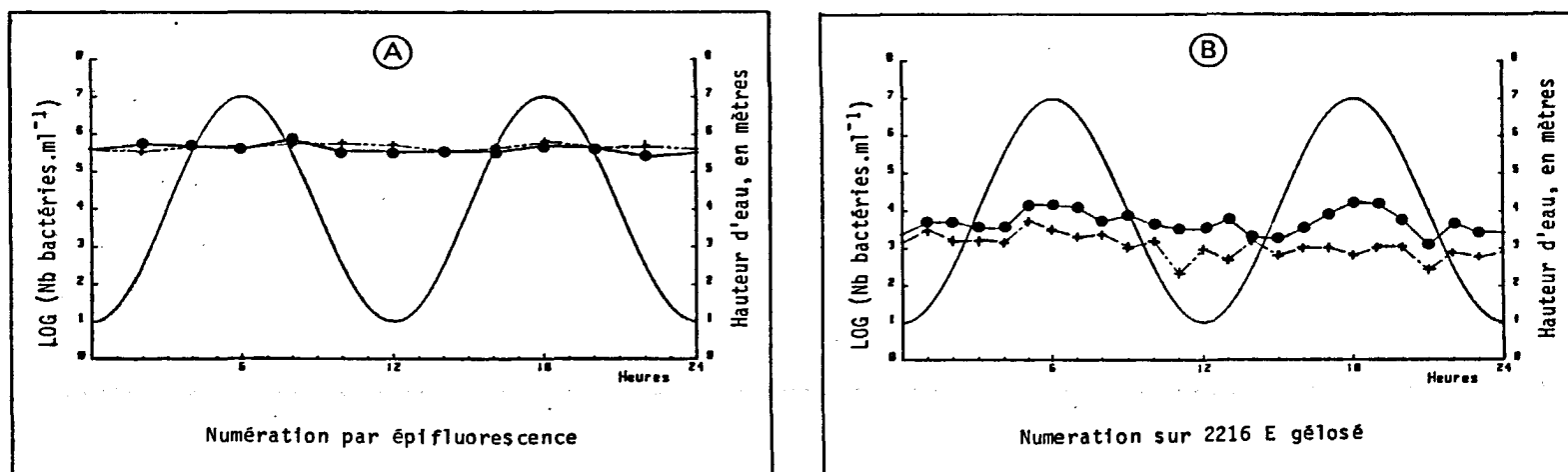
Durant 24 heures, le 9 août 1983, les densités de bactéries en suspension dans l'eau de mer de surface (30 cm), au niveau du site et de l'eau alimentant le système expérimental, ont été dénombrées toutes les heures par étalement sur milieu 2216 E et toutes les deux heures par microscopie à épifluorescence.

A chaque marée haute, soit à 6 heures et à 18 heures, un échantillon de 20 souches bactériennes a été isolé au niveau de chaque site. Après purification, chacune des 80 souches a subi un certain nombre de tests écologiques et biochimiques (31), qui ont permis de comparer ces quatre populations par taxonomie numérique.

### 1.3.1. Variations quantitatives

Quel que soit le site de prélèvement, la densité totale des bactéries en suspension est stable au cours du cycle de marée. Elle est en moyenne de  $4,1 \cdot 10^5$  cellules. $\text{ml}^{-1}$  pour l'eau de mer de surface et de  $4,4 \cdot 10^5$  cellules. $\text{ml}^{-1}$  pour l'eau des conduites (Figure 11 A).

La densité de bactéries viables sur milieu 2216 E est toujours moins importante dans l'eau alimentant le système expérimental ( $2,1 \cdot 10^2$  -  $5,4 \cdot 10^3$  cellules. $\text{ml}^{-1}$ ) que dans l'eau de mer de surface ( $1,2 \cdot 10^3$  -  $1,6 \cdot 10^4$  cellules. $\text{ml}^{-1}$ ) (Figure 11 B). Au cours du cycle de marée, les deux populations évoluent parallèlement et varient peu. Dans l'eau du milieu naturel, la densité bactérienne augmente légèrement lors de la haute mer de 18 heures.



—●— Eau de mer de surface - +-----+ Eau de mer des conduites

Figure 11 : 9 août 1983 - Evolution du nombre de bactéries suivant un cycle de marée de 24 heures.

### 1.3.2. Variations qualitatives

Les échantillons destinés à l'étude de ces variations ont été prélevés le 9 août 1983. A 6 heures, à haute mer, et à 18 heures, à la haute mer suivante, les échantillons ont été prélevés en surface à l'entrée de la prise d'eau de mer du système expérimental (Figure 1) et au niveau de ce système (à la sortie des conduites). Quatre-vingt souches (20 par échantillons) ont ainsi été étudiées. L'ensemble des réponses de ces souches aux différents tests est présenté dans l'Annexe VI.

Les souches isolées de l'eau de mer à 6 heures sont toutes des bacilles Gram négatif. Douze d'entre elles sont apparentées au groupe des *Pseudomonadaceae* (métabolisme non fermentatif) et huit au groupe des *Vibrionaceae* (métabolisme fermentatif et oxydase +). Aucune de ces souches ne se développe en l'absence de NaCl (Indice moyen d'activité : 8,6).

Les souches isolées à la même heure du système expérimental sont également des bacilles Gram négatif. La proportion de *Vibrionaceae* est cette fois inversée : douze souches contre huit non fermentatives. Ces souches sont également exigeantes en chlorure de sodium. Elles sont en majorité protéolytiques (75 %) et sont plus actives vis-à-vis des substrats proposés que les souches de l'échantillon précédent (Indice moyen d'activité : 10,7).

Les souches isolées de l'eau de mer à 18 heures sont également des bacilles Gram négatif. Les souches fermentatives du groupe des *Vibrionaceae* sont en majorité : 14 sur 20. Il s'agit une nouvelle fois de souches exigeant du chlorure de sodium. Leur activité vis-à-vis des substrats proposés est d'un niveau équivalent à celui de l'échantillon du système expérimental échantillonné à 6 heures (Indice moyen d'activité : 10,45).

Les souches isolées de ce système à 18 heures sont en majorité des *Vibrionaceae* (15 sur 20). Les nitrates sont réduits en nitrites par 75 % des souches. De même, 75 % des souches sont protéolytiques. C'est cet échantillon qui présente le plus fort indice moyen d'activité (12,6). Toutes les souches sont exigeantes en chlorure de sodium.

Afin de mieux apprécier les ressemblances et différences entre ces échantillons, les souches ont été comparées par les méthodes de taxonomie numérique. Elles ont été comparées pour un degré de similitude de 90 %,

correspondant au niveau du genre (TROUSSELLIER et LEGENDRE, 1981). Le degré de similitude de 95 %, correspondant au niveau de l'espèce, n'a pu être retenu ici, du fait du nombre trop faible d'individus par échantillon.

Les souches isolées de l'eau de mer sont comparées dans le dendrogramme n° 1. Pour une similitude de 90 %, six groupes s'individualisent, représentant 26 souches, soit 65 % de la collection étudiée. Sur ces six groupes, un seul est homogène en ce qui concerne l'origine des souches : il s'agit d'une paire regroupée à 92 %. Tous les autres groupes sont mixtes, c'est-à-dire composés de souches isolées à 6 heures et 18 heures.

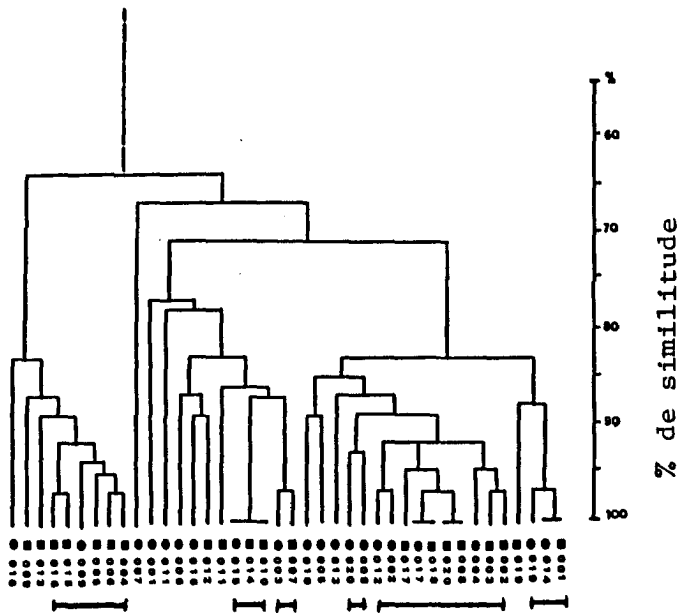
Les souches isolées des tubes sont comparées dans le dendrogramme n° 2. Pour une similitude de 90 %, trois groupes sont individualisés. Ils rassemblent 33 souches sur 40, soit 82,5 % de la collection. Ceci indique une plus grande homogénéité de l'échantillon. Il est vrai que huit souches de la même origine sont identiques à 100 %. Ces trois groupes sont mixtes, comportant donc des souches prélevées à 6 heures et 18 heures. On remarque, à plusieurs reprises, des souches identiques à 100 % et provenant de deux échantillons.

La comparaison entre les souches isolées de l'eau de mer et du système expérimental à 6 heures est illustrée dans le dendrogramme n° 3. Quatre groupes de souches sont individualisés pour une similitude de 90 %, regroupant 20 souches, soit 50 % de la collection. Si l'on se reporte aux cas précédents, ceci traduit une plus grande hétérogénéité de la collection. La composition des quatre groupes individualisés à 90 % confirme ce point : trois de ces groupes sont homogènes en ce qui concerne l'origine des souches.

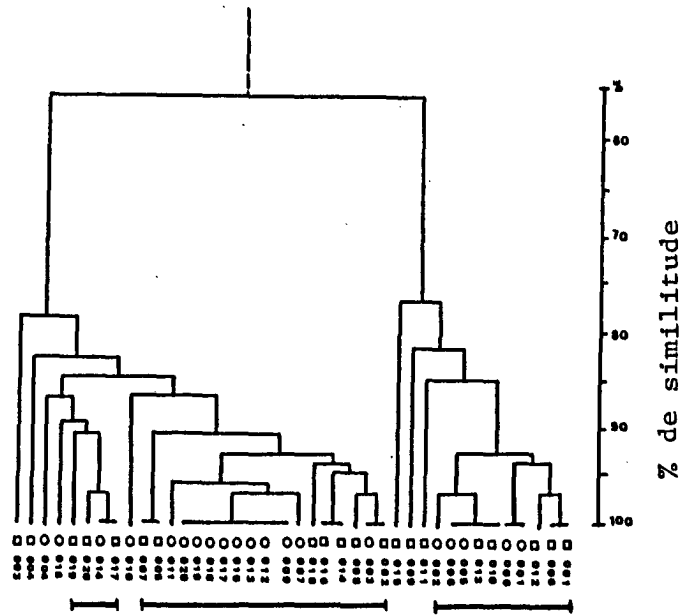
La comparaison des échantillons prélevés à 18 heures est illustrée par le dendrogramme n° 4. A 90 % de similitude, cinq groupes, dont deux paires, sont individualisés et rassemblent 18 souches, soit moins de 50 % de la collection. Quatre de ces groupes sont homogènes en ce qui concerne l'origine des souches. Quant au cinquième, il est formé en majorité (quatre souches sur cinq) de souches isolées des tubes.

Cette brève étude qualitative indique donc que, dans la même journée, il y a assez peu de variations qualitatives des peuplements bactériens au niveau de l'eau de mer, ou au niveau du système expérimental. Par contre, les peuplements bactériens des tubes diffèrent un peu des peuplements bactériens de l'eau de mer. Le système expérimental constitue un biotope modifié par rapport à l'environnement immédiat.

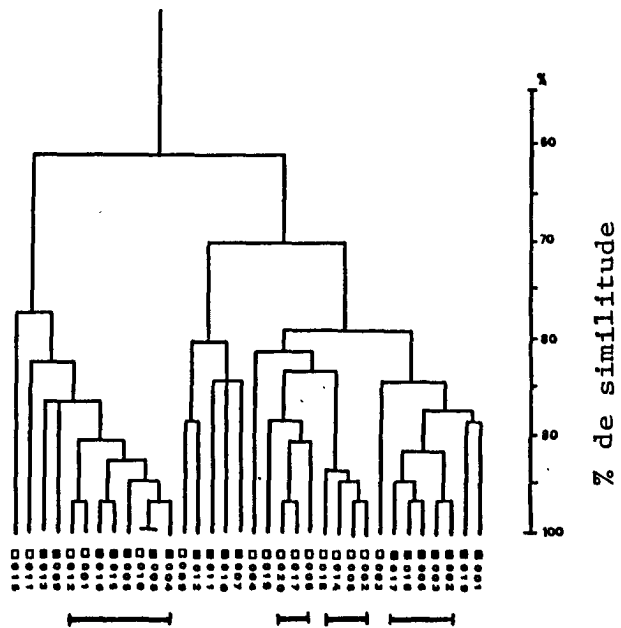




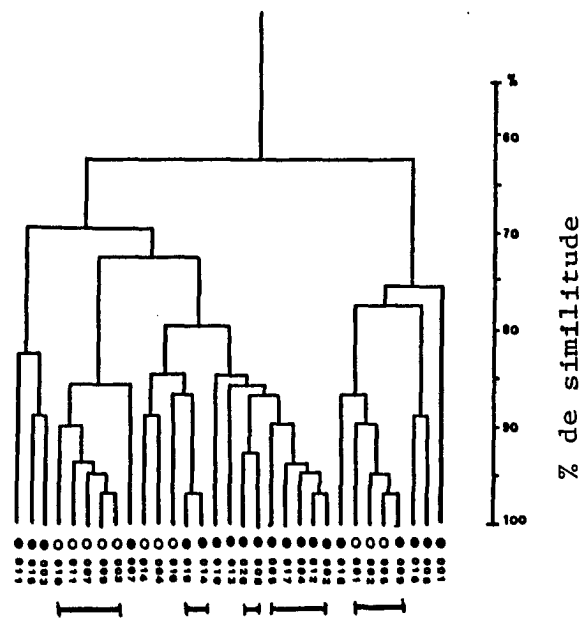
Dendrogramme N° 1



Dendrogramme N° 2



Dendrogramme N° 3



Dendrogramme N° 4

Origine des souches

- Eau de mer surface 6 H
- Eau de mer surface 18 H
- Eau de mer conduite 6 H
- Eau de mer conduite 18 H

#### 1.4. CONCLUSIONS

Sur le plan physico-chimique, le site étudié présente peu de variations annuelles, si ce n'est pour la température qui fluctue entre 7,9°C et 17,6°C.

Les densités bactériennes, dans l'eau de mer comme dans les conduites, sont relativement stables et légèrement supérieures à  $10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup>, si l'on considère la microflore totale dénombrée en épifluorescence.

La microflore totale viable fluctue au cours de l'année, sans qu'aucune tendance saisonnière ne se manifeste. Les fluctuations sont plus sensibles dans le milieu extérieur que dans le système expérimental.

Sur le plan qualitatif, au cours d'une journée, il y a peu de variations de la structure des communautés bactériennes, dans le même compartiment : eau de mer ou système expérimental. Par contre, les peuplements bactériens de l'eau de mer alimentant les conduites apparaissent légèrement modifiés par rapport aux peuplements de l'eau de mer extérieure.

## 2 - VARIATIONS SAISONNIERES DE LA COLONISATION BACTERIENNE

### 2.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

L'étude quantitative du développement du biofilm bactérien a été réalisée dans l'enceinte d'aquaculture (site A), à l'aide du système expérimental composé de deux systèmes de prélèvements (Figure 2).

La colonisation des différents matériaux a été étudiée bimensuellement durant une année (mai 83 - mai 84), sur des périodes de 15 jours. Durant chaque période, 10 prélèvements ont été effectués aux temps suivants : 1 h - 6 h - 12 h - 1 J - 2 J - 4 J - 6 J - 8 J - 10 J - 15 J.

Ne possédant que deux systèmes de prélèvements, la période réelle d'échantillonnage s'étale sur trois semaines, par roulement successif des systèmes de prélèvements (Figure 12). Entre deux utilisations, chaque système est nettoyé à l'eau chlorée (12 %) à l'aide d'un écouvillon et abondamment

rincé à l'eau douce. Entre deux études bimensuelles, toute la conduite est nettoyée à l'eau chlorée, rincée, puis asséchée durant 15 jours.

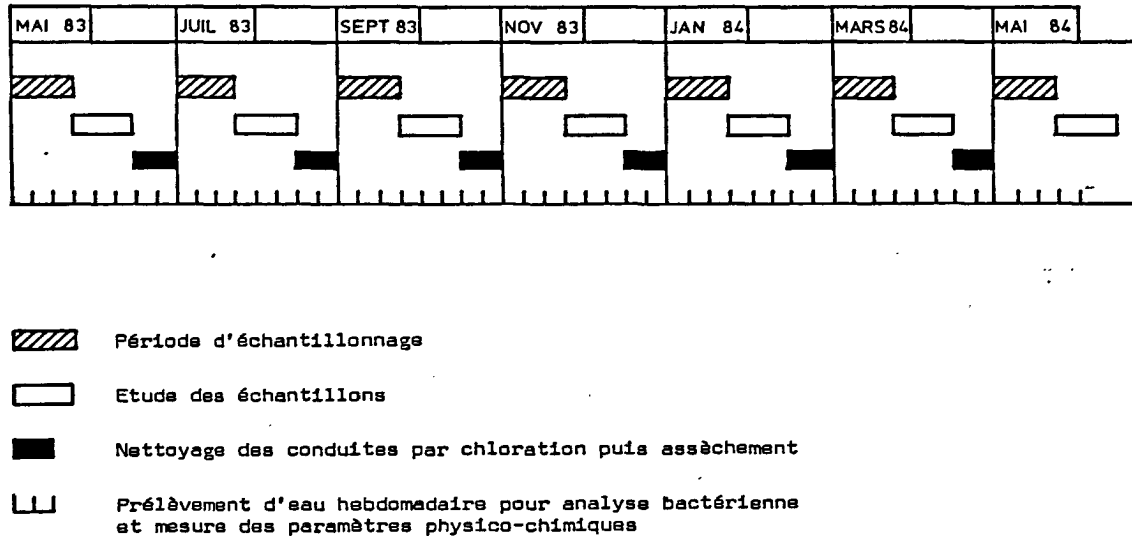


Figure 12 : Planning expérimental

## 2.2. ETUDE QUANTITATIVE

La colonisation des trois matériaux par les bactéries a été étudiée de mai 1983 à mai 1984. Cette étude concerne d'une part les variations quantitatives de la colonisation, et d'autre part les variations des taux de croissance du biofilm suivant les saisons.

### 2.2.1. Evolution des densités

#### - Mai 1983 (Figure 13 A)

La colonisation initiale sur les trois matériaux, après une heure d'immersion, est de  $10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>. Cette densité évolue peu pendant les premières 24 heures, puis s'accroît rapidement pour atteindre en moyenne  $2.10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup> après 10 jours d'immersion, sur les trois matériaux.

- Juillet 1983 (Figure 13 B)

La colonisation initiale sur l'aluminium est de  $3.10^3$  cellules.cm<sup>-2</sup>, soit légèrement inférieure à celle observée sur les deux autres supports ( $2,5.10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>). Pendant la première journée, les densités restent pratiquement stationnaires, sauf pour l'aluminium où quelques fluctuations sont observées. Après quatre jours d'immersion, la densité moyenne sur les trois matériaux est de  $7,5.10^6$  cellules .cm<sup>-2</sup>. Elle augmente ensuite légèrement pour être supérieure à  $10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup> après quinze jours d'immersion.

- Septembre 1983 (Figure 13 C)

La densité initiale est de  $2,4.10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup> sauf pour l'aluminium,  $1,9.10^3$ . Durant les premières 24 heures, la colonisation évolue lentement. L'acier inoxydable et les filtres Nuclepore atteignent leur maximum de colonisation ( $4.10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>) après quatre jours d'immersion, alors que l'aluminium ne le fait qu'après six jours ( $2,3.10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup>). Après 15 jours d'immersion, les densités sur les trois matériaux sont en moyenne de  $4,2.10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>.

- Novembre 1984 (Figure 13 D)

Dès une heure d'immersion, la densité bactérienne est de  $1,5.10^3$  cellules .cm<sup>-2</sup> sauf pour les filtres Nuclepore ( $2,3.10^3$  cellules.cm<sup>-2</sup>). La colonisation est ensuite lente et continue, pour atteindre en moyenne  $3,4.10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup> après quinze jours d'immersion, pour les trois supports.

- Janvier 1984 (Figure 13 E)

Au début des immersions,  $7,5.10^3$  cellules.cm<sup>-2</sup> sont présentes en moyenne sur les trois substrats. L'augmentation de la colonisation est lente et ne permet d'atteindre que  $4.10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup> en fin d'expérience sauf pour l'aluminium ( $2,5.10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>).

- Mars 1984 (Figure 13 F)

La colonisation initiale se situe entre  $1,1.10^4$  et  $6,5.10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>. L'acier inoxydable atteint sa colonisation maximum ( $6,1.10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>) après dix jours d'immersion, ainsi que les filtres ( $1,5.10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>). L'aluminium se colonise plus longuement et une densité de  $1,6.10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup> est atteinte en fin d'expérience.

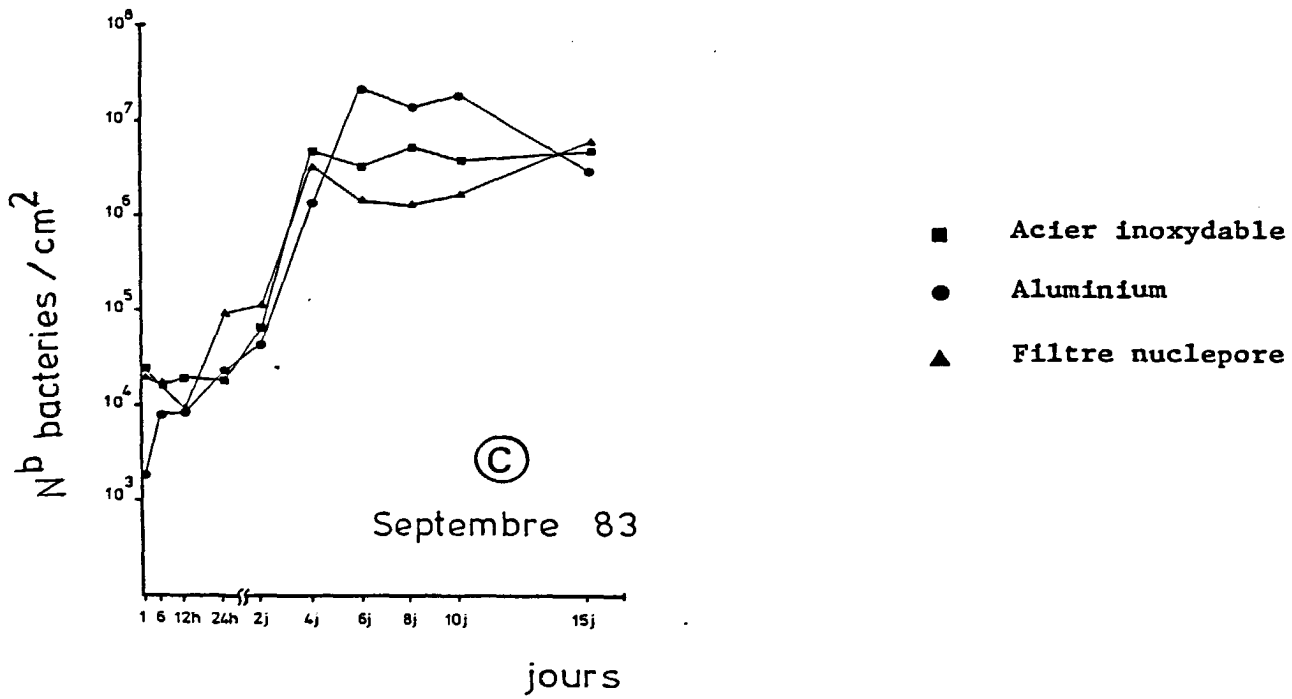
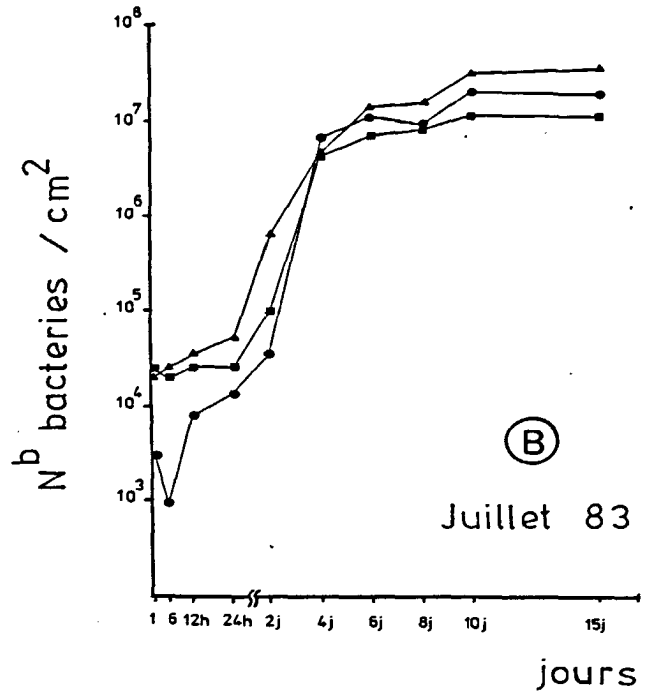
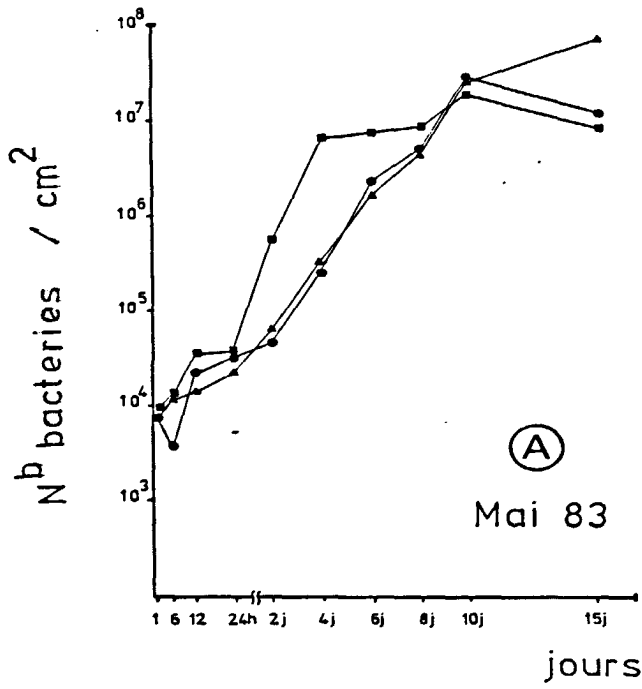


Figure 13 (A-B-C) : Colonisation bactérienne des trois matériaux suivant les saisons.

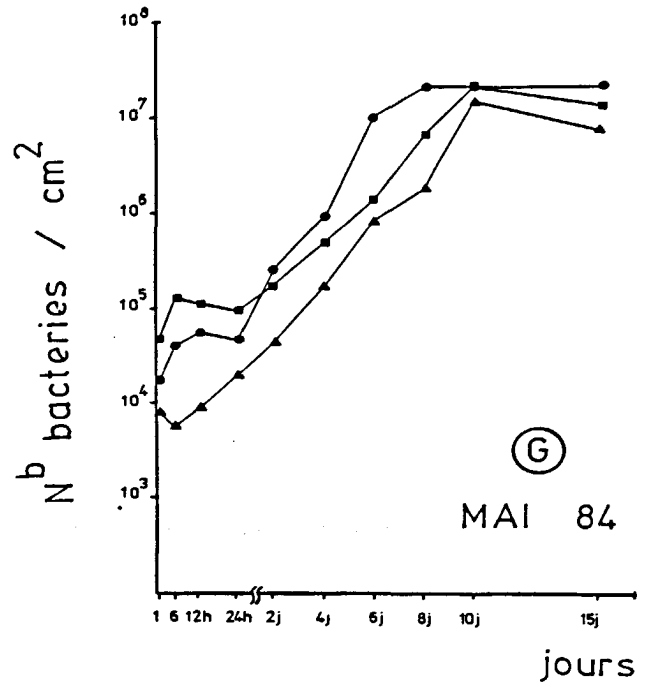
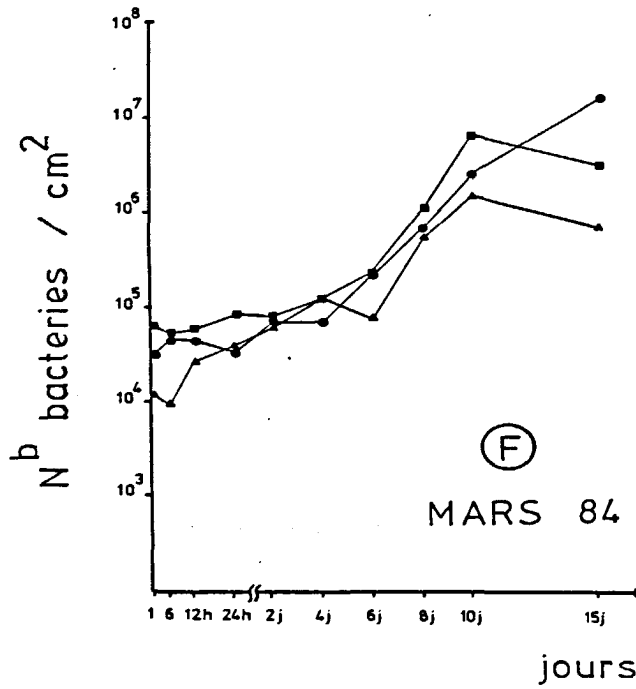
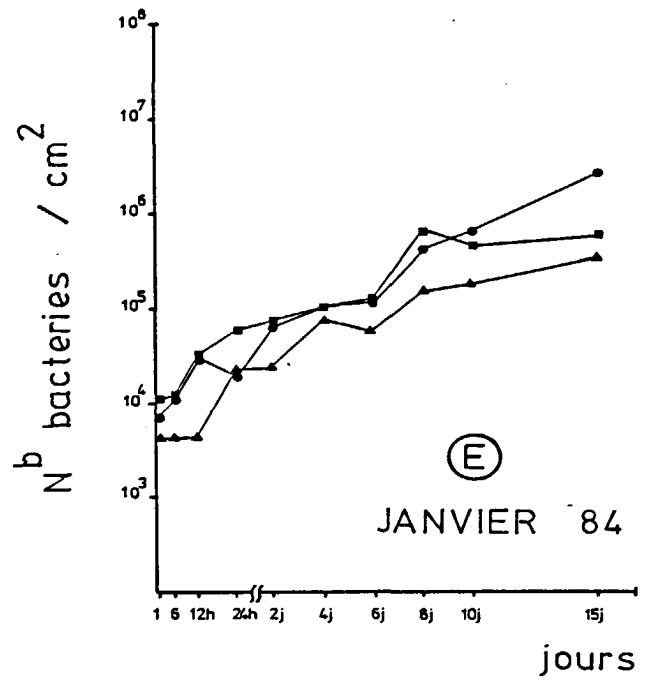
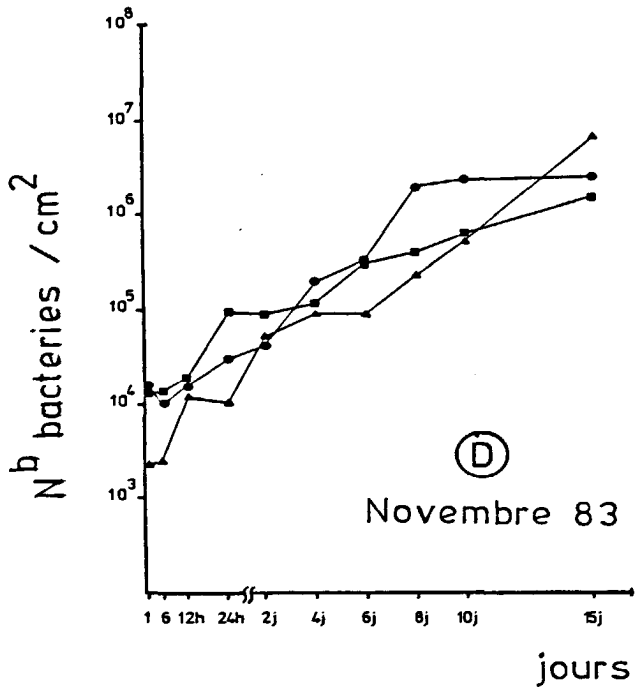


Figure 13 (D-E-F-G) : Colonisation bactérienne des trois matériaux suivant les saisons

- Mai 1984 (Figure 13 G)

La colonisation de départ varie de  $7,8.10^3$  à  $4,8.10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>. Durant les premières 24 heures, elle évolue peu, sauf pour les filtres. Les densités maximum sont atteintes pour les trois matériaux ( $2.10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup>) après dix jours d'immersion.

En première approximation, quelle que soit la saison d'expérimentation, l'évolution de la colonisation bactérienne est sensiblement identique pour les trois matériaux. Afin de synthétiser les résultats précédents, les évolutions de la colonisation des filtres Nucléopore, aux différentes saisons, sont donc représentées seules sur les figures 14 A et 14 B. Suivant la période d'immersion, la colonisation se fait plus ou moins rapidement et les densités obtenues en fin d'expérience sont plus ou moins élevées.

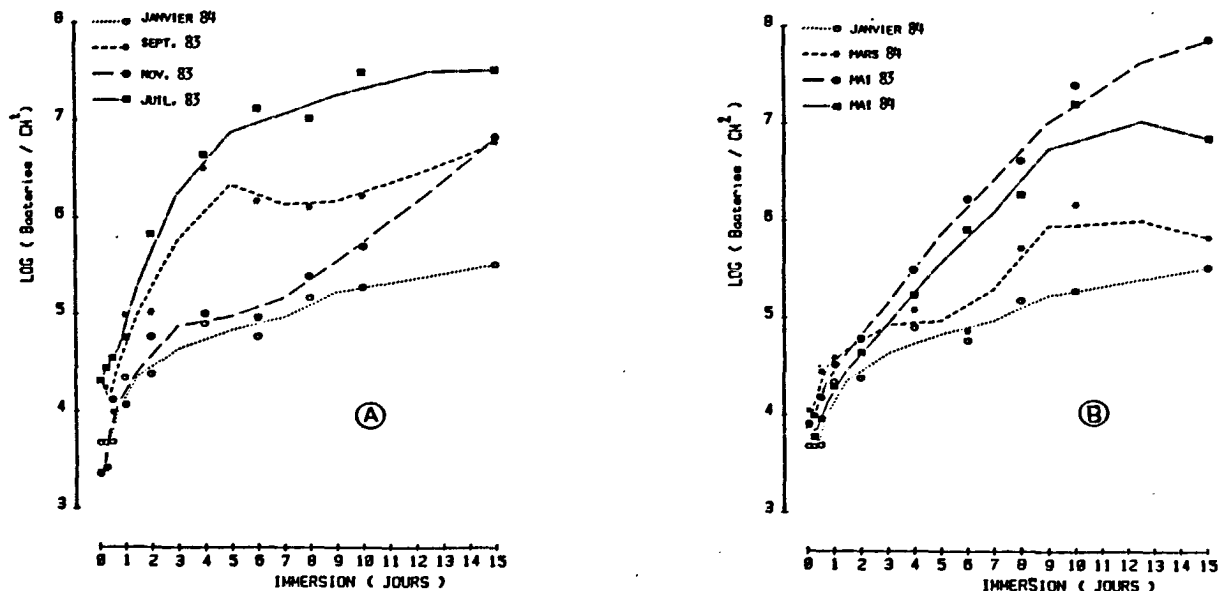


Figure 14 (A - B) : Courbes de synthèse de la colonisation bactérienne des filtres Nucléopore aux différentes saisons.

2.2.2. Evolution des vitesses de colonisation

Pour quatre périodes de l'année (juillet 83, janvier 84, mars 84 et mai 84), l'évolution des vitesses de colonisation au cours du temps d'immersion a été évaluée sur les différents matériaux. Ces vitesses sont exprimées

en nombre de bactéries fixées.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> et sont représentées sur les figures 15 A, B et C. Les valeurs reportées sur ces figures représentent l'évolution des vitesses de colonisation entre chaque temps de prélèvement successif. Elles ont été calculées de la façon suivante :

$$V_i = \frac{D_i - D_{i-1}}{T_i - T_{i-1}}$$

$V_i$  = vitesse de colonisation au temps  $i$  (Nombre cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>)

$D_i$  = densité bactérienne au temps  $i$  (Nombre cellules.cm<sup>-2</sup>)

$D_{i-1}$  = densité bactérienne au temps précédent  $i$  (Nbre cellules.cm<sup>-2</sup>)

$T_i$  et  $T_{i-1}$  = deux temps de prélèvements successifs (heures).

- Acier inoxydable (Figure 15 A)

Quelle que soit la saison, la vitesse de colonisation initiale, de 0 à 1 heure d'immersion, est très importante. Elle évolue entre  $1,1.10^4$  et  $6,2.10^4$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, puis ralentie dans les heures qui suivent de façon plus ou moins importante suivant la saison.

. *Juillet 1983* :

Durant la première journée d'immersion, la vitesse de colonisation est faible ( $181$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), puis s'accélère rapidement pour atteindre son maximum le 4e jour ( $8,4.10^4$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), puis diminue jusqu'à  $1,5.10^4$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> après le 15e jour.

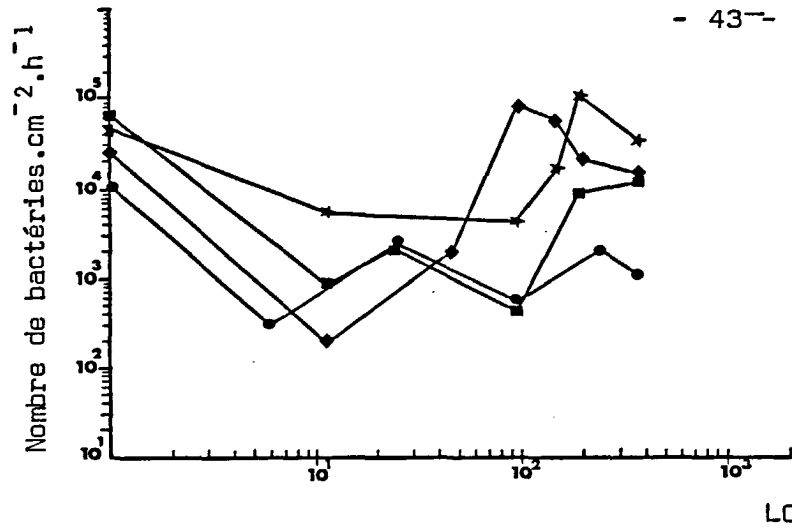
. *Janvier 1984* :

Quelle que soit la durée de l'immersion, la vitesse de colonisation bactérienne reste stable et évolue autour de  $10^3$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>.

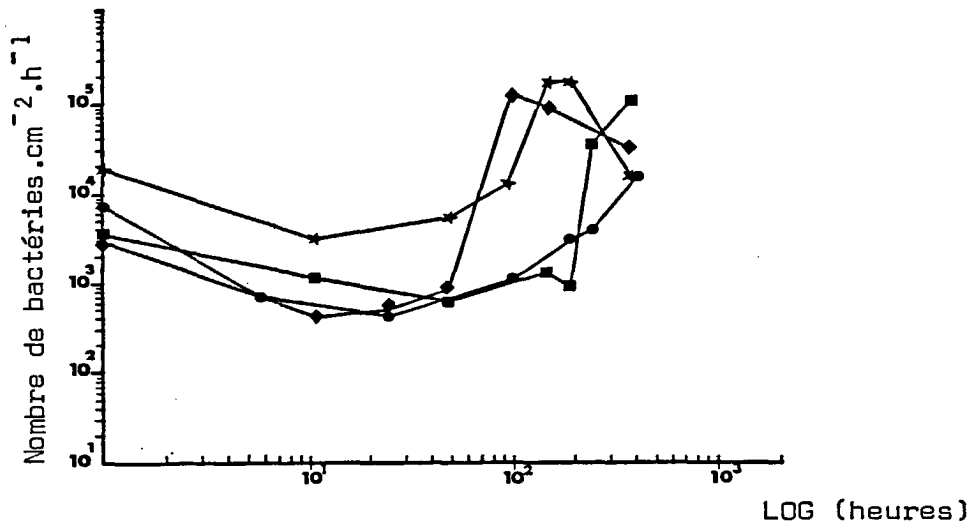
. *Mars 1984* :

Durant les quatre premiers jours d'immersion, elle évolue autour de  $10^3$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> puis augmente progressivement pour atteindre  $1,2.10^4$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, le 15e jour.

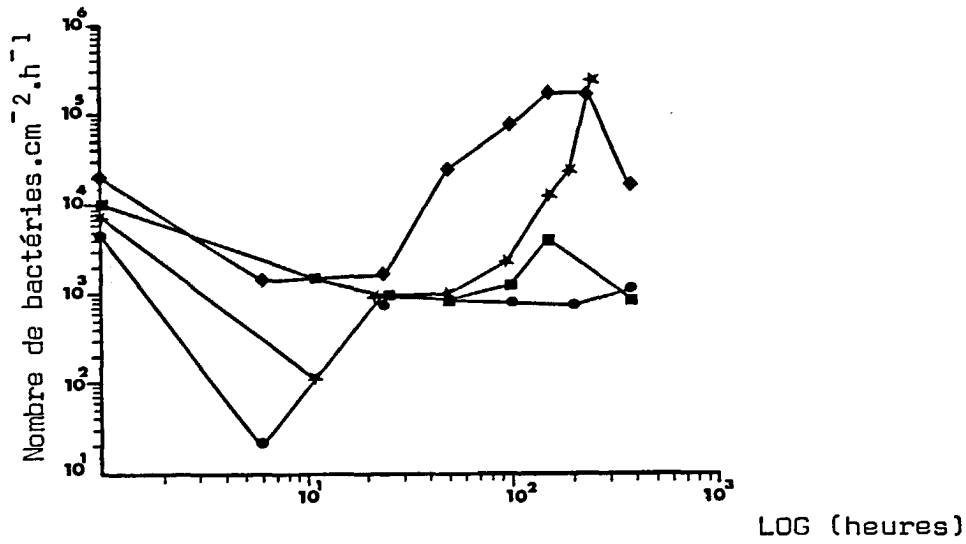




(A)  
ACIER INOXYDABLE



(B)  
ALUMINIUM



(C)  
FILTRE

(◆) Juillet 83 - (●) Janvier 84 - (■) Mars 84 - (★) Mai 84

Figure 15 : Evolution des vitesses de colonisation bactérienne sur les trois matériaux, à différentes saisons.

. *Mai 1984* :

La vitesse de colonisation reste importante pendant les premiers jours d'immersion ( $5,6 \cdot 10^3$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), mais ne commence à s'accélérer qu'après le 4e jour et devient maximum le 8e jour ( $1,1 \cdot 10^5$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>).

- Aluminium (Figure 15 B)

Mis à part le mois de janvier 84, quelle que soit la période d'immersion, le schéma d'évolution de la vitesse de colonisation du biofilm est sensiblement identique à celui de l'acier inoxydable, bien que les vitesses initiales soient plus faibles. Elles varient entre  $3 \cdot 10^3$  et  $1,8 \cdot 10^4$  bact.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. Les temps d'immersion auxquels les vitesses sont maximales sont les mêmes, mais les amplitudes atteintes sont généralement plus importantes. Elles sont respectivement de  $9,6 \cdot 10^4$  ;  $1,1 \cdot 10^5$  et  $1,8 \cdot 10^5$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> pour les mois de juillet, mars et mai. L'évolution des vitesses du mois de janvier est similaire à celle de mars, mais la valeur atteinte le 15e jour est plus faible ( $1,6 \cdot 10^4$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>).

- Filtres Nuclepore (Figure 15 C)

Les vitesses initiales de colonisation sont là encore importantes, environ  $10^4$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. Au cours des heures suivantes, les ralentissements les plus importants se développent en janvier et en mai.

. *Juillet 1983* :

Après le premier jour d'immersion, la vitesse de colonisation ( $1,4 \cdot 10^3$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>) augmente et atteint  $1,8 \cdot 10^5$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> le 6e jour. Elle se stabilise à cette valeur, puis diminue le 15e jour.

. *Janvier 1984* :

La vitesse de colonisation est très faible durant les premières heures d'immersion ( $20$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), puis se stabilise dès 24 heures à une valeur de  $10^3$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> environ.

. *Mars 1984* :

La vitesse de colonisation moyenne,  $10^3$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, augmente le 6e jour ( $4 \cdot 10^3$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), puis ralentie.

. Mai 1984 :

La vitesse de colonisation s'accélère de façon importante dès le 2<sup>e</sup> jour, pour atteindre un maximum de  $2,4 \cdot 10^5$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> le 10<sup>e</sup> jour.

Pour les trois matériaux, l'évolution de la vitesse de colonisation au cours du temps est sensiblement la même, mais varie suivant les saisons.

Les vitesses initiales, après 1 heure d'immersion, sont généralement importantes, puis baissent dans les heures qui suivent. Les vitesses maximales les plus importantes sont atteintes en juillet et en mai (environ  $10^5$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>). Mais ces valeurs sont atteintes, en moyenne, en quatre jours au mois de juillet et en huit jours au mois de mai. En mars, la vitesse maximum est plus faible, en moyenne  $4 \cdot 10^4$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> pour les trois matériaux et elle n'est atteinte qu'après 15 jours d'immersion. En janvier, la vitesse de colonisation semble stable et évolue autour de  $10^3$  bact.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>, sauf pour l'aluminium.

## 2.3. ETUDE MORPHOLOGIQUE

### 2.3.1. Description des principaux types morphologiques

Au cours des immersions, les différents substrats sont colonisés par des bactéries de formes variées. Pour simplification, elles ont été regroupées en cinq grands types morphologiques, chacun d'eux pouvant renfermer différentes formes.

#### - Formes sphériques

Le diamètre de ces cellules coccoïdes varie en moyenne entre 0,3 et 0,5 µm (Planche 1, A).

#### - Formes en bâtonnets

Ce type morphologique a été divisé en deux groupes distincts, en fonction de leur mode de fixation :

##### . *Cellules fixées horizontalement sur le support :*

Les longueurs de ces bacilles sont généralement comprises entre 1,1 et 2,4 µm et les largeurs entre 0,2 et 0,5 µm (Planche 1, B et C). Certains spécimens assez rares peuvent avoir une longueur de 7 à 8 µm.

. *Cellules fixées verticalement sur le support ("polaires") :*

Ces bactéries ont une longueur de 0,8 à 1  $\mu\text{m}$  et une largeur moyenne de 0,3  $\mu\text{m}$ . Elles peuvent s'apparenter au genre *Flexibacter* sp. ou *Leucothrix* sous leurs formes unicellulaires (Planche 1, C).

- Formes pédonculées

Tous les types bactériens présentant un ou plusieurs appendices terminaux ont été rassemblés dans ce groupe.

Ceux qui ne présentent qu'un pédoncule de longueur variable (ici de 2 à 3  $\mu\text{m}$ ) peuvent s'apparenter aux genres *Caulobacter* sp. (Planche 1, D).

Certaines bactéries, à plusieurs appendices et de morphologies très variables, ressemblent aux formes bourgeonnantes du genre *Hyphomicrobium* sp. La longueur de ces cellules peut varier de 2,5 à 4,5  $\mu\text{m}$  et la largeur de 1 à 2  $\mu\text{m}$ . La largeur de l'hyphe est généralement de 0,5  $\mu\text{m}$ . Certaines cellules plus petites (0,3 à 0,1  $\mu\text{m}$  de long) possèdent deux pédoncules opposés et se divisent par scissiparité (Planche 1, E et F).

- Formes filamenteuses

Ce groupe renferme tous les types bactériens qui se présentent sous forme de chaînes de cellules. Certaines formes sont attachées par l'une de leurs extrémités et pourvues d'une gaine qui masque les cellules en microscopie électronique à balayage. Elles peuvent s'apparenter à des genres comme *Flexithrix* ou *Leptothrix* (Planche 2, A, D et F). D'autres, au contraire, n'ont pas de gaine et les cellules restent toujours apparentes ; elles ressemblent aux genres *Leucothrix* sp. La largeur des cellules est très variable et est généralement comprise entre 0,3 et 5  $\mu\text{m}$ . Certaines chaînes sont composées de 100 à 180 cellules et peuvent mesurer 300 à 500  $\mu\text{m}$  de long.

Certaines formes filamenteuses non identifiées peuvent présenter des appendices qui sont répartis sur toute leur longueur. Ces appendices peuvent être soit des ramifications, soit des bactéries épiphytes en forme de bâtonnet (Planche 2, B).

Parmi ces filaments, certains présentent des ramifications et peuvent appartenir aux groupes des *Actinomycètes* ou des champignons.

L'été, ces formes filamenteuses peuvent se développer énormément et devenir visibles à l'oeil nu (Planche 3, A).

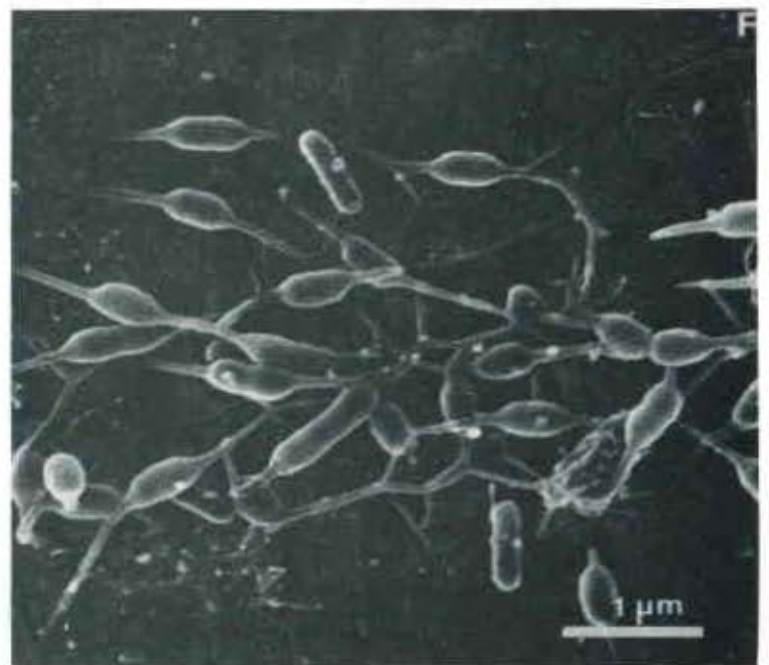
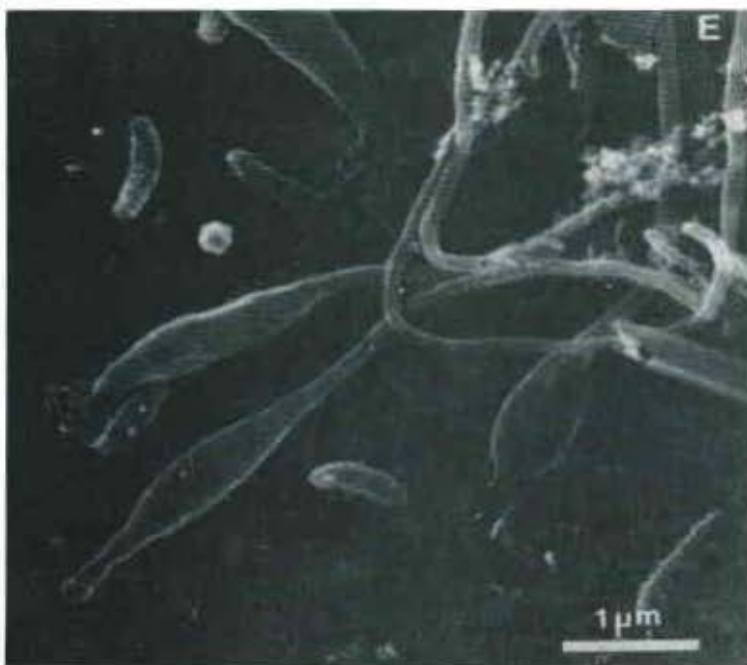
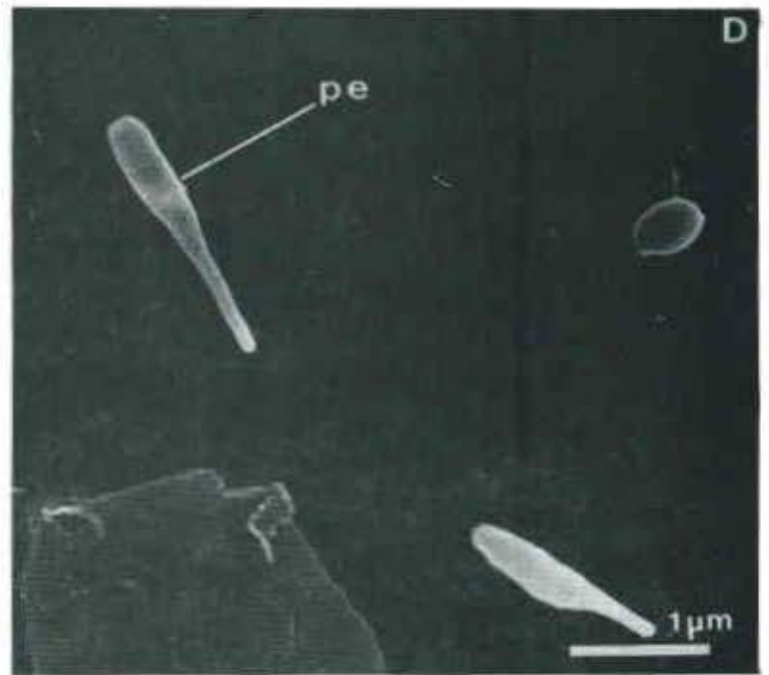
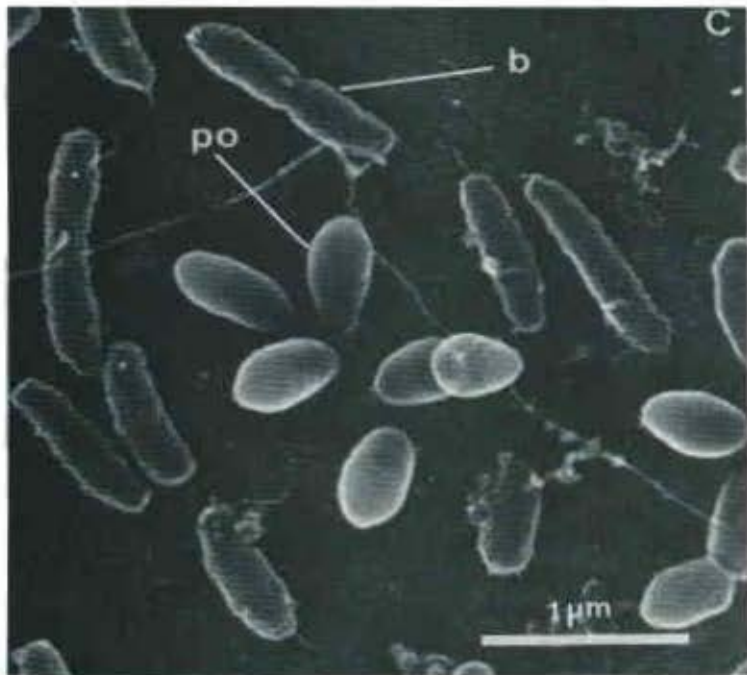
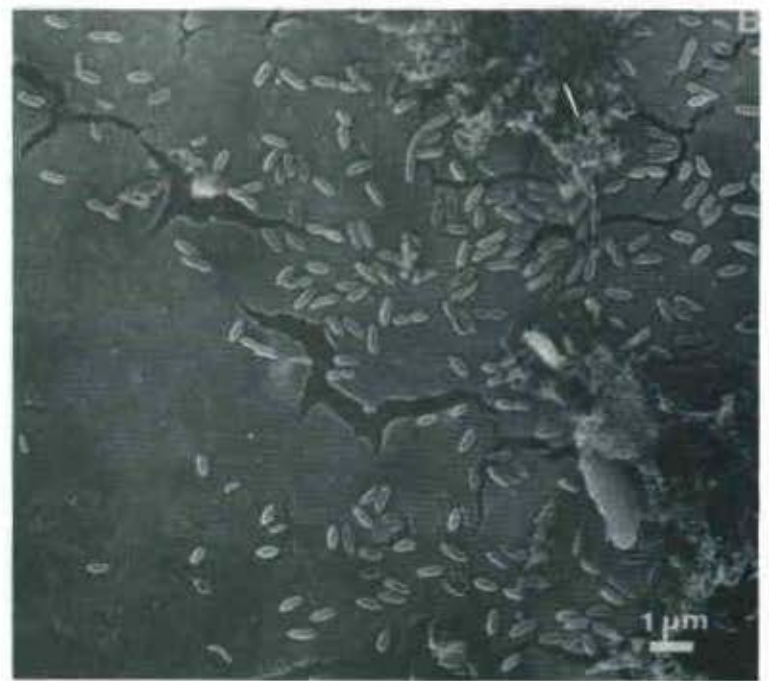
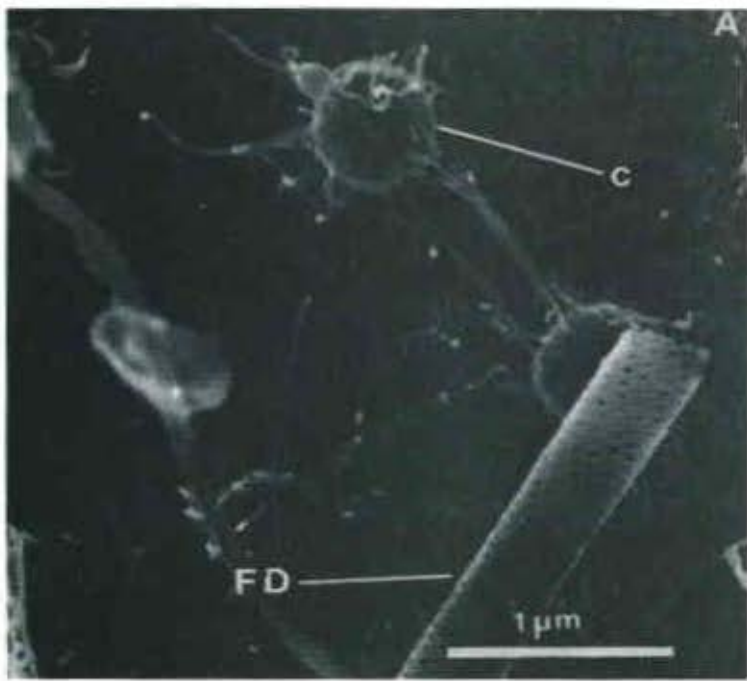
A	B
C	D
E	F

PLANCHE 1

---

(Photos prises au microscope électronique à balayage)

- A : Echantillon d'acier inoxydable immergé 15 jours, en mai 83.  
Grossissement : 26 800 x.  
Bactéries coccoïdes (c) fixées à la surface de l'échantillon et reliées entre elles par des sécrétions extracellulaires.  
Fragment d'un test de diatomée (FD).
- B : Echantillon d'aluminium immergé 6 jours, en mai 84.  
Grossissement : 5 000 x.  
Bacilles fixés à la surface de l'échantillon. Des dépôts organiques et/ou inorganiques, ainsi que des traces de corrosion sont aussi visibles.
- C : Echantillon d'aluminium immergé 6 jours, en juillet 83.  
Grossissement : 24 000 x.  
Bactéries "polaires" (po) fixées au support par un pôle de la cellule et des bacilles dont l'un d'entre eux présente une forme de division (b).
- D : Echantillon d'acier inoxydable immergé 15 jours, en mai 84.  
Grossissement : 16 300 x.  
pe : bactérie pédonculée du type *Caulobacter*.
- E : Echantillon d'aluminium immergé 8 jours, en juillet 83.  
Grossissement : 16 300 x.  
Bactéries pédonculées de type *Hyphomicrobium* et bacilles fixés au support.
- F : Echantillon d'acier inoxydable immergé 6 jours, en mai 83.  
Grossissement : 16 000 x.  
Bactéries possédant deux pédoncules opposés. Certaines d'entre elles montrent une forme de division binaire par scissiparité (d).

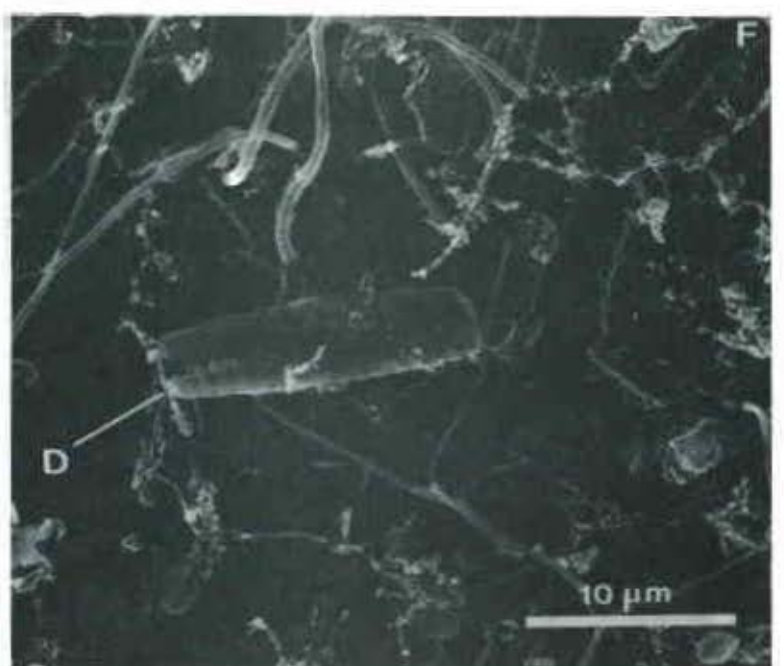
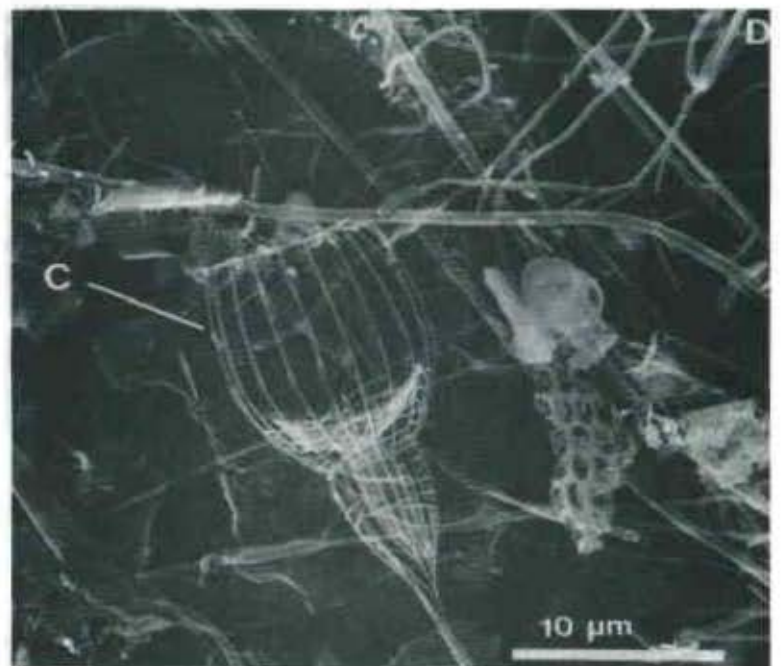
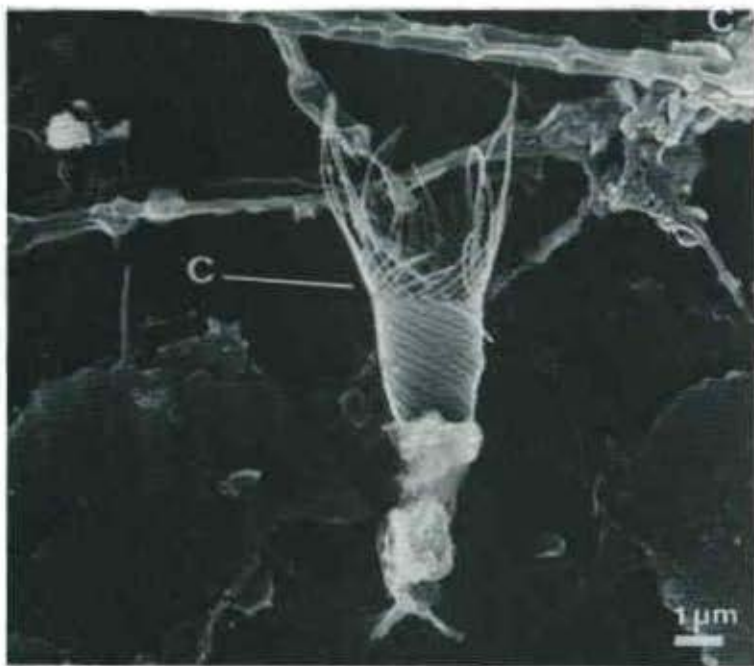
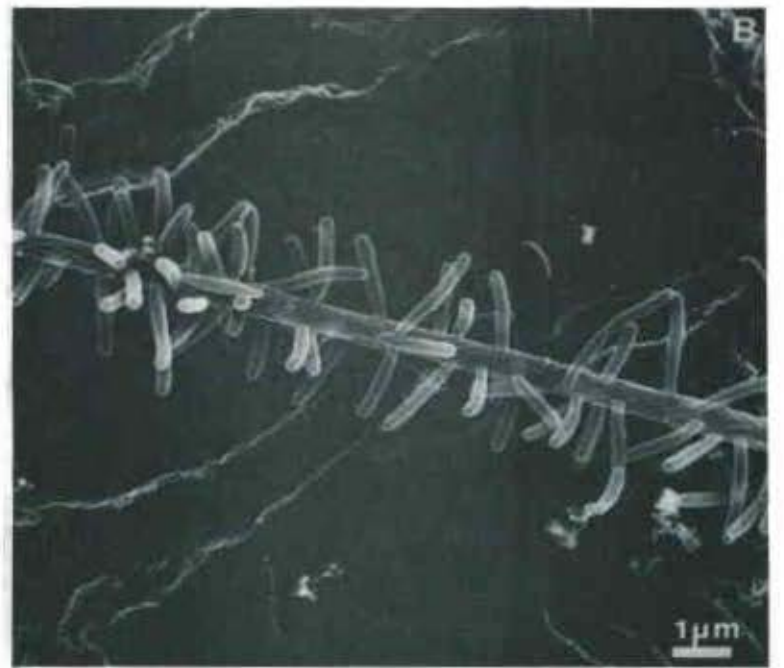


A	B
C	D
E	F

PLANCHE 2

(Photos prises au microscope électronique à balayage)

- A : Echantillon d'aluminium immergé 10 jours, en mai 83.  
Grossissement : 4 900 x.  
Enchevêtrement de microorganismes de forme filamenteuse et bacilles fixés le long de lignes de fractures de corrosion du support métallique.
- B : Echantillon d'aluminium immergé 10 jours, en mai 83.  
Grossissement : 4 900 x.  
Microorganisme non déterminé de forme verticale.
- C : Echantillon d'aluminium immergé 10 jours, en mai 84.  
Grossissement : 5 900 x.  
Cilié sessile (c) fixé à la surface du support parmi des particules (P).  
Quelques bacilles sont visibles (b).
- D : Echantillon d'acier inoxydable immergé 15 jours, en mai 84.  
Grossissement : 2 400 x.  
Cilié sessile (c) fixé à la surface du matériel. Outre ce microorganisme, des formes filamenteuses, des bacilles, des bactéries pédonculées, ainsi qu'un fragment de diatomée sont aussi visibles.
- E : Echantillon d'aluminium immergé 15 jours, en mai 83.  
Grossissement : 10 300x.  
Radiolaire.
- F : Echantillon d'aluminium immergé 15 jours en mai 83.  
Grossissement : 2 400 x.  
Aspect général du biofilm, bactéries filamenteuses, traces de corrosion.  
D : fragment de diatomée.





A part les bactéries, d'autres microorganismes ont été rencontrés, mais seulement en période estivale et après 10 et 15 jours d'immersion :

- certaines formes de ciliés fixés, de 10 à 20  $\mu\text{m}$  de longueur (Planche 2, C et D) ;
- une forme de radiolaire de diamètre 5  $\mu\text{m}$  (Planche 2, E).

Quel que soit le temps d'immersion et la saison, l'étude de filtres Nucleopore en microscopie à épifluorescence, sans coloration à l'acridine orange, a permis de montrer qu'aucune algue unicellulaire vivante ne s'est jamais fixée sur les échantillons. Seuls des fragments de tests ou des tests abimés de diatomées, piégés par le biofilm, ont été observés en microscopie électronique à balayage (Planche 1 A et 2 F).

Toutes les mesures citées ci-dessus ont été effectuées à partir de photographies prises soit au microscope électronique à balayage, soit au microscope à épifluorescence.

Les types morphologiques bactériens qui se fixent les premiers et qui restent généralement prédominants sont les formes en bâtonnets et sphériques. Les formes filamenteuses, pédonculées et "polaires" se fixent plus tardivement et dans des proportions moins importantes.

Suivant la période d'échantillonnage, certaines variations sont apparues au niveau de l'évolution de la composition morphologique du biofilm.

### 2.3.2. Variations saisonnières

Pour chaque période d'échantillonnage, chaque type morphologique a été dénombré séparément afin de calculer le pourcentage que représente chaque forme au sein de la flore bactérienne colonisatrice.

Les évolutions de ces pourcentages, en fonction du temps d'immersion et de la nature du substrat, sont représentées sur les figures 16 A à F.

#### - Juillet 1983 (Figure 16 A)

##### . *Acier inoxydable* :

Quel que soit le temps d'immersion, les formes en bâtonnets sont les plus représentées, ainsi que les coques. Dès six heures d'immersion, les

formes filamenteuses commencent à se développer (16 %). Leur importance croît rapidement pour atteindre un maximum (40 %) après un jour d'immersion, puis diminue, alors que les autres types se fixent au 4<sup>e</sup> jour et en faible quantité (entre 1 et 12 %).

. *Aluminium* :

Durant toute l'expérience, les formes en bâtonnets prédominent (100 % pendant les six premières heures d'immersion). Les formes filamenteuses se fixent de façon importante (20 et 30 %) au cours du 1<sup>er</sup> et du 2<sup>e</sup> jour, puis régressent rapidement (1 à 3 %). Le même phénomène se produit pour les formes "polaires" dans des proportions plus faibles (1 à 9 %).

. *Filtre* :

Ce sont les formes sphériques qui prédominent durant la première journée d'immersion (58 à 66 %), puis les formes en bâtonnets (54 à 87 %). Les autres types sont toujours faiblement représentés (1 à 4 %).

- Septembre 1983 (Figure 16 B)

. *Acier inoxydable* :

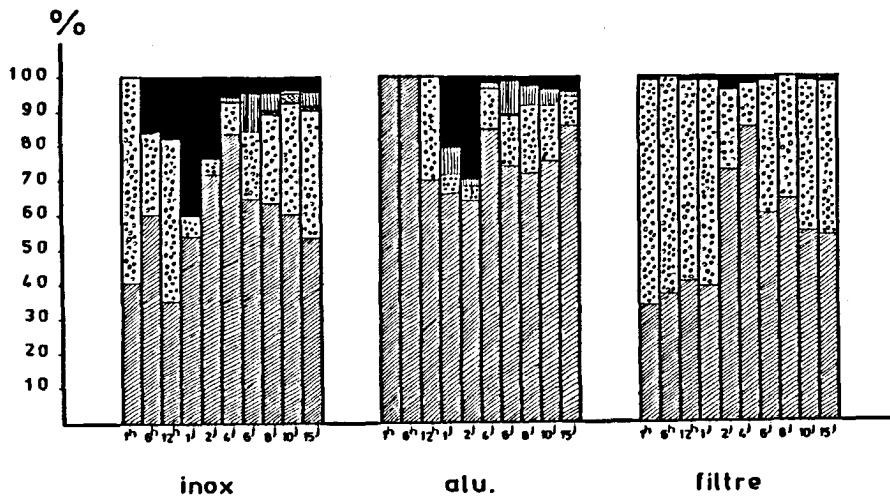
Quel que soit le temps d'immersion, les bacilles sont présents en plus grande quantité (57 à 85 %). A part pour les coques et les formes pédonculées, il faut attendre le 4<sup>e</sup> jour pour qu'apparaissent les autres types, en faible proportion (0,5 à 8 %). Celle-ci augmente ensuite progressivement avec le temps d'immersion.

. *Aluminium* :

Après une heure d'immersion, le biofilm n'est composé que de bactéries sphériques. La composition de la population évolue ensuite de façon hétérogène. Après 15 jours d'immersion, chaque groupe est bien représenté (de 15 à 35 %).

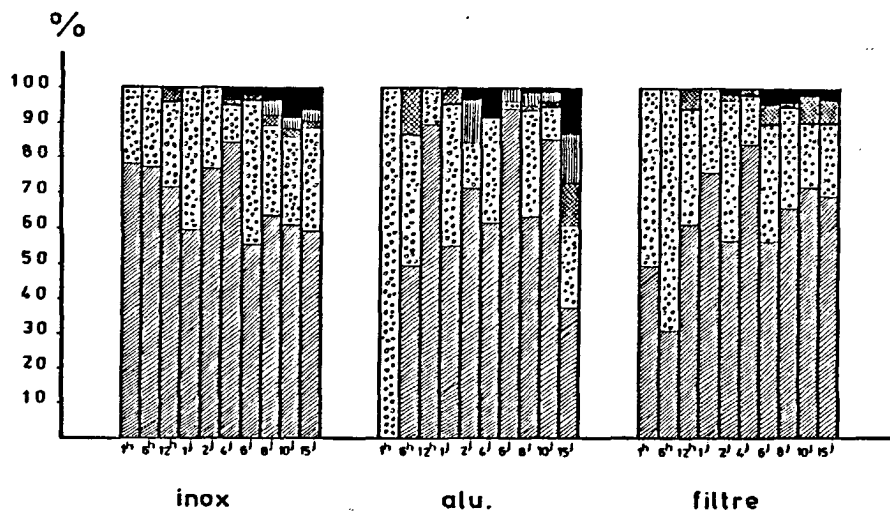
. *Filtre* :

L'évolution de la colonisation est sensiblement identique à celle de l'acier inoxydable.



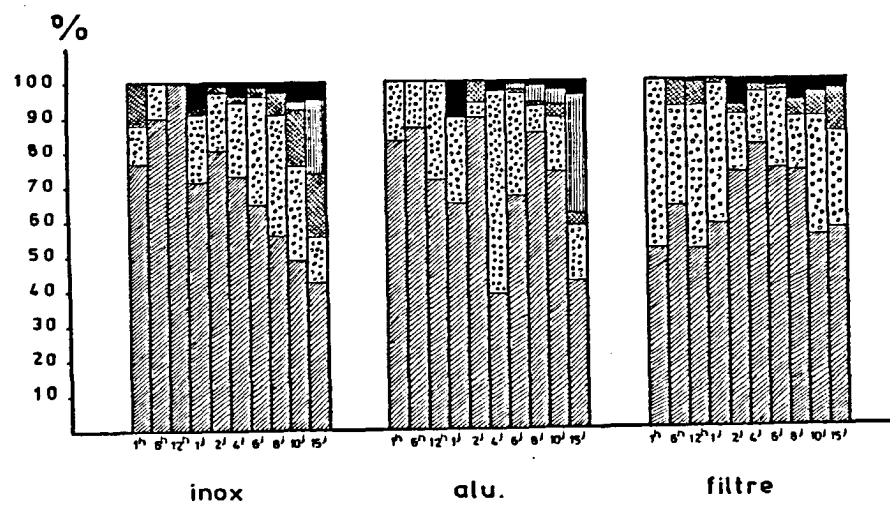
JUILLET 83

(A)



SEPTEMBRE 83

(B)



NOVEMBRE 83

(C)

Figure 16 (A-B-C) : Variations saisonnières de la composition morphologique du biofilm.

◉◉◉ : Formes sphérique ou coques.

▨ : Formes pédonculées.

▧ : Formes "polaires".

■ : Formes filamenteuses.

▩ : Formes en batonnets fixées horizontalement ou bacilles.

- Novembre 1983 (Figure 16 C)

. *Acier inoxydable* :

Après la fixation massive des bacilles, les autres types morphologiques apparaissent après un jour d'immersion (sauf pour les formes pédonculées). Leurs proportions augmentent ensuite de façon régulière au cours du temps.

. *Aluminium* :

Même schéma d'évolution que l'acier, bien que les formes "polaires" se développent beaucoup (34 %) après 15 jours d'immersion.

. *Filtre* :

Les bacilles sont toujours prédominants (52 à 83 %) tandis que les autres types morphologiques se fixent rapidement en plus faible proportion.

- Janvier 1984 (Figure 16 D)

. *Acier inoxydable* :

Ce n'est qu'après le 4e jour d'immersion que les formes filamenteuses et pédonculées apparaissent et le 15e jour pour les formes "polaires". La proportion de ces différents types augmente progressivement au cours du temps (de 7 à 20 % le 15e jour).

. *Aluminium* :

Les formes pédonculées, filamenteuses et "polaires" ne se fixent en quantité notable qu'après le 6e jour d'immersion.

. *Filtre* :

L'évolution de la colonisation est très similaire à celle de l'aluminium.

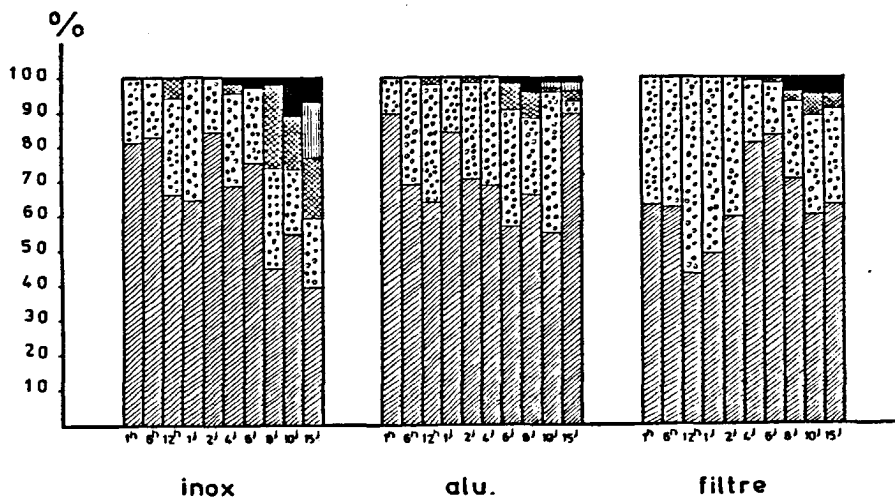
- Mars 1984 (Figure 16 E)

. *Acier inoxydable* :

Les formes filamenteuses et pédonculées se fixent dès six heures d'immersion. La proportion des bactéries pédonculées augmente très nettement

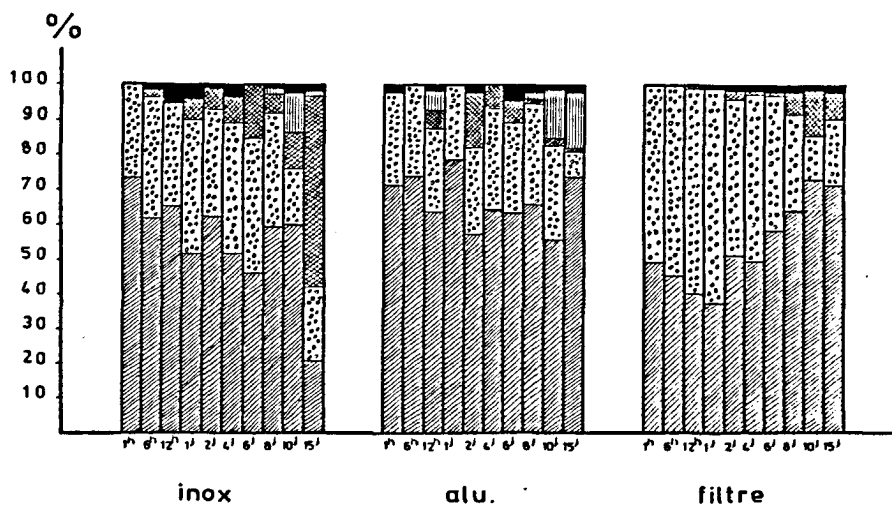
JANVIER 84

Ⓓ



MARS 84

Ⓔ



MAI 84

Ⓕ

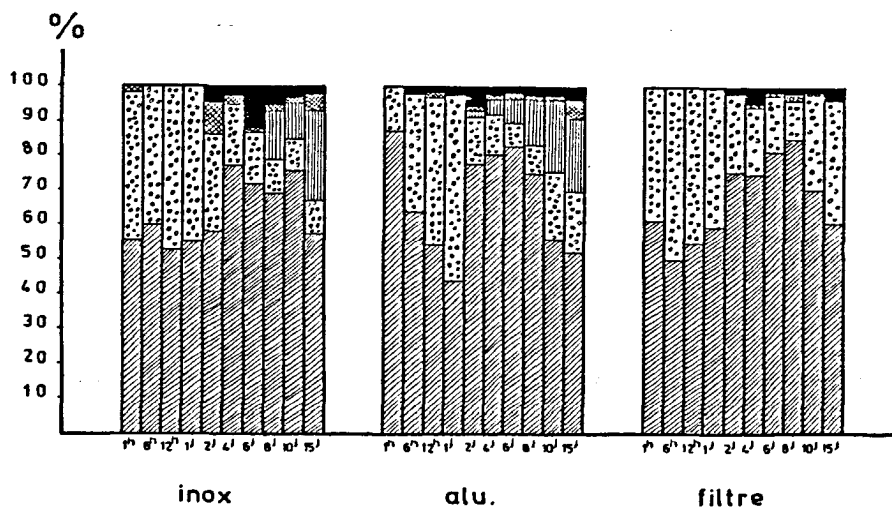


Figure 16 (D-E-F) : Variations saisonnières de la composition morphologique du biofilm.

- ◉◉◉ : Formes sphériques ou coques.
- ▣▣▣ : Formes pédonculées.
- ▤▤▤ : Formes "polaires".
- ▢▢▢ : Formes filamenteuses.
- ▧▧▧ : Formes en batonnets fixées horizontalement ou bacilles.

au cours du temps (55 % après 15 jours d'immersion). Les formes "polaires" ne se fixent qu'après huit jours d'immersion (1 %).

. *Aluminium* :

Toutes les formes se fixent rapidement et leurs proportions évoluent de façon hétérogène au cours du temps. Les formes "polaires" se fixent bien (12 %) après 10 jours d'immersion. La dominance des bacilles est constante (de 55 à 77 %).

. *Filtre* :

La colonisation par les coques et les bacilles est massive. Les formes pédonculées et filamenteuses ne se fixent, en faible quantité, qu'après le 2<sup>e</sup> jour d'immersion.

- Mai 1984 (Figure 16 F)

. *Acier inoxydable* :

Après une colonisation importante par les bacilles et les coques, les autres formes se fixent après deux jours d'immersion. Ce sont les formes "polaires" qui composent en grande partie (25 %) cette population secondaire.

. *Aluminium* :

Le schéma d'évolution est le même que celui de l'acier inoxydable.

. *Filtre* :

Au départ, les bacilles et les coques colonisent à eux seuls la surface. Les autres formes ne se fixent qu'après deux jours d'immersion, en faible nombre (0,5 à 2,5 %).

#### 2.4. EVOLUTION DU VOLUME CELLULAIRE DES BACTERIES FIXEES EN ETE ET EN HIVER

Les variations du volume des bacilles et des coques fixés à la surface des filtres Nuclepore, au cours du temps d'immersion, ont été évaluées en janvier et mai 1984. Les variations du volume de ces deux formes sont représentées sur les figures 17 et 18.

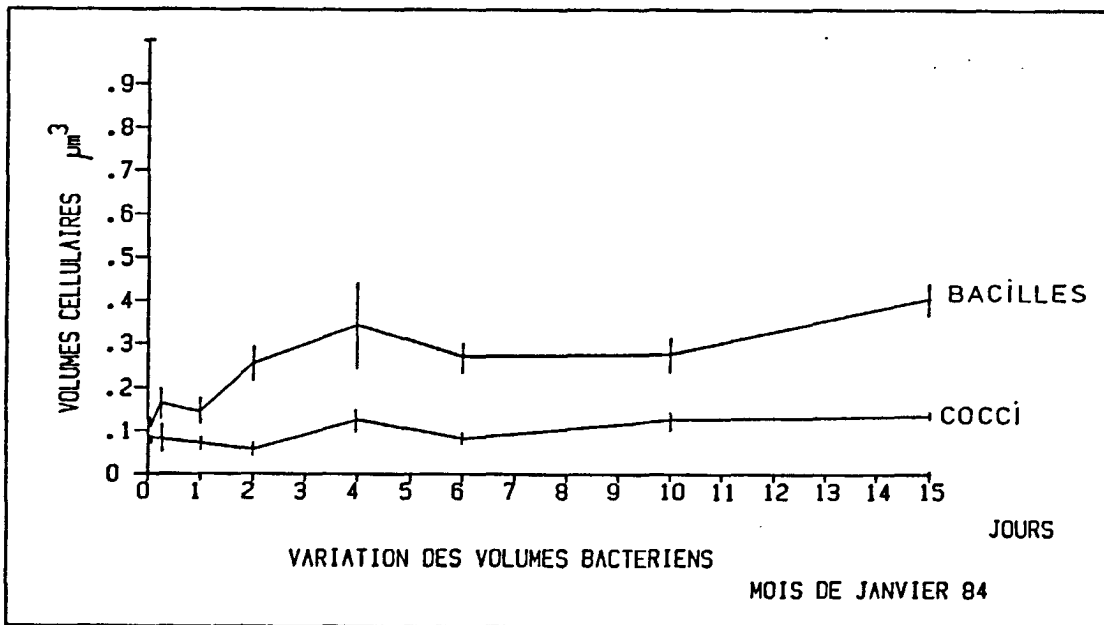


Figure 17 : Evolution des volumes cellulaires des bactéries fixées en hiver.

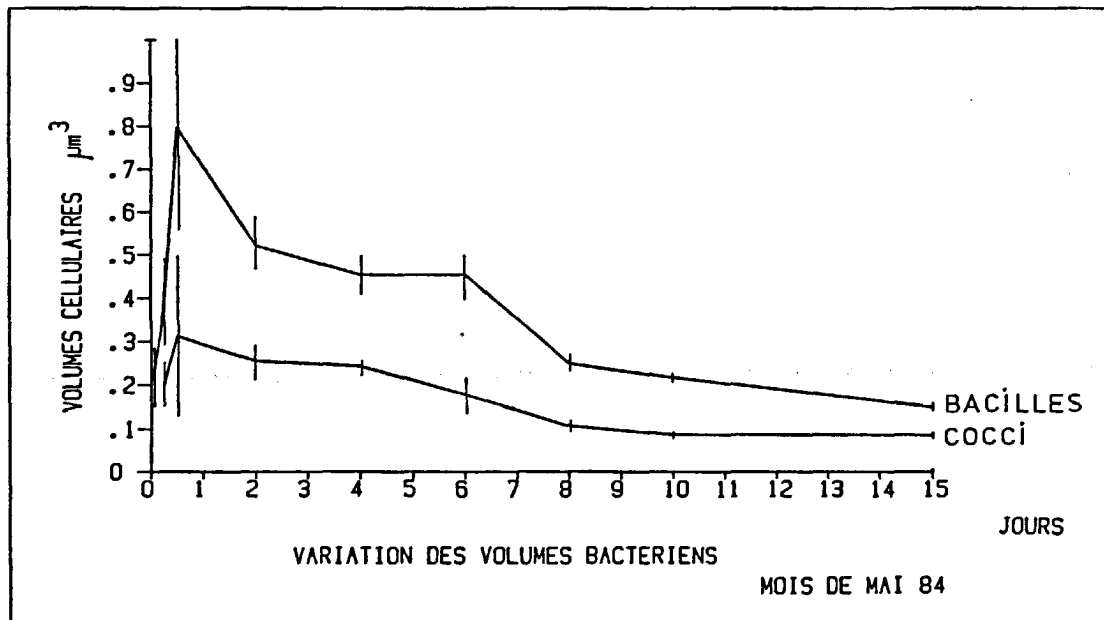


Figure 18 : Evolution des volumes cellulaires des bactéries fixées en été.

L'hypothèse de normalité de la distribution des classes de taille des cellules de chaque population a été vérifiée, par la méthode de la droite de Henri, sur un seul échantillon, composé de 200 valeurs (Annexe V). La distribution des volumes de chaque échantillon ayant très peu de chance de varier d'un prélèvement à un autre, ce résultat a été étendu à tous les échantillons, même à ceux qui ne sont représentés que par un faible nombre d'individus. Les nombres de cellules mesurées par échantillon sont indiqués dans le tableau 2. Chaque valeur moyenne reportée sur les graphiques est entourée par un intervalle de confiance à 95 %, calculé à partir de la table de Student.

<i>Temps d'immersion</i>	<i>Cocci Janvier 84</i>	<i>Bacilles Janvier 84</i>	<i>Cocci Mai 84</i>	<i>Bacilles Mai 84</i>
1 h	5	7	-	8
6 h	9	16	15	18
12 h	-	-	14	18
1 J	40	33	-	-
2 J	17	26	46	124
4 J	16	28	116	200
6 J	42	83	28	84
8 J	-	-	71	222
10 J	83	59	154	199
15 J	149	130	223	169

Tableau 2 : Nombre d'individus mesurés pour chaque prélèvement afin de déterminer le volume cellulaire moyen. Expériences des mois de janvier 84 et mai 84.



- Janvier 1984 (Figure 17)

Durant les premières heures d'immersion, les premières cellules qui se fixent sur les supports sont très petites et leur volume est voisin, quelle que soit leur forme, de  $0,1 \mu\text{m}^3$  pour les bacilles et  $0,08 \mu\text{m}^3$  pour les coques. Le volume des cellules fixées évolue ensuite de façon similaire pour les deux formes, mais suivant des amplitudes différentes. Il y a, tout d'abord, une augmentation du volume jusqu'à quatre jours d'immersion ( $0,34 \mu\text{m}^3$  pour les bacilles,  $0,12 \mu\text{m}^3$  pour les coques), puis une légère diminution le 6e jour, suivie d'une augmentation lente. Le 15e jour, le volume final de chaque forme est respectivement de  $0,4 \mu\text{m}^3$  pour les bacilles et  $0,13 \mu\text{m}^3$  pour les coques.

- Mai 1984 (Figure 18)

Dès les premières heures d'immersion, les volumes des cellules fixées sont, là encore, faibles et identiques pour les deux formes ( $0,2 \mu\text{m}^3$ ). Ils augmentent ensuite énormément à la 12e heure, surtout pour les bacilles ( $0,79 \mu\text{m}^3$  et  $0,31 \mu\text{m}^3$  pour les coques), puis diminuent régulièrement jusqu'à la fin de l'expérience, pour atteindre respectivement les valeurs de  $0,15 \mu\text{m}^3$  (bacilles) et  $0,08 \mu\text{m}^3$  (coques).

## 2.5. EVOLUTION DE LA DISTRIBUTION DES BACTERIES FIXEES

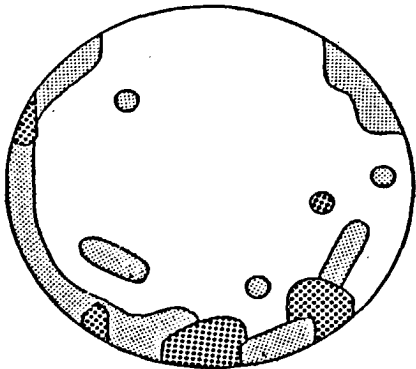
Les évolutions des microdistributions des bactéries fixées à la surface des différents échantillons, en fonction du temps d'immersion et de la direction du courant d'eau, sont représentées sur la figure 19. Durant cette expérience, effectuée en avril 1984, le bord des échantillons se trouvant face au courant d'eau a été repéré et considéré comme l'avant de l'échantillon, le bord sous le courant comme l'arrière. Les représentations graphiques ont été faites à partir des comptages de 100 champs microscopiques, sur chaque échantillon. Afin que ces figures soient comparables entre elles, les différentes zones de densité ont été calculées en fonction des nombres moyens de bactéries fixées sur l'échantillon considéré.

- Acier inoxydable

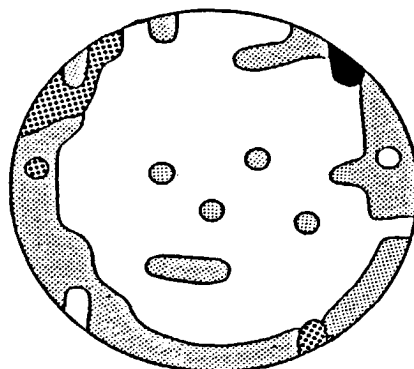
Après un jour d'immersion, les plus fortes densités sont concentrées à l'avant et sur les bords latéraux de l'échantillon. Au cours du temps, ce

ACIER INOX.

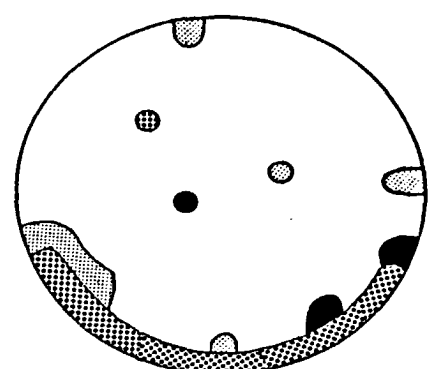
1 jour



4 jours

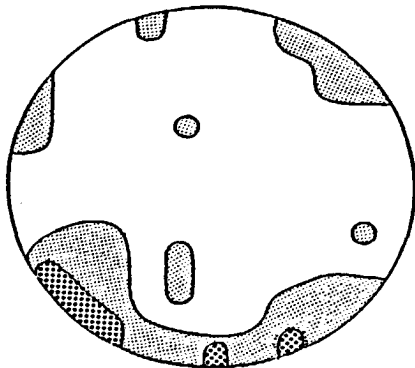


8 jours

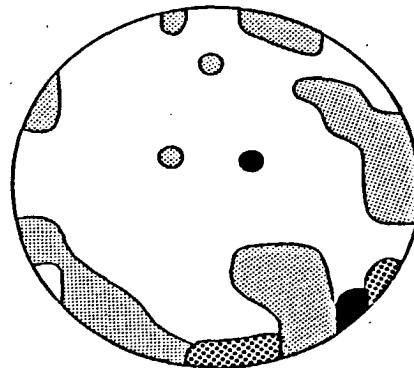


ALUMINIUM

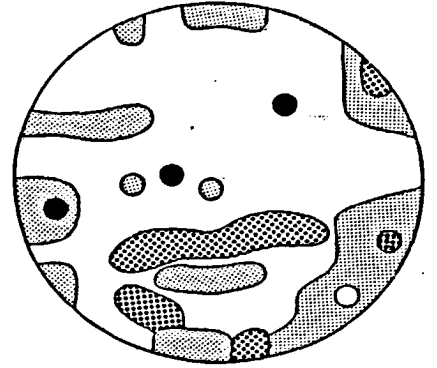
1 jour







4 jours



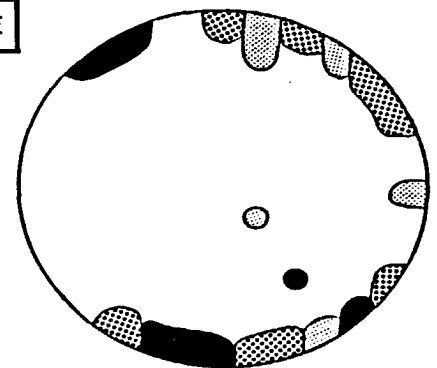
8 jours



-   $0 < \text{densité} < \bar{x}$
-   $\bar{x} < \text{densité} < 2.\bar{x}$
-   $2.\bar{x} < \text{densité} < 4.\bar{x}$
-   $4.\bar{x} < \text{densité}$

FILTRE NUCLEPORE

8 jours



$\bar{x}$  représente le nombre moyen de cellules fixées sur l'échantillon considéré.

↑ Sens du courant

Figure 19 : Evolution des microdistributions des bactéries à la surface des différents matériaux, au cours du temps d'immersion.

phénomène s'accroît et se développe aussi sur l'arrière. La surface centrale du plot est la moins colonisée, sauf au niveau de quelques zones ponctuelles.

- Aluminium

Après un jour d'immersion, les zones les plus denses sont celles qui font face au courant et celles de l'arrière de l'échantillon. A ces endroits, les densités augmentent au cours du temps et les surfaces de colonisation ponctuelle, au centre du support, sont plus larges que sur l'acier inoxydable.

- Filtre Nuclepore

Après huit jours d'immersion, seuls l'avant et l'arrière de l'échantillon sont colonisés de façon très importante.

Le phénomène de consolidation du biofilm, à l'avant de l'échantillon, face au courant d'eau, est illustré sur la photo A de la planche 3. Elle correspond à un échantillon d'acier inoxydable immergé dans le système expérimental pendant 15 jours, en juillet 1983.

Au centre des échantillons, les concentrations bactériennes ponctuelles peuvent avoir des formes différentes, suivant leur origine : concentrations sous forme de disques au niveau des zones de corrosion (Planche 3, B), ou sans raison apparente (Planche 3, C) ; concentrations sous forme de veines qui peuvent être influencées par les forces de friction du courant d'eau (Planche 3, D).

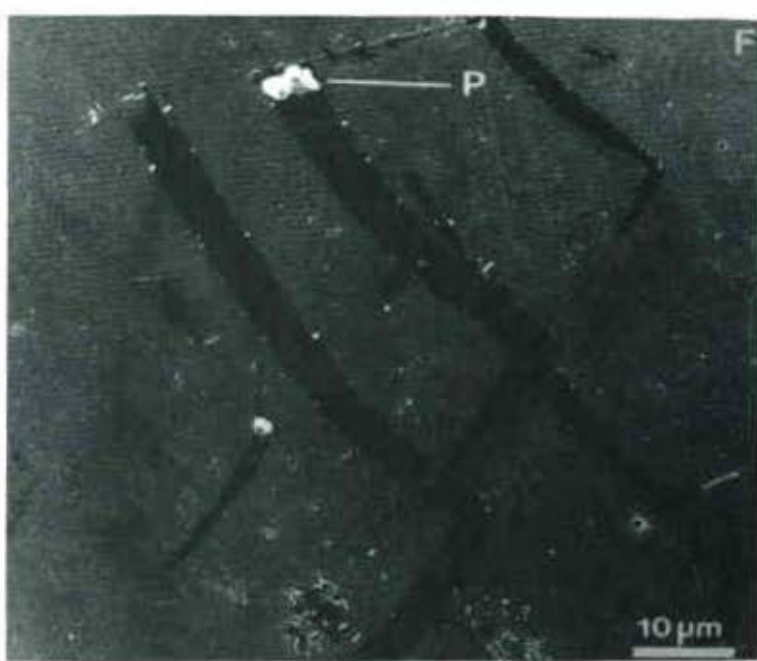
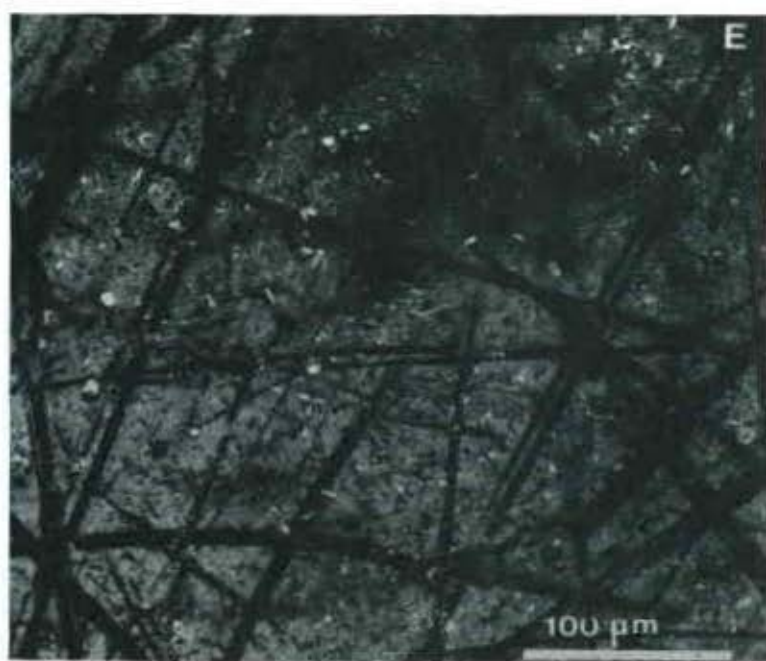
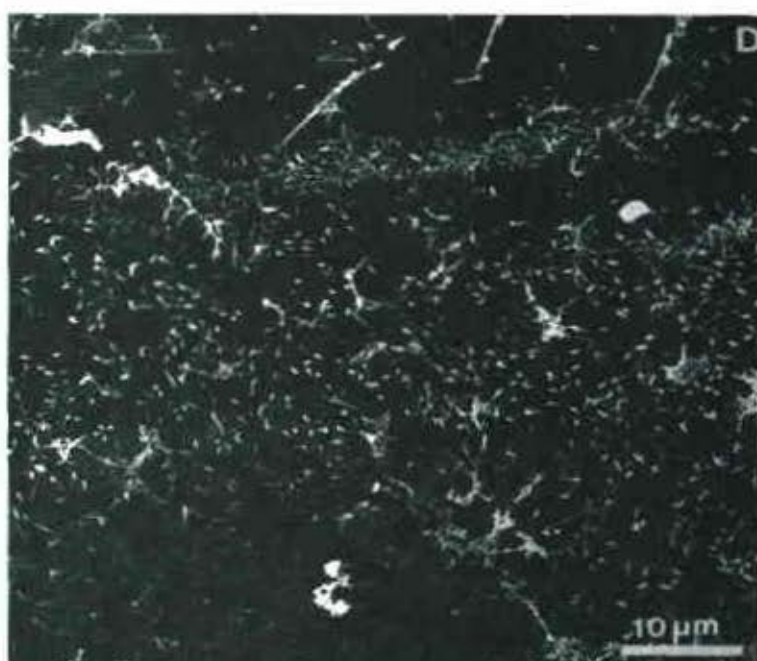
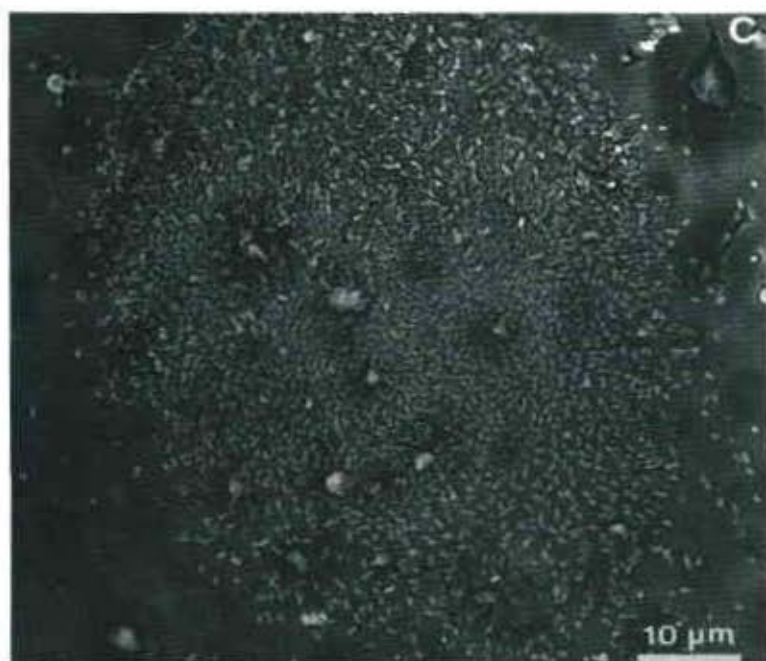
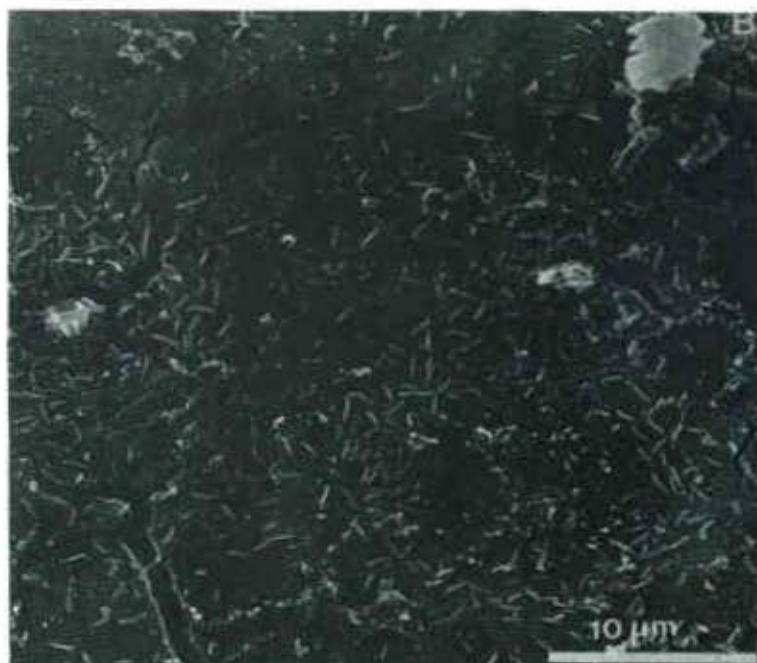
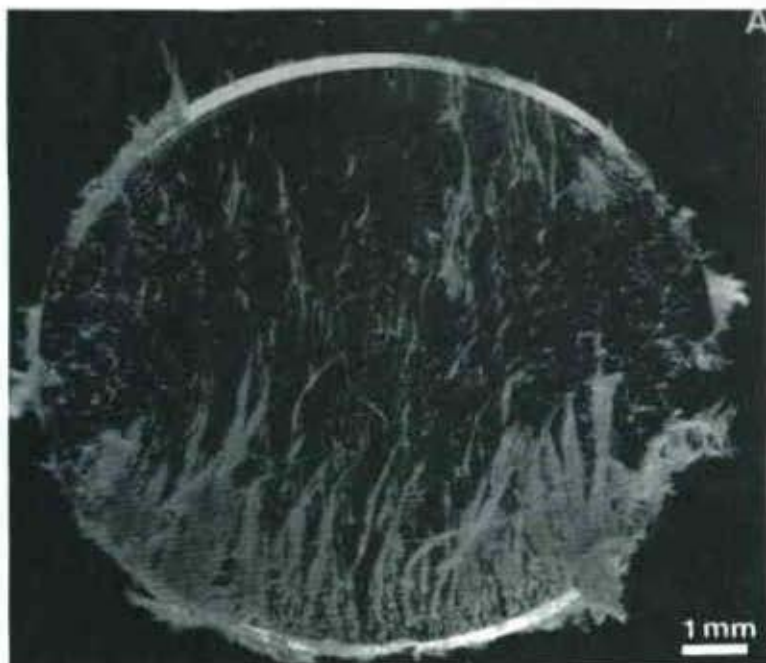
Le biofilm peut subir des dommages importants du fait des forces de friction et de l'érosion due à des particules transportées par le courant d'eau et qui viennent frapper violemment la surface des échantillons (Planche 3, E et F). Ce phénomène n'a été observé qu'une seule fois et provenait d'une purge des conduites de la station aquacole, effectuée malencontreusement durant l'expérience de mai 1984, et qui a remis en suspension une grosse quantité de particules.

A	B
C	D
E	F

PLANCHE 3

(Photos prises au microscope électronique à balayage)

- A : Echantillon d'acier inoxydable immergé 15 jours, en juillet 83  
Grossissement : 7,8 x  
Développement des bactéries filamenteuses à l'avant du plot,  
face au courant d'eau
- B : Echantillon d'aluminium immergé 10 jours, en janvier 84  
Grossissement : 2 400 x  
Concentration bactérienne au niveau des zones de corrosion
- C : Echantillon d'aluminium immergé 4 jours, en mai 84  
Grossissement : 1.200 x  
Concentration bactérienne sous forme de tâche
- D : Echantillon d'acier inoxydable immergé 6 jours, en mai 83  
Grossissement : 1 400 x  
Concentration bactérienne sous forme de veines
- E : Echantillon d'acier inoxydable immergé 15 jours, en mai 84  
Grossissement : 240 x  
Erosion du biofilm sous l'impact de particules
- F : Echantillon d'acier inoxydable immergé 15 jours, en mai 84  
Grossissement : 1 200 x  
Erosion du biofilm sous l'impact de particules  
P : particule.



## 2.6. APPROCHE STATISTIQUE DES RESULTATS

Ce paragraphe ne représente qu'une première approche du traitement statistique des résultats obtenus lors de l'expérience annuelle. Les distributions des bactéries observées ponctuellement sur quelques échantillons ne seront que décrites. Une analyse plus approfondie est actuellement en cours, en collaboration avec le Pr CHARACKLIS de l'Université de Bozeman (Montana, U.S.A.).

La loi statistique que suit la distribution des fréquences de densité des cellules fixées n'a été estimée que pour un seul échantillon d'acier inoxydable, immergé huit jours dans le système expérimental, en mars 1984 (travail effectué en collaboration avec le Dr LABERY, IFREMER).

Sur cet échantillon, les densités de bactéries fixées ont été dénombrées sur 240 champs microscopiques et l'histogramme de distribution des fréquences de taille de cet échantillon est représenté sur la figure 20. Après calcul et ajustement, il apparaît que cette distribution suit une loi statistique Log-Normale de paramètres : origine = 0,81 ; moyenne : 1,91 ; variance : 1,17, dont la fonction de densité est représentée sur la figure 21. Ce type de distribution est caractéristique d'une répartition spatiale contagieuse ou surdispersée de la population (ELLIOTT et DECAMPS, 1973).

Les distributions des fréquences de densité des bactéries fixées sur les deux matériaux métalliques, à différents temps d'immersion (paragraphe 2.5.) présentent aussi des modes très décalés vers la gauche (Figure 22, A à F). Ces résultats laissent supposer une répartition surdispersée des bactéries à la surface des échantillons, quel que soit le temps d'immersion et le matériel utilisé.

## 2.7. CONCLUSIONS

Sur le plan quantitatif, la colonisation des trois matériaux par les bactéries montre des variations nettes selon les saisons. Ces variations se traduisent aussi bien aux niveaux des maximums de densités bactériennes atteints, qu'aux niveaux des cinétiques de colonisation. Pour ces deux phénomènes, les plus fortes valeurs sont atteintes pendant la période estivale et de façon plus rapide qu'en période hivernale ou intermédiaire.

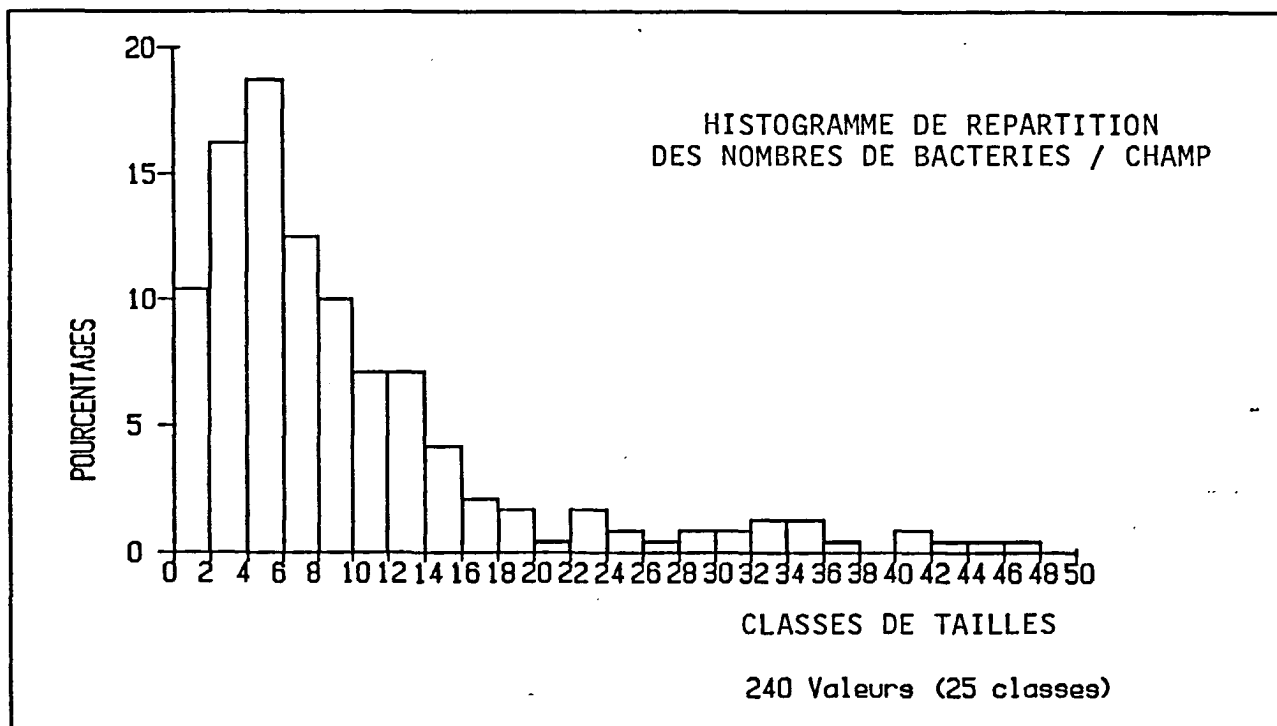


Figure 20 : Distribution des fréquences de densités des bactéries fixées sur un échantillon d'acier inoxydable immergé huit jours, en mars 1984.

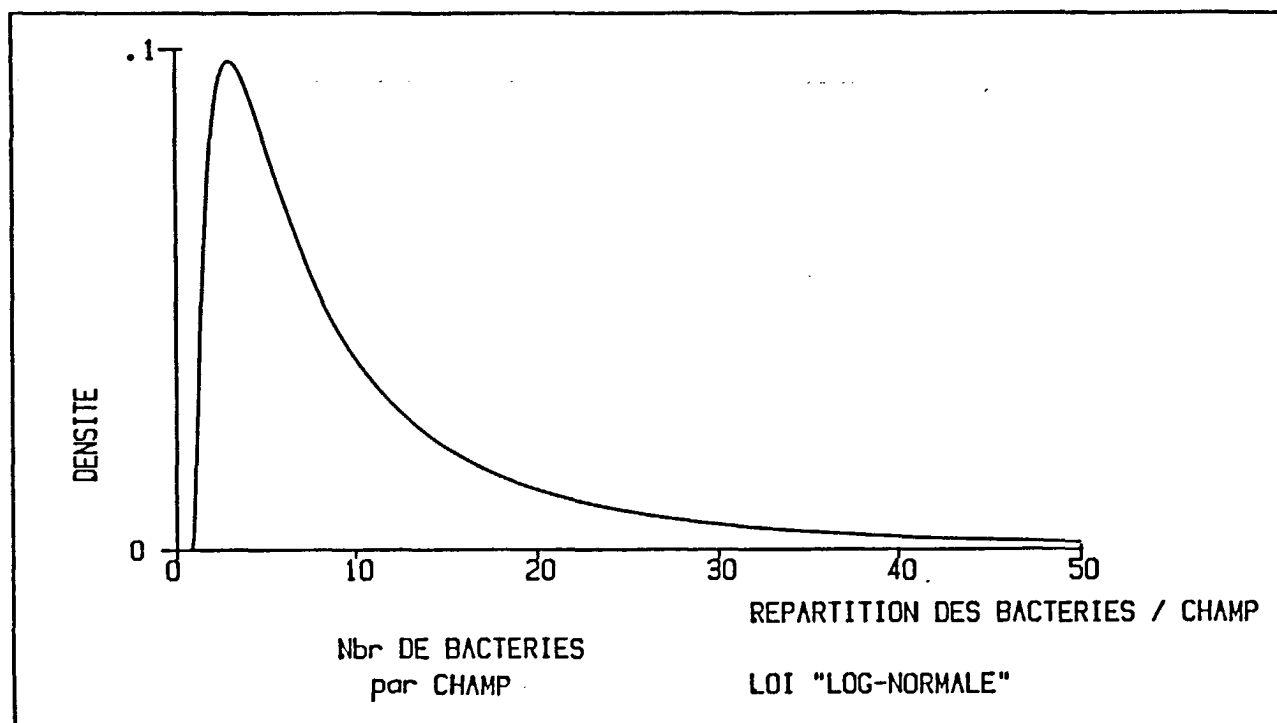


Figure 21 : Fonction de densité de la loi Log Normale calculée à partir de l'échantillon d'acier inoxydable immergé huit jours, en mars 1984.

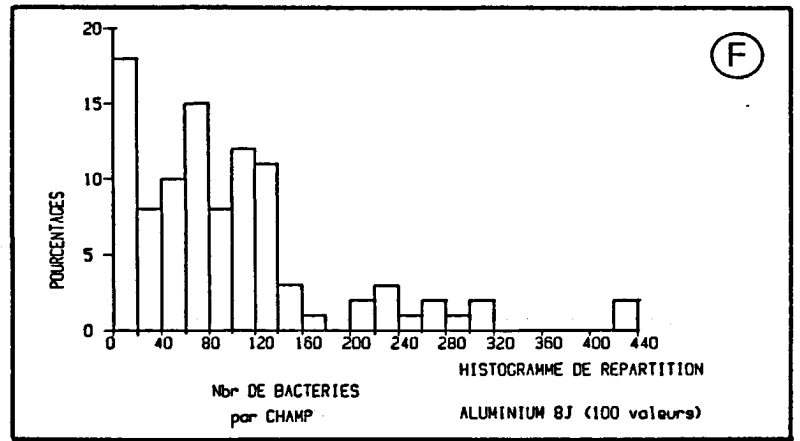
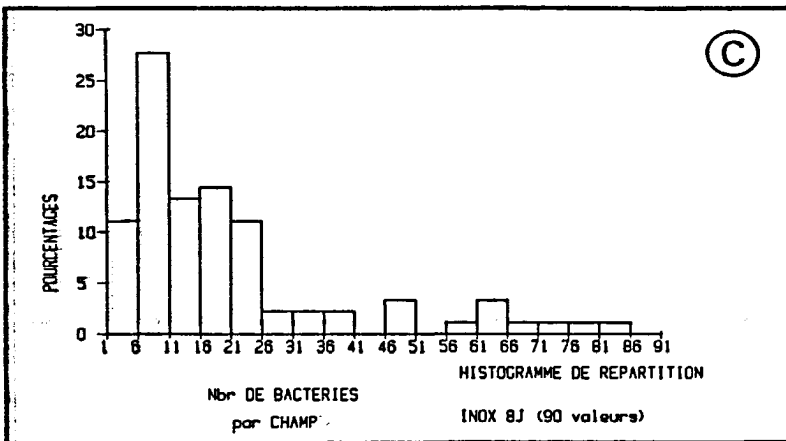
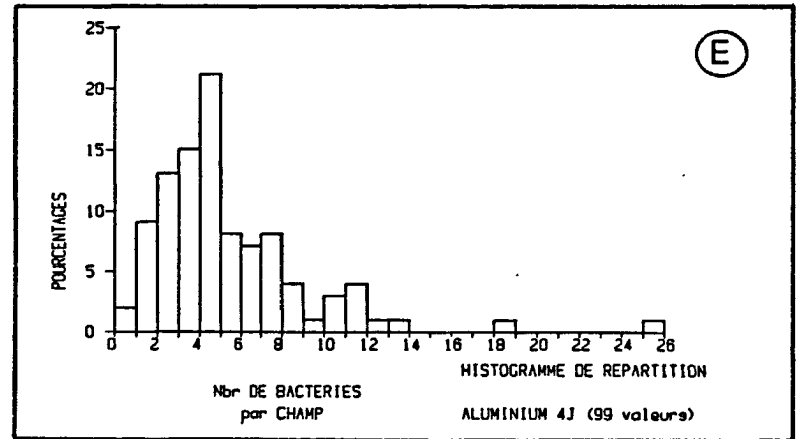
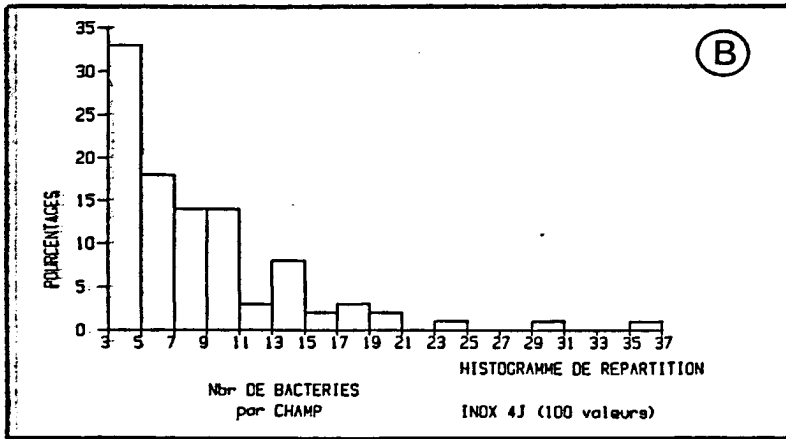
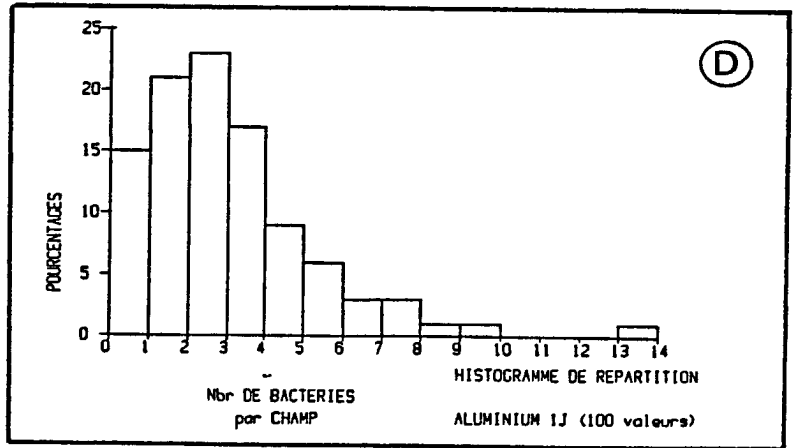
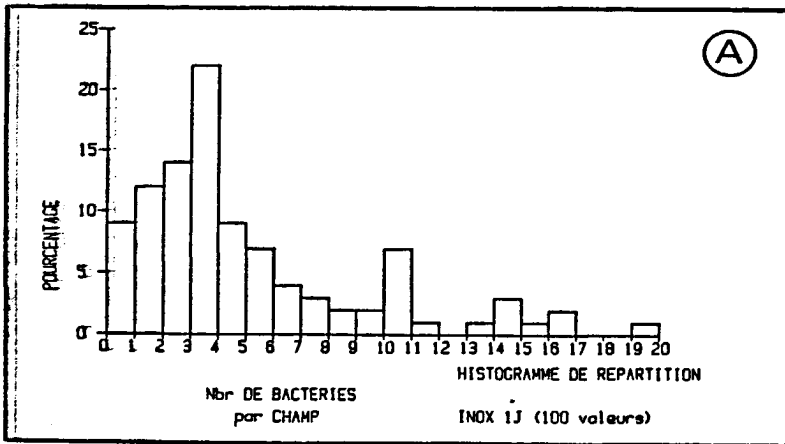


Figure 22 (A à F) : Distribution des fréquences de densités des bactéries fixées sur les échantillons d'acier inoxydable et d'aluminium après 1, 4 et 8 jours d'immersion.



Sur le plan qualitatif, les formes bacillaires sont constantes, sur tous les matériaux, aux différentes périodes de l'année. Elles sont souvent dominantes, cédant parfois la prépondérance aux formes coques. Les formes pédonculées se développent en plus grand nombre sur l'acier, et les formes "polaires" sur l'aluminium.

En période estivale, les peuplements bactériens se diversifient rapidement. En périodes printanière et automnale, la diversification est plus lente et l'on observe une croissance régulière des formes filamenteuses, pédonculées et "polaires". En période hivernale, ces formes se fixent tardivement, par comparaison aux coques et bacilles. Les successions de peuplements se font plus progressivement en hiver qu'en été, mais les différents types identifiés sont présents toute l'année.

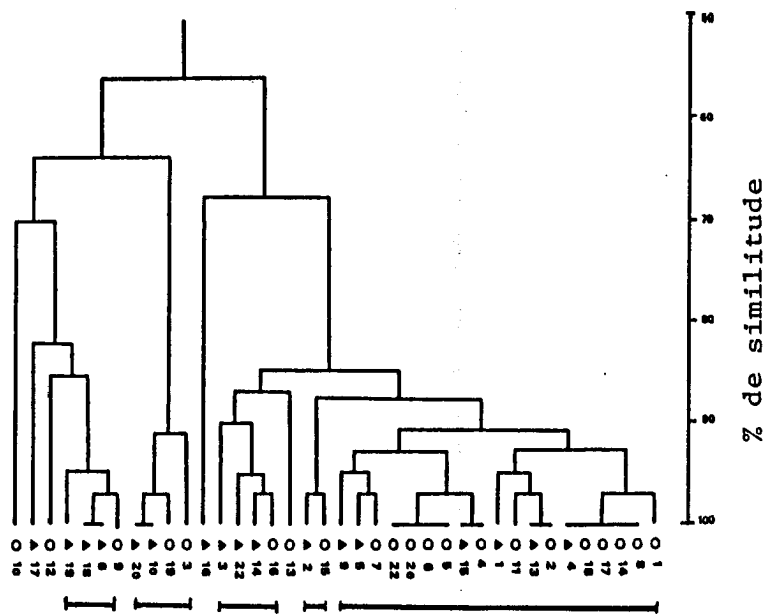
Certains ciliés sessiles et radiolaires se fixent aux supports, mais seulement en période estivale et après 10 ou 15 jours d'immersion. Aucune algue unicellulaire vivante ne se fixe aux supports.

Les volumes cellulaires des bacilles et des coques qui sont fixés sur les filtres Nuclepore varient au cours du temps d'immersion. Ces variations évoluent différemment au printemps et en hiver. Au mois de mai, après une augmentation rapide en quelques heures, le volume cellulaire tend à se réduire au cours du temps d'immersion. Au contraire, en janvier, il tend à augmenter tout au long de la période expérimentale.

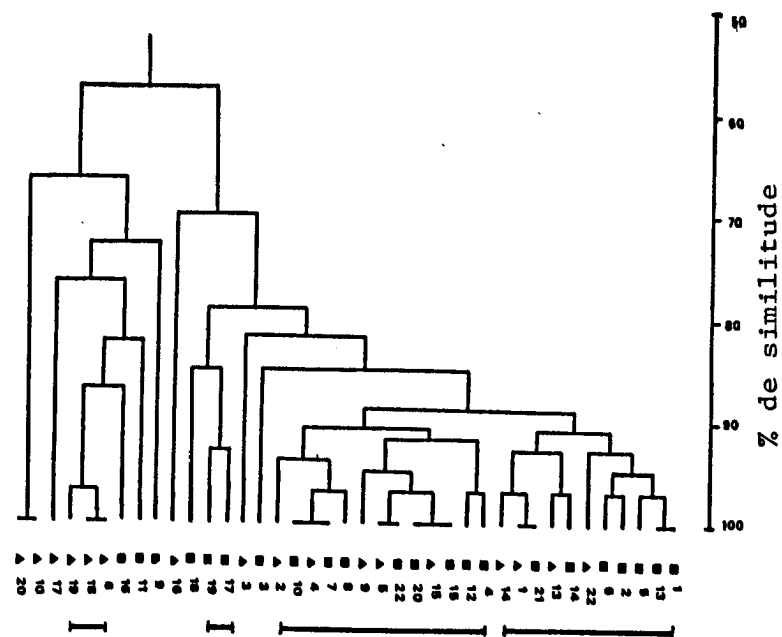
D'après l'approche statistique ponctuelle des résultats, il apparaît que, quel que soit le temps d'immersion, la répartition des bactéries à la surface des supports se fait de façon contagieuse ou surdispersée.

### 3 - ETUDE QUALITATIVE DES PEUPELEMENTS BACTERIENS COLONISANT LES SUBSTRATS

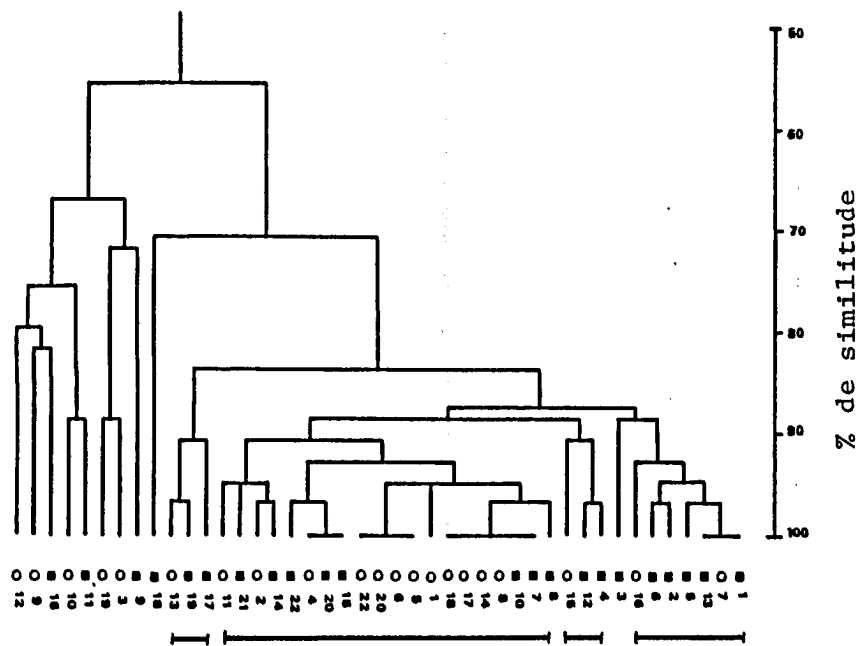
L'étude qualitative concerne les bactéries hétérotrophes, aérobies et anaérobies facultatives, cultivant sur le milieu de Oppenheimer et Zobell. Il ne s'agit donc pas d'une étude exhaustive des peuplements bactériens fixés. Cependant, sur cette fraction du peuplement bactérien, deux phénomènes ont été étudiés : d'une part les variations de peuplements bactériens,



Dendrogramme N° 5



Dendrogramme N° 6



Dendrogramme N° 7

Les souches sont isolées respectivement  
des matériaux suivants

- Acier inoxydable
- Aluminium
- ▲ Filtres polycarbonates

d'un matériau à l'autre, d'autre part les successions temporelles de peuplements sur un des matériaux (le filtre Nuclepore). Au cours de cette deuxième expérience, deux autres phénomènes ont été étudiés en même temps : d'une part la succession des bactéries fixées en fonction de leurs exigences en carbone organique, et d'autre part l'évolution des bactéries sulfatoréductrices fixées.

### 3.1. ETUDE COMPARATIVE DE PEUPELEMENTS BACTERIENS ASSOCIES AUX TROIS MATERIAUX ETUDIES

Afin de comparer la nature des bactéries colonisant les trois matériaux employés, des souches ont été isolées de ces matériaux après une immersion de huit jours, à la fin du mois de novembre 1984. La méthode de décrochage utilisée a permis de remettre en suspension un certain nombre de bactéries viables. Les quantités de cellules ainsi décrochées sont sensiblement identiques pour les trois matériaux. Les densités de bactéries fixées et viables qui en découlent, pour chaque substrat, sont respectivement de  $2,7 \cdot 10^3$  cellules.cm<sup>-2</sup> pour l'acier inoxydable,  $1,5 \cdot 10^3$  pour l'aluminium et  $3,2 \cdot 10^4$  pour les filtres Nuclepore. Parmi ces cellules, 17 souches ont ainsi été isolées des filtres, 22 souches de l'acier inoxydable et 21 souches de l'aluminium, soit un total de 60 souches. L'ensemble des réponses de ces souches aux différents tests est présenté dans l'annexe VI.

Les souches isolées des filtres de polycarbonate sont en majorité des bacilles Gram négatif. Parmi les souches isolées, trois forment des filaments en culture, une est pédonculée et une est un coque qui peut se regrouper en tétrades. Une seule de ces souches se développe en l'absence de NaCl. Parmi les bacilles Gram négatif, six ont un métabolisme non fermentatif et sept s'apparentent aux *Vibrionaceae*.

Sur les supports d'aluminium, toutes les souches isolées sont des bacilles Gram négatif, en majorité non fermentatives (16 sur 21). Parmi ces souches, six forment des filaments en culture. Une seule de ces souches se développe en l'absence de chlorure de sodium et une souche est agarolytique.

Sur les supports d'acier inoxydable, toutes les souches isolées sont également des bacilles Gram négatif, en majorité non fermentatives

(19 souches sur 22). Une entérobactérie a été également isolée. Une seule souche tend à former des filaments en culture et deux se développent en l'absence de NaCl.

Ces trois peuplements présentent tous un indice moyen d'activité assez bas : 6,6 ; 4,3 et 4,4, respectivement pour les populations isolées des filtres, de l'aluminium et de l'acier inoxydable.

Pour mieux apprécier les différences entre les communautés bactériennes isolées des trois matériaux, une analyse numérique, du même type que celle du paragraphe 1.3.2., a été réalisée, en comparant les échantillons deux à deux.

- Filtre et aluminium (Dendrogramme n° 5)

Pour une similitude de 90 %, cinq groupes sont identifiés, qui rassemblent 33 souches sur 38, soit 86,8 % de la collection. Tous ces groupes sont mixtes, c'est-à-dire composés de souches des deux origines. Le groupe le plus important rassemble 19 souches dont 9 des deux origines sont identiques à 100 %, ce qui représente 23,7 % de la population.

- Filtre et acier inoxydable (Dendrogramme n° 6)

Pour une similitude de 90 %, quatre groupes sont identifiés, qui rassemblent 29 souches sur 39, soit 74,3 % de la collection. Les deux groupes les plus importants, qui comprennent respectivement 11 et 13 souches, sont mixtes, c'est-à-dire composés de souches isolées des deux matériaux. Les deux autres groupes, en fait une paire et un trio, sont homogènes quant à leur origine.

- Aluminium et acier inoxydable (Dendrogramme n° 7)

Au niveau de similitude de 90 %, quatre groupes sont individualisés qui rassemblent 34 souches sur 43, soit 79 % de la collection. Tous ces groupes sont mixtes quant à l'origine des souches. A l'intérieur de ces ensembles, 12 souches des deux origines sont identiques à 100 %, ce qui représente 27,9 % de la collection.

D'une façon générale, d'un dendrogramme à l'autre, ce sont presque toujours les mêmes souches qui composent ces groupes individualisés à 90 %

de similitude. En moyenne, 79,7 % des 60 souches isolées au total sont voisines à 90 % de similitude.

Ces résultats tendent à indiquer que, dans le système expérimental étudié, après huit jours d'immersion, les trois matériaux employés sont colonisés par des communautés bactériennes qui sont en fait relativement proches qualitativement.

### 3.2. SUCCESSION DES PEUPELEMENTS BACTERIENS SUR LES FILTRES DE POLYCARBONATE

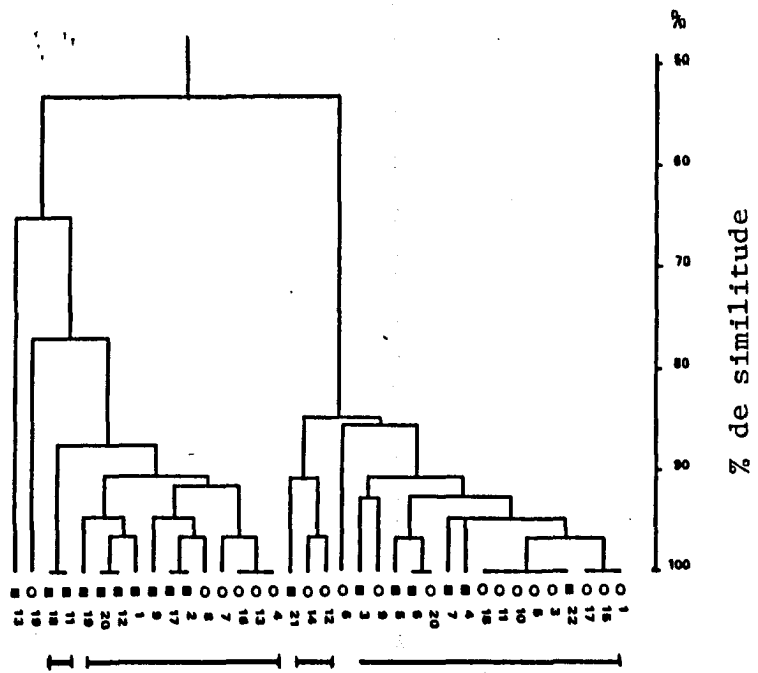
Afin d'étudier la succession des peuplements bactériens au cours du processus de colonisation, des échantillons ont été prélevés des filtres de polycarbonate après respectivement un, huit et quinze jours d'immersion en août 1984. De plus, l'eau de mer alimentant le circuit en début d'expérimentation a également été analysée. Pour cette expérience, les filtres, après émergence, ont été rincés cinq secondes sur Vortex et les bactéries ont été décrochées par la méthode du Stomacher.

#### 3.2.1. En fonction de leurs caractères morphologiques, écologiques et biochimiques

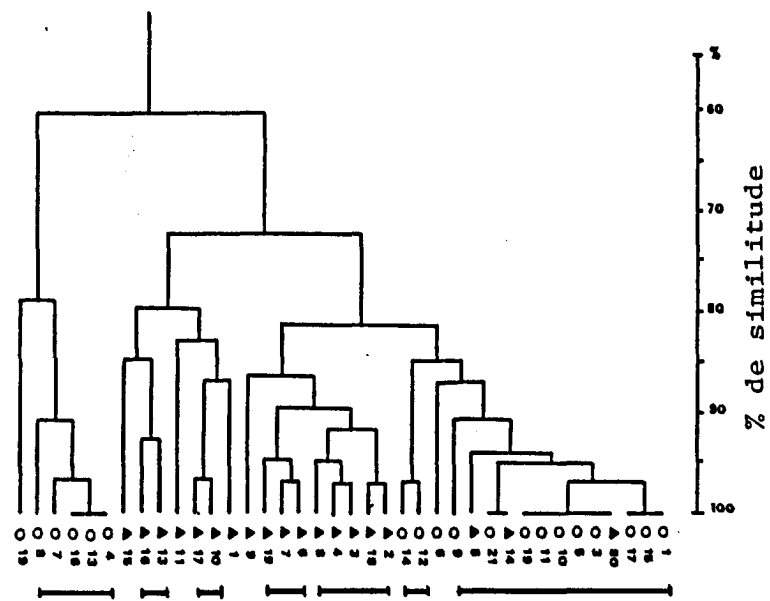
Pour cette étude, les bactéries ont ensuite été isolées sur le milieu 2216 E. L'ensemble des réponses de ces souches aux différents tests est présenté dans l'annexe VI.

Toutes les souches isolées de l'eau de mer (17) sont des bacilles Gram négatif dont 88,3 % sont exigeantes en chlorure de sodium. Cette communauté est moyennement diversifiée ( $E = 0,56$ ) et est composée de représentants de plusieurs groupes taxonomiques : *Vibrionaceae* (9), bacilles Gram négatif non fermentatif (7), Entérobactéries (1).

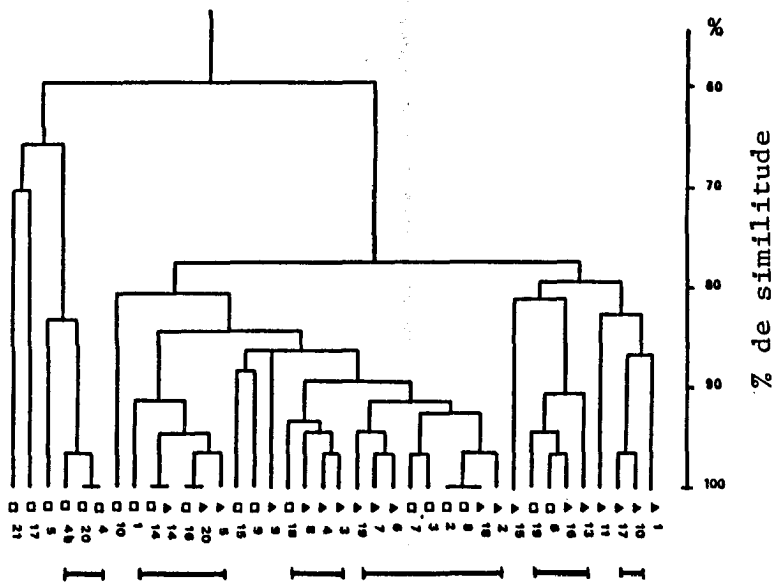
Sur les filtres de polycarbonate, après une journée d'immersion en mer, le peuplement bactérien échantillonné (19 souches) est moyennement diversifié ( $E = 0,53$ ). Deux bacilles Gram positif ont été isolés. Les autres souches sont essentiellement des bacilles Gram négatif à métabolisme non fermentatif (11), des Entérobactéries (4) et des *Vibrionaceae* (2). Il faut noter que ces bacilles Gram négatif à métabolisme fermentatif sont



Dendrogramme N° 8



Dendrogramme N° 9



Dendrogramme N° 10

Origine des souches

- Eau de mer des conduites
- Filtre immergé 1 jour
- ▲ Filtre immergé 8 jours
- Filtre immergé 15 jours

surtout représentés par deux souches, présentes respectivement à trois et cinq exemplaires identiques.

Après huit jours d'immersion, le peuplement colonisant les filtres de polycarbonate est moins diversifié ( $E = 0,37$ ). Les *Vibrionaceae* dominent nettement cet échantillon (14 souches sur 19). Les cinq autres souches sont des bacilles Gram négatif à métabolisme non fermentatif (4) et une Entérobactérie.

Après quinze jours d'immersion, le peuplement bactérien est de nouveau diversifié ( $E = 0,59$ ). Il est plus équilibré sur le plan taxonomique avec 11 *Vibrionaceae*, 4 Entérobactéries, 3 *Pseudomonas* et 1 coque Gram positif.

Comme précédemment, les souches isolées aux différents temps de prélèvements ont été comparées :

- Eau de mer et filtres immergés 1 jour (Dendrogramme n° 8)

A 90 % de similitude, 33 souches sur les 36 de la collection sont regroupées en quatre ensembles dont une paire et un trio. Les deux ensembles les plus importants sont mixtes, c'est-à-dire qu'ils rassemblent des souches venant de l'eau de mer et des filtres. Certaines souches des deux origines sont même identiques à 100 %.

- Filtres immergés pendant 1 jour et 8 jours (Dendrogramme n° 9)

A 90 % de similitude, 32 souches sur les 38 de la collection sont regroupées en sept ensembles dont trois paires et un trio. Ces quatre petits ensembles sont homogènes quant à l'origine des souches. Deux ensembles, regroupant chacun 5 souches, sont également homogènes. L'ensemble le plus important numériquement (13 souches) est hétérogène, mais largement dominé par les souches (10) correspondant à une journée d'immersion.

- Filtres immergés pendant 8 et 15 jours (Dendrogramme n° 10)

A 90 % de similitude, 28 souches sur une collection de 38 sont regroupées en six ensembles dont une paire et un trio. Ces deux petits ensembles sont homogènes quant à l'origine des souches. Les quatre autres groupes sont tous hétérogènes.

Peu de différences qualitatives apparaissent entre la flore de l'eau de mer circulante et celle qui colonise le filtre après une journée d'immersion. Les peuplements sont homogènes : 32 souches sur 36 sont regroupées à 90 % de similitude.

Après huit jours d'immersion, le peuplement isolé apparaît différent de celui isolé à un jour. Il est par contre assez proche de celui isolé à 15 jours, malgré l'apparition de nouveaux types bactériens, non regroupés à 90 % de similitude.

### 3.2.2. En fonction de leur régime nutritionnel

Les résultats précédents font apparaître que les types bactériens qui sont fixés à la surface des échantillons présentent des caractéristiques différentes suivant la durée de l'immersion des supports. Sur le plan morphologique, il a déjà été remarqué que différents types bactériens se succèdent au cours de la colonisation des différents substrats (paragraphe 2.3.2.).

Parmi les bactéries qui se fixent après la colonisation des bactéries pionnières de formes sphériques ou en bâtonnets très courts, figurent des cellules pédonculées (*Caulobacter* sp.) ou bourgeonnantes (*Hyphomicrobium* sp.) qui sont des microorganismes adaptés à vivre dans des milieux pauvres en matériel nutritif. Ces groupes ne sont d'ailleurs cultivables qu'en utilisant des milieux de cultures faiblement carbonés (POINDEXTER, 1981 a).

En utilisant différents milieux de cultures, deux expériences ont été effectuées afin d'essayer de mettre en évidence une succession de population bactérienne fixée à la surface des filtres Nuclepore, au cours du temps, selon la quantité de matériel nutritif disponible dans les milieux de culture.

Au cours d'une première expérience, la flore bactérienne viable est dénombrée par dépôt direct des filtres sur les trois milieux 2216 E, LX et AK gélosés.



Au cours d'une deuxième expérience, les bactéries viables sont dénombrées par la méthode NPP et par étalement sur les deux milieux 2216 E et AK gélosés, après avoir été décrochées de leur support. Pour chaque prélèvement, une vingtaine de souches sont ensuite isolées sur chacun des deux milieux, puis repiquées sur le milieu opposé, pour vérifier le caractère copiotrophique et oligotrophique stricte de ces bactéries hétérotrophes.

- Expérience I

Durant le mois de mai 1984, 32 filtres Nuclepore sont immergés à l'aide du système de prélèvement décrit sur la figure 7, sous une vitesse de courant de  $0,7 \text{ m.s}^{-1}$ . A des temps d'immersion croissants (6 h, 1 J, 4 J, 8 J et 15 J), six filtres sont émergés, rincés sur Vortex, puis déposés deux par deux sur les trois milieux de teneur croissante en matières carbonées. Les bactéries hétérotrophes qui se développent sur les milieux 2216 E et LX sont dénombrées après huit jours d'incubation. Les bactéries oligotrophes qui se développent sur le milieu AK sont dénombrées, après quatre semaines d'incubation, sous loupe binoculaire (Figure 23).

Pour chaque temps d'immersion, deux filtres supplémentaires servent à dénombrer la flore bactérienne totale fixée, par microscopie à épifluorescence.

Durant l'expérience, la densité des bactéries viables, en suspension dans l'eau alimentant le circuit expérimental, est dénombrée sur les trois milieux de culture. Elle est respectivement de  $4,2.10^2 \text{ cellules.ml}^{-1}$  sur 2216 E,  $3,4.10^2 \text{ cellules.ml}^{-1}$  sur LX,  $2,1.10^2 \text{ cellules.ml}^{-1}$  sur AK et la densité totale par épifluorescence est de  $8,1.10^5 \text{ cellules.ml}^{-1}$ .

D'après le tableau 3, il apparaît que les nombres totaux de colonies comptées à la surface des filtres augmentent avec le temps d'immersion et varient de 41 à 845.

Pour les échantillons immergés six heures et un jour, les bactéries se développent en plus grande quantité sur les milieux 2216 E et LX. Après quatre jours, le phénomène semble s'inverser et c'est sur le milieu AK qu'elles se développent le plus. A ce stade et sur ce milieu, les colonies ne sont d'ailleurs plus comptables, du fait de leur fusion les unes avec les autres.

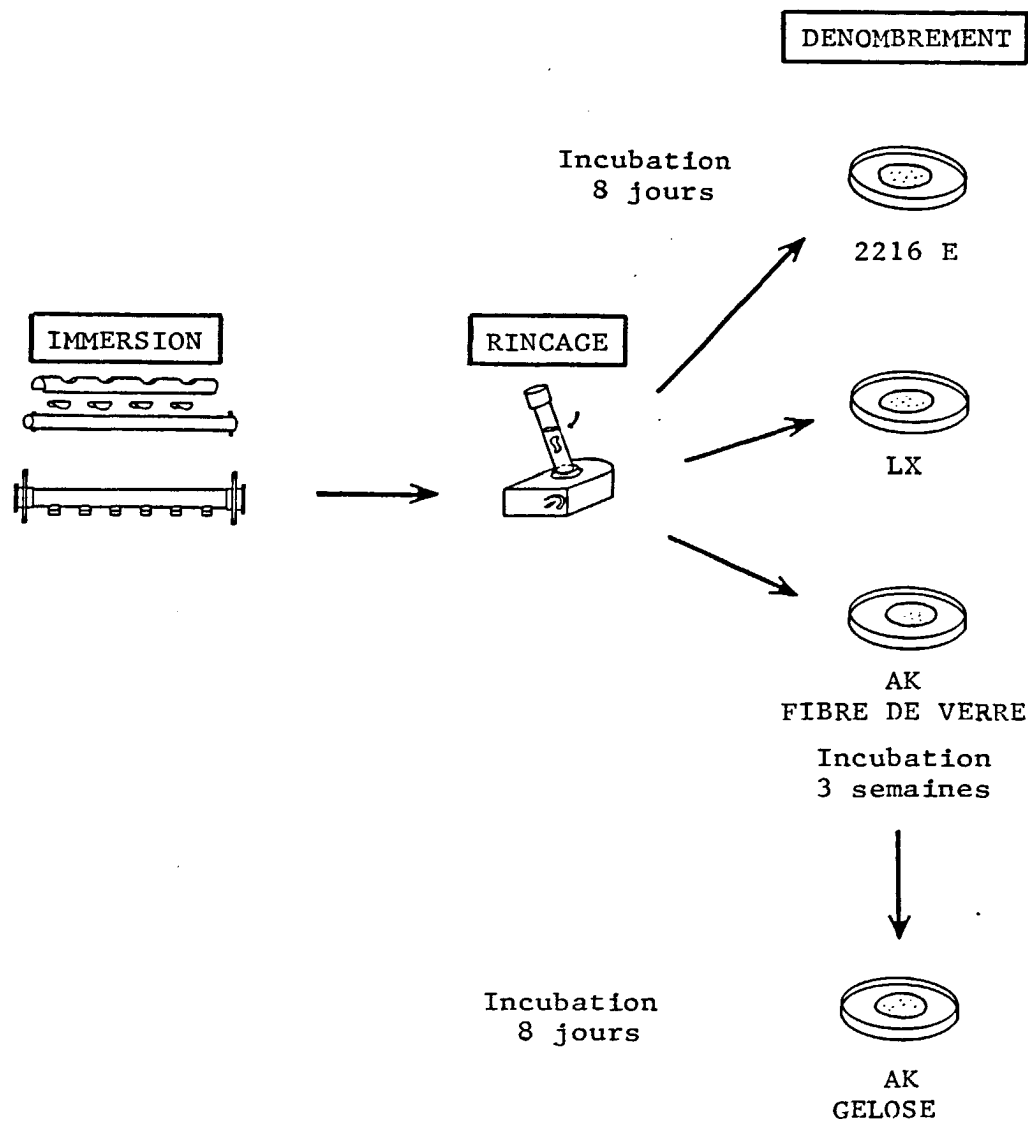


Figure 23 : Schéma du protocole expérimental utilisé pour dénombrer la flore bactérienne viable fixée aux filtres Nuclepore - Expérience I -

MILIEUX DE CULTURE	TEMPS D'IMMERSION									
	6 H		1 J		4 J		8 J		15 J	
	Nombre colonies	Nombre $\phi$ . $cm^{-2}$	Nombre colonies	Nombre $\phi$ . $cm^{-2}$	Nombre colonies	Nombre $\phi$ . $cm^{-2}$	Nombre colonies	Nombre $\phi$ . $cm^{-2}$	Nombre colonies	Nombre $\phi$ . $cm^{-2}$
2216 E	255	26	239	26	615	67	-	-	-	-
LX	154	16	260	28	845	92	-	-	-	-
AK	41	4	129	14	-	-	-	-	-	-
Epifluorescence		$1,2 \cdot 10^4$		$4 \cdot 10^4$		$8,4 \cdot 10^4$		-		-

Surface totale du filtre :  $9,62 \text{ cm}^2$

- : nombre des colonies supérieur à 1000.

Tableau 3 : Nombre de colonies bactériennes qui se développent sur les filtres Nuclepore, sur les différents milieux de culture, en fonction du temps d'immersion.

Quel que soit le prélèvement, le nombre de cellules viables dénombrées sur les différents milieux ne représente qu'un faible pourcentage par rapport au nombre total de bactéries dénombrées par épifluorescence (0,03 à 0,1 %). Le même rapport apparaît pour les cellules bactériennes en suspension dans le milieu.

Pour effectuer des dénombrements de bactéries viables fixées aux filtres, la méthode employée ici présente l'avantage de ne pas intervenir de façon plus ou moins violente au niveau du biofilm ; par contre, il est apparu que son efficacité est limitée. En effet, il est difficile de dénombrer précisément la flore bactérienne fixée viable, du fait de la fusion des colonies entre elles. De plus, les phénomènes de compétitions pour l'occupation du substrat, que déclenche cette fusion, doivent empêcher que toutes les cellules présentes se développent. Ces raisons ont donc amené à refaire cette étude par une autre méthode.

AOUT 1984

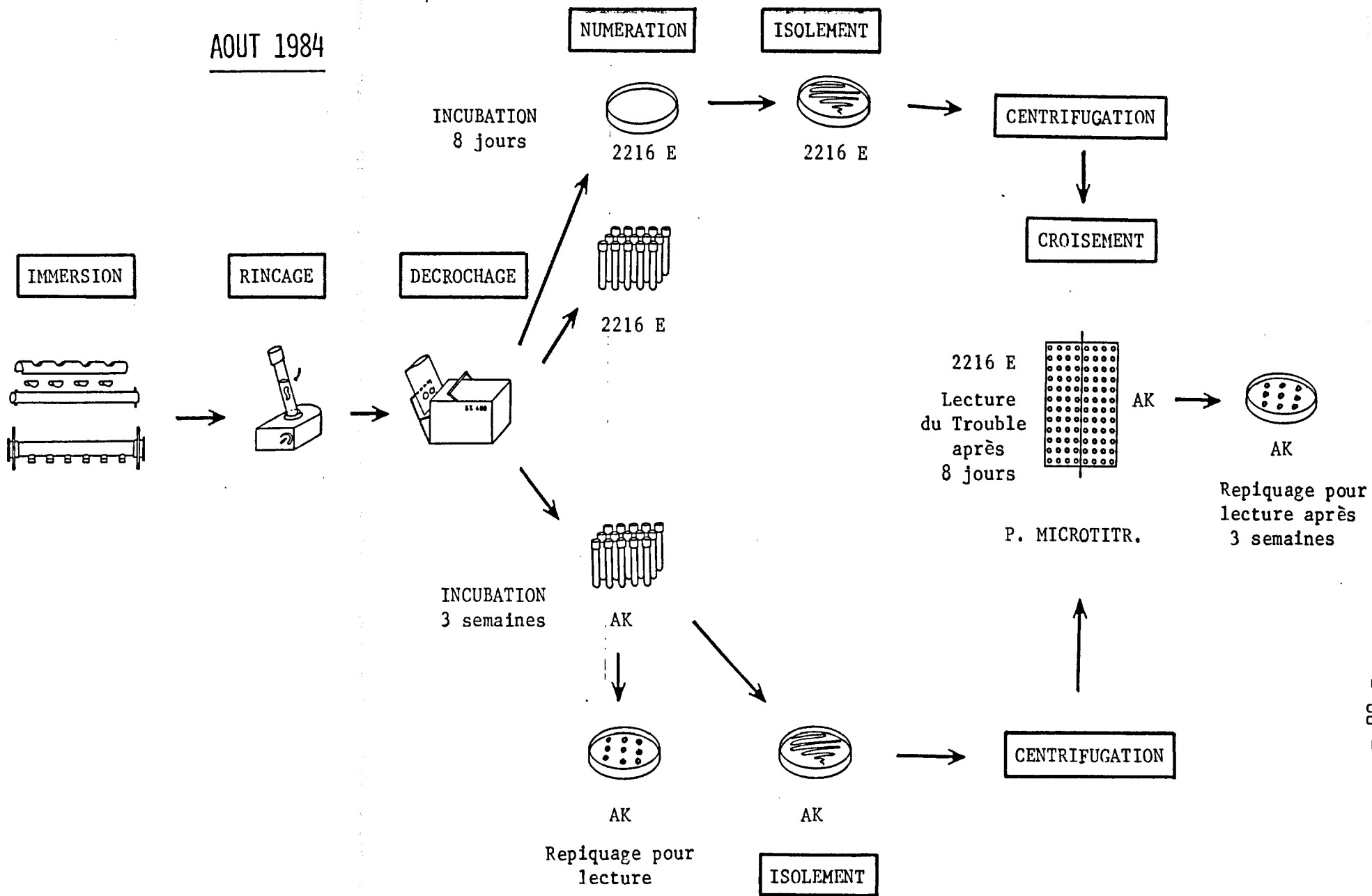


Figure 24 : Schéma du protocole expérimental de l'expérience II.

- Experience II

Cette étude a été réalisée afin de dénombrer et d'évaluer les variations des proportions de bactéries hétérotrophes et oligotrophes strictes, à l'intérieur de la population bactérienne fixée aux filtres Nuclepore, au cours du temps d'immersion. Afin de mettre en évidence ces deux types bactériens, les milieux 2216 E et AK sont utilisés.

Durant le mois d'août 1984, six filtres sont immergés à l'aide du système de prélèvement décrit sur la figure 7, sous une vitesse de courant de  $0,7 \text{ m.s}^{-1}$ . A des temps d'immersion croissants (1, 8 et 15 jours), deux filtres sont émergés, puis rincés cinq secondes sur Vortex. Les bactéries sont ensuite décrochées des supports à l'aide d'un Stomacher (Figure 24). Pour le milieu de culture 2216 E, les numérations sont effectuées par étalement sur milieu gélosé et par la méthode NPP en milieu liquide. Pour chaque prélèvement, 20 souches environ sont ensuite isolées et purifiées à partir de ces étalements. Le dénombrement des souches oligotrophes se fait par la méthode NPP. Les tubes sont incubés trois semaines à  $20^{\circ}\text{C}$ . Aucun trouble n'étant visible dans les tubes après cette période, une goutte de la suspension de chaque tube est donc ensuite déposée sur le même milieu gélosé et les lectures sont effectuées sur ces boîtes, après huit jours d'incubation. Vingt souches de chaque prélèvement sont isolées à partir de l'étalement de 0,1 ml de la suspension d'un tube, à la dilution appropriée, sur le milieu AK gélosé.

La flore bactérienne d'un prélèvement d'eau de mer, effectué durant la période expérimentale, est dénombrée et 20 souches sont isolées de la même façon, respectivement sur les deux milieux.

Un inoculum de chaque souche bactérienne est ensuite rincé deux fois par centrifugation à  $2\ 000 \times g$  pendant 10 minutes, dans de l'eau de mer filtrée stérile. Le croisement des souches, sur les deux milieux respectifs, se fait en milieu liquide, sur des plaques de microtitration. Chacune des suspensions sert à ensemercer quatre cupules contenant le milieu 2216 E et quatre autres contenant le milieu AK. Pour le milieu 2216 E, la lecture des tests se fait par lecture du trouble après huit jours d'incubation et pour le milieu AK, après trois semaines, par ensemençement de ce milieu gélosé, comme il est décrit précédemment.

Résultats

Le nombre de bactéries isolées sur les différents milieux est présenté dans le tableau 4.

TEMPS D'IMMERSION	MILIEU 2216 E GELOSE		MILIEU 2216 E LIQUIDE		MILIEU AK		EPIFLUO- RESCENCE
	Nombre $\varnothing$ . $\text{mL}^{-1}$	Nombre $\varnothing$ . $\text{cm}^{-2}$	Nombre $\varnothing$ . $\text{mL}^{-1}$	Nombre $\varnothing$ . $\text{cm}^{-2}$	Nombre $\varnothing$ . $\text{mL}^{-1}$	Nombre $\varnothing$ . $\text{cm}^{-2}$	Nombre $\varnothing$ . $\text{cm}^{-2}$
1 jour	$6,3 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^2$	$3,5 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^2$	$1,9 \cdot 10^2$	$1,3 \cdot 10^4$
8 jours	$5,2 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$1,5 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^5$
15 jours	$9,9 \cdot 10^3$	$1,04 \cdot 10^4$	$9,5 \cdot 10^4$	$9,6 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^4$	$2,6 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^6$
Eau de mer	$8,4 \cdot 10^2$		$9,5 \cdot 10^3$		$9,5 \cdot 10^2$		

Tableau 4 : Dénombrement de la flore bactérienne libre et fixée sur les filtres Nuclepore à l'aide de deux milieux de culture et par épifluorescence.

Le nombre de bactéries isolées sur le milieu 2216 E gélosé n'augmente que très peu entre le 1er jour ( $6 \cdot 10^3$  cellules. $\text{cm}^{-2}$ ) et le 15e jour d'immersion ( $1,04 \cdot 10^4$  cellules. $\text{cm}^{-2}$ ). La population reste stable entre le 1er et le 8e jour.

Avec le milieu 2216 E liquide, la densité bactérienne est plus faible après le 1er jour ( $3,5 \cdot 10^2$  cellules. $\text{cm}^{-2}$ ), mais par contre elle augmente rapidement et régulièrement avec le temps d'immersion, pour atteindre  $9,6 \cdot 10^4$  cellules. $\text{cm}^{-2}$  après 15 jours.

Pour le milieu AK, la population bactérienne fixée suit le même schéma d'évolution, bien que la densité soit légèrement inférieure après le 1er jour ( $1,9 \cdot 10^2$  cellules. $\text{cm}^{-2}$ ) et pour le 15e jour ( $2,6 \cdot 10^4$  cellules. $\text{cm}^{-2}$ ), et légèrement supérieure après le 8e jour ( $2,1 \cdot 10^4$  cellules. $\text{cm}^{-2}$ ).

Ces populations dénombrées par culture représentent entre 0,8 et 46 % de la population dénombrée par épifluorescence, soit en moyenne 8 %.

Les 85 souches isolées sur le milieu 2216 E se développent toutes sur le milieu AK (Tableau 5).

Temps d'immersion	85 souches isolées sur milieu 2216 E		82 souches isolées sur milieu AK	
	Témoin 2216 E	Repiquage sur AK	Témoin AK	Repiquage sur 2216 E
1 jour	21	21	16	16
8 jours	20	20	22	22
15 jours	22	22	22	21
Eau de mer	22	22	22	21

Tableau 5 : Nombres de souches bactériennes isolées sur les deux milieux de culture (2216 E et AK) et qui se développent sur le milieu opposé après repiquage.

Parmi les 82 souches isolées sur le milieu AK, une souche seulement provenant de l'eau de mer et une autre du prélèvement de 15 jours, ne se développent pas sur le milieu 2216 E.

D'après ces résultats, durant les 15 premiers jours d'immersion, il n'apparaît pas de succession de bactéries hétérotrophes et oligotrophes strictes au niveau de la population bactérienne fixée. Chacune des souches isolées sur l'un des milieux se développe très bien sur l'autre, sauf deux d'entre elles.

### 3.2.3. Evolution des bactéries sulfatoréductrices

Au cours de l'expérience II citée précédemment, l'évolution de la densité des bactéries sulfatoréductrices anaérobies, fixées aux supports, a été suivie au cours du temps d'immersion.

Les suspensions de cellules, obtenues par la méthode de décrochage utilisée, ont servi à ensemercer un milieu de culture spécifique dans des

conditions d'anaérobiose (DELILLE et LAGARDE, 1974). Les dénombrements sont effectués par la méthode NPP en milieu liquide.

	<i>Eau de mer</i>	<i>1 jour</i>	<i>8 jours</i>	<i>15 jours</i>	<i>2 mois</i>
<i>Nombre de cellules en suspension / ml</i>	2,5	-	-	-	-
<i>Nombre de cellules fixées / cm<sup>2</sup></i>	-	1,9	4,6	2,6	9,3

Tableau 6 : Evolution du nombre de cellules sulfatoréductrices en suspension dans le milieu et qui se fixent aux filtres Nuclepore au cours du temps.

Le nombre de bactéries sulfatoréductrices en suspension dans l'eau de mer alimentant le circuit expérimental est très faible : 2,5 cellules.ml<sup>-1</sup>(Tableau 6).

Entre 1 jour et 15 jours d'immersion, la densité de ce type de bactéries fixées aux filtres est faible et évolue très peu, entre 1,9 et 4,6 cellules.cm<sup>-2</sup>. Une légère augmentation de la densité apparaît après deux mois d'immersion : 9,3 cellules.cm<sup>-2</sup>.

### 3.3. CONCLUSIONS

Les conclusions à tirer de ces études qualitatives ponctuelles sont les suivantes :

Après huit jours d'immersion, les trois matériaux sont colonisés par des flores très voisines. Au cours de la durée de l'immersion, les peuplements colonisant un matériau varient, essentiellement entre le premier et le huitième jour, soit pendant la phase active de la colonisation.

Ces résultats ne permettent pas de généralisation quant aux types de bactéries présents aux différents stades de la colonisation. En effet, après huit jours d'immersion, les filtres sont surtout colonisés par des



*Vibrionaceae* en août, alors qu'en novembre, ce groupe n'est pas dominant. La nature de la microflore présente dans l'eau des conduites, au moment de la colonisation, doit jouer un rôle.

Les bactéries hétérotrophes isolées d'un même substrat à différents temps d'immersion, présentent une grande faculté d'adaptation vis-à-vis de la quantité de matériel nutritif mis à leur disposition. Il apparaît que, durant la première journée d'immersion, la quantité de bactéries copiotrophes fixées est plus importante que celle des bactéries oligotrophes. Ensuite, la proportion de ces deux groupes bactériens est identique.

La densité des bactéries sulfatoréductrices fixées à un substrat non métallique est faible et évolue très peu au cours du temps d'immersion.

#### 4 - INFLUENCE DE LA CHLORATION DE L'EAU SUR LA FIXATION BACTERIENNE, POUR DEUX VITESSES DE CIRCULATION

##### 4.1. VITESSE DU COURANT 0,7 m.s<sup>-1</sup>

Des échantillons d'acier inoxydable et d'aluminium ont été immergés, durant le mois d'avril 1984, à l'aide du système de prélèvement décrit sur la figure 3, sous une vitesse de circulation d'eau de 0,7 m.s<sup>-1</sup>. Une série d'échantillons a été alimentée avec une eau de mer chlorée à 0,1 ppm et une autre avec la même eau non chlorée. Cette dose de chlore permet d'obtenir une concentration de 0,05 ppm de chlore résiduel actif au niveau des systèmes de prélèvement.

Au niveau de chaque alimentation, à des périodes de temps croissantes (6 h, 1 J, 4 J, 8 J et 15 J), deux échantillons de chaque matériel sont émergés et fixés. Les dénombrements et l'étude morphologique de la microflore fixée sont faits par microscopie électronique à balayage.

##### 4.1.1. Evolution des densités bactériennes (Figure 25)

Que l'eau soit chlorée ou non, les densités de bactéries fixées sur les deux substrats, après six heures d'immersion, sont très élevées : 10<sup>5</sup> cellules.cm<sup>-2</sup> en moyenne.

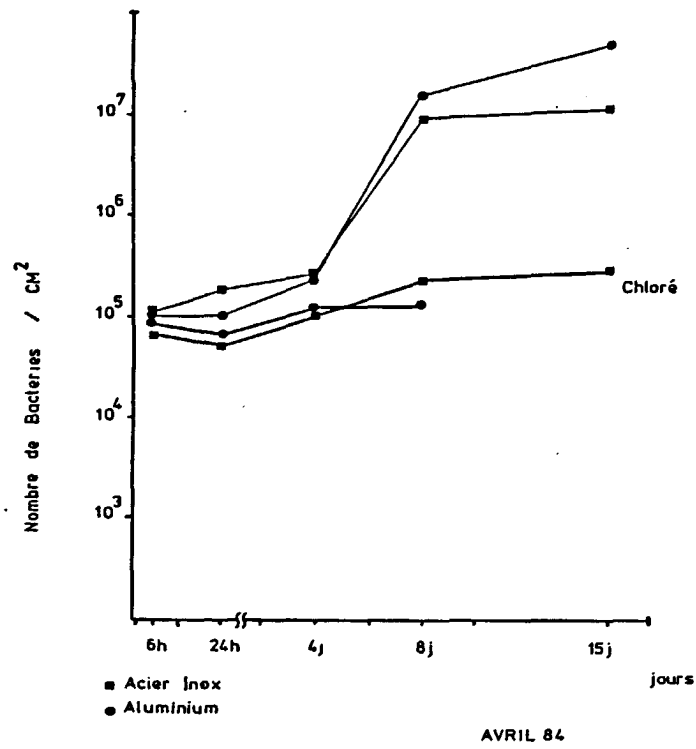


Figure 25 : Evolution des densités de bactéries fixées  
Vitesse du courant 0,7 m.s<sup>-1</sup>.

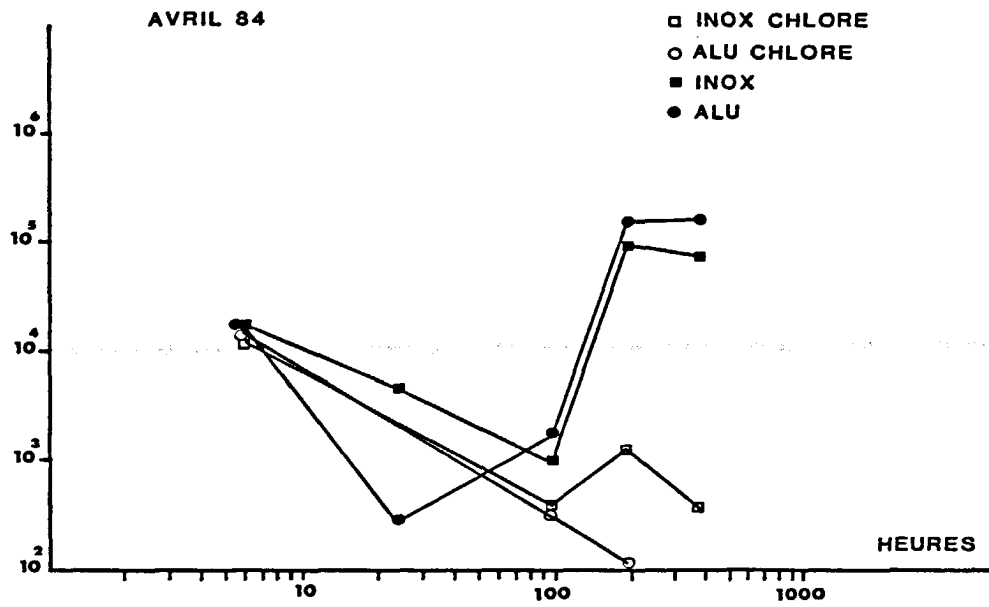


Figure 26 : Evolution des vitesses de colonisation  
Vitesse du courant 0,7 m.s<sup>-1</sup>.

Lorsque l'eau de mer n'est pas chlorée, la densité des bactéries augmente lentement jusqu'au 4e jour (environ  $2,4 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup> pour les deux matériaux). La population augmente ensuite très rapidement jusqu'au 8e jour, puis plus lentement pour atteindre respectivement des valeurs de  $2,2 \cdot 10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup> pour l'acier et  $4,2 \cdot 10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup> pour l'aluminium.

Au contraire, lorsque l'eau est chlorée, la densité des bactéries fixées évolue très peu après le 4e jour d'immersion.

#### 4.1.2. Evolution des vitesses de colonisation (Figure 26)

Que l'eau soit chlorée ou non, les vitesses initiales de colonisation sont assez élevées, en moyenne  $1,6 \cdot 10^4$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>. Elles diminuent ensuite jusqu'au 4e jour d'immersion, jusqu'à une valeur inférieure ou égale à  $1,6 \cdot 10^3$  bactéries.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> suivant les échantillons. Lorsque l'eau n'est pas chlorée, les vitesses de colonisation augmentent rapidement, pour devenir maximums le 8e jour pour l'acier ( $9,1 \cdot 10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>) et le 15e jour pour l'aluminium ( $1,6 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>).

Après le 4e jour d'immersion, lorsque l'eau est chlorée, la vitesse de colonisation évolue autour de  $10^3$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> pour l'acier et baisse encore jusqu'à  $10^2$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> pour l'aluminium.

#### 4.1.3. Evolution des types morphologiques (Figure 27)

Que l'eau soit chlorée ou non, les premiers types morphologiques colonisateurs sont des coques et des bacilles.

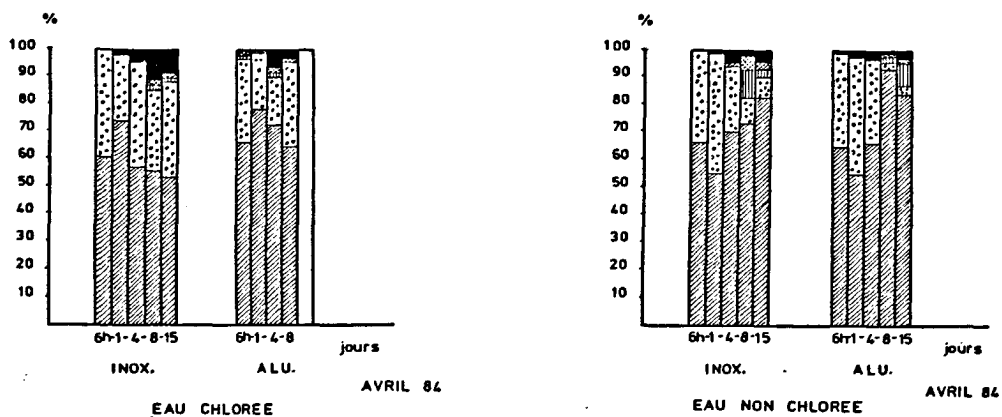


Figure 27 : Evolution des différents types morphologiques précédemment décrits dans le paragraphe 2.3.1. Vitesse du courant  $0,7 \text{ m.s}^{-1}$ .

Lorsque l'eau n'est pas chlorée, les formes pédonculées, "polaires" et filamenteuses commencent à se fixer, en faible quantité, après le 1er jour d'immersion.

Lorsque l'eau est chlorée, les différentes formes secondaires apparaissent, là aussi, dans de faibles proportions, après les premiers temps d'immersion. Parmi celles-ci, ce sont les formes filamenteuses qui se développent le plus, surtout sur l'acier inoxydable (15 %).

#### 4.2. VITESSE DU COURANT 0,1 m.s<sup>-1</sup>

La même expérience a été à nouveau réalisée, durant 30 jours, sur l'acier inoxydable et l'aluminium, en décembre 1984, sous une vitesse de circulation d'eau de 0,1 m.s<sup>-1</sup>.

##### 4.2.1. Evolution des densités bactériennes (Figure 28)

Que l'eau soit chlorée ou non, les densités de bactéries fixées, après deux jours d'immersion, évoluent entre  $1,6 \cdot 10^5$  et  $5,4 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup> suivant le substrat. Les densités augmentent ensuite lentement jusqu'au 10e jour, puis se stabilisent jusqu'à 30 jours d'immersion, à des valeurs comprises entre  $2,2 \cdot 10^6$  et  $4,4 \cdot 10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>.

##### 4.2.2. Evolution des vitesses de colonisation (Figure 29)

Que l'eau soit chlorée ou non, les vitesses de colonisation sont stables durant les dix premiers jours d'immersion (de  $3,3 \cdot 10^3$  à  $1,1 \cdot 10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), puis diminuent pour tous les matériaux. Le taux minimum ( $500$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>) est atteint le 15e jour sur l'acier inoxydable.

##### 4.2.3. Evolution des types morphologiques (Figure 30)

Quel que soit le type d'alimentation en eau, ce sont les bacilles et les coques qui se fixent en premier et qui prédominent durant les immersions.

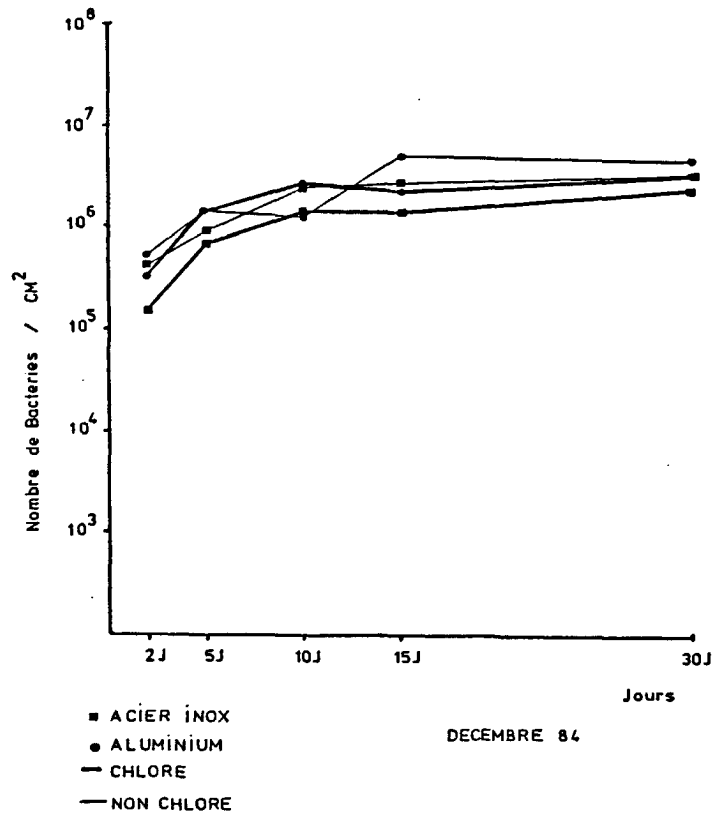


Figure 28 : Evolution des densités de bactéries fixées  
Vitesse du courant 0,1 m.s<sup>-1</sup>.

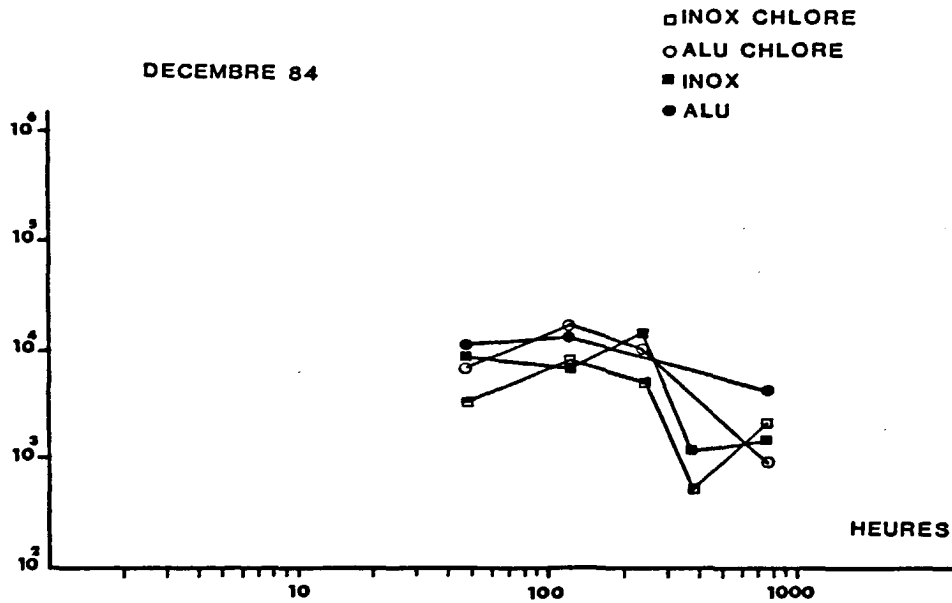


Figure 29 : Evolution des vitesses de colonisation  
Vitesse du courant 0,1 m.s<sup>-1</sup>.

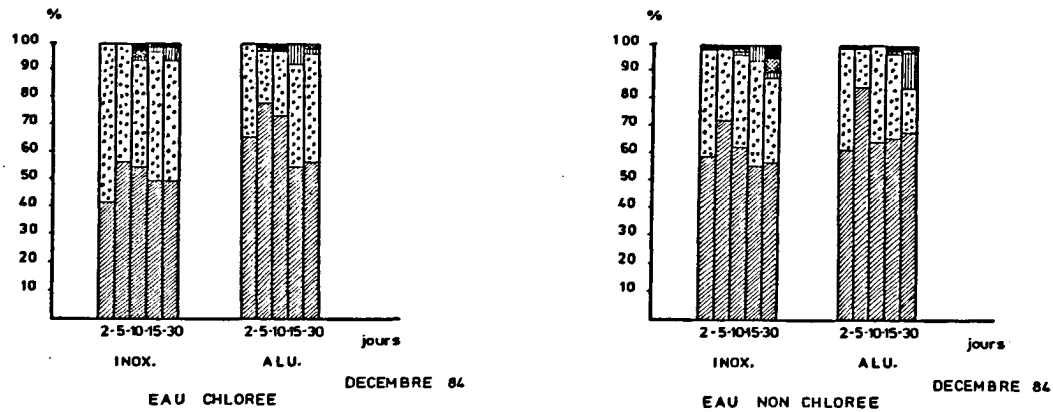


Figure 30 : Evolution des différents types morphologiques précédemment décrits dans le paragraphe 2.3.1. Vitesse du courant  $0,1 \text{ m.s}^{-1}$ .

Lorsque l'eau n'est pas chlorée, la population se diversifie lentement au cours du temps. Les formes "polaires" se développent plus sur l'aluminium après 30 jours.

Lorsque l'eau est chlorée, les formes secondaires apparaissent tardivement, entre 5 et 10 jours d'immersion, mais leurs densités n'évoluent pas avec le temps.

#### 4.3. CONCLUSION

C'est au mois d'avril 1984 que la station expérimentale du site B fut mise en service pour la première fois. A cette époque, une dose de chlore de 0,1 ppm, injectée en continu dans l'eau de mer alimentant le système, a été suffisante pour ralentir de façon importante la croissance du biofilm.

Au contraire, après neuf mois de service, en décembre 1984, ce type de chloration ne semble plus suffisant pour ralentir significativement la croissance du biofilm, par rapport à un témoin non chloré.

Que ce soit en hiver ou au printemps, ce type de chloration n'influence que très peu l'apparition des différents types morphologiques bactériens qui composent le biofilm. La population bactérienne est un peu plus diversifiée lorsque l'eau n'est pas chlorée.

Du fait du changement de saison entre les deux expériences et donc des vitesses de colonisation bactérienne des supports (phénomène déjà noté au paragraphe 2.2.), il est très difficile de mettre en évidence l'effet qu'à pu avoir le changement de vitesse de circulation d'eau sur la formation du biofilm.

## 5 - DISCUSSION

Durant cette étude, après avoir été immergés dans le système expérimental, les trois matériaux ont été rapidement colonisés par des bactéries.

Les densités bactériennes observées sur les trois supports, après une heure d'immersion, varient de  $2.10^3$  cellules.cm<sup>-2</sup> (aluminium, en septembre) à  $8.10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup> (acier inoxydable, en mars). Le plus souvent, les densités initiales sont voisines de  $10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>, quel que soit le matériel utilisé. Ces résultats sont similaires à ceux généralement observés sur différentes surfaces non toxiques immergées dans le milieu naturel, pendant une à quatre heures (DEXTER, 1975 ; MARSZALEK et al., 1979), mais inférieurs aux densités atteintes en milieu expérimental (environ  $10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>) (MOLIN et NILSSON, 1983 ; EATON et al., 1980 ; ABSOLOM et al., 1983).

D'après ces résultats, il n'apparaît pas que l'un des matériaux se soit colonisé, initialement, plus que les deux autres. D'après BAIER (1980), l'adsorption des bactéries à la surface de différents matériaux est influencée par le degré d'hydrophobicité de ces supports. Ce paramètre dépend de la composition chimique du matériel et est représenté par la tension de surface critique ( $\gamma_c$ ) du matériau (ZISMAN, 1964). Les deux alliages métalliques utilisés sont hydrophiles et présentent des tensions de surface voisines, respectivement  $35,5 \pm 1,5$  dynes.cm<sup>-1</sup> pour l'acier inoxydable et  $36,5 \pm 1,5$  dynes.cm<sup>-1</sup> pour l'aluminium (mesures effectuées au laboratoire selon la méthode communiquée par le Dr BLOCK - annexe VII-). D'après LEE (1968), les polycarbonates sont plus hydrophiles et ont une tension de surface légèrement plus élevée : 42 dynes.cm<sup>-1</sup>. Mais, dans cette étude, les filtres ont été préalablement colorés et la fixation du colorant sur ce matériel a eu pour effet d'abaisser sa tension de surface critique (BAIER, 1970). Elle n'a pu être mesurée précisément par la méthode précédente, du fait de la porosité des filtres.

Vis-à-vis de leur caractère d'hydrophobicité, les trois matériaux apparaissent donc très proches et il ne semble pas que l'un d'entre eux soit colonisé de façon plus importante au début des immersions. Les effets



de la tension de surface des matériaux sur l'adsorption bactérienne n'ont été remarqués que lorsque les matériaux étaient très différents (de 18 à 46 dynes.cm<sup>-1</sup>) et les réponses bactériennes à ces variations sont très controversées (DEXTER, 1975 ; FLETCHER et LOEB, 1979) et dépendent aussi de la tension de surface de la surface des bactéries, par rapport à celle du milieu environnant (ABSLOM et al., 1983). De même, la composition chimique du milieu fait aussi varier l'adsorption bactérienne. En effet, dès leur immersion, les matériaux sont recouverts par des glycoprotéines qui étaient en suspension dans le milieu (BAIER, 1972). Ce film chimique représente la première étape de la colonisation et change les propriétés des surfaces testées, en abaissant leur tension de surface critique. Ainsi la modification de l'environnement ionique, à l'interface solide-liquide, influence l'adsorption bactérienne et ceci de façon variable, suivant la composition chimique de ce film moléculaire (DANIELS, 1980). En diluant différentes solutions protéiques dans le milieu expérimental, FLETCHER (1976) observe un ralentissement de l'adhésion d'un *Pseudomonas* sp. à des surfaces de polystyrène. Mais en utilisant des solutions protéiques et des souches bactériennes différentes, MEADOWS (1971) a pu, au contraire, observer des accélérations. De plus, en utilisant des solutions de glucose de concentrations différentes, MARSHALL et al. (1971 a) montrent que l'action d'un même matériel nutritif est différente suivant sa concentration dans le milieu.

Du fait des variations annuelles des activités métaboliques des organismes du biotope marin, la composition chimique de l'eau de mer alimentant le système expérimental a varié durant l'année. Mais ces variations ne semblent pas avoir été suffisamment importantes pour faire varier les densités initiales des bactéries fixées. Elles sont similaires sur l'année, sauf pour les mois de mars et de mai 1984 où elles sont légèrement plus élevées, sur les trois matériaux.

Après 24 heures d'immersion, les densités bactériennes sont faiblement supérieures aux valeurs initiales et les variations notées aux temps d'immersion intermédiaires correspondent vraisemblablement à l'incertitude de ces mesures. Il en est de même pour les faibles différences parfois notées d'un support à l'autre. Des densités de colonisation sem-

blables sont observées sur divers matériaux, non toxiques (acier inoxydable, aluminium et verre), par MARSZALEK et al. (1979) et SECHLER et GUNDERSEN (1972). Pour une même période d'immersion, CORPE (1974) observe des valeurs dix fois plus élevées sur des surfaces en verre et note que certaines variations peuvent apparaître d'un site de prélèvement à un autre. BOTT et BROCK (1970) observent que durant 23 heures, une phase initiale de fixation, plus ou moins stable, précède la croissance du biofilm.

Les densités maximales observées sont supérieures à  $10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup> et ont été notées pour les trois matériaux, en périodes printanière et estivale. En hiver, les plus fortes valeurs sont voisines de  $10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>. Entre ces deux saisons, YANSHUN et al. (1984) observent, en Mer de Chine, les mêmes amplitudes de variation sur des surfaces en verre et d'acier inoxydable. Les densités dénombrées par SECHLER et GUNDERSEN (1972) sur des échantillons d'aluminium et d'acier inoxydable immergés en mer, ne dépassent pas ces valeurs, malgré une immersion prolongée jusqu'à 120 jours. Après 15 jours d'immersion, DEXTER (1975) observe des densités similaires sur différents substrats immergés en mer. Ces résultats sont, par contre, supérieurs à ceux de GERCHAKOV et al. (1976) ou MARSZALEK et al. (1979), qui dénombrent au maximum  $10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup> sur de l'acier inoxydable, en utilisant respectivement des techniques de dénombrement sur milieu de culture et en épifluorescence. Par contre, ces résultats sont inférieurs à ceux observés sur des périodes très courtes, en milieu expérimental et avec des souches pures (CHET et al., 1975 ; FLETCHER, 1977).

La comparaison de ces divers travaux est difficile en raison des conditions expérimentales différentes, parfois en milieu contrôlé, en eau de mer stagnante et, dans le cas présent, en eau de mer circulante. Selon BOTT et MILLER (1983), une vitesse de circulation de  $1 \text{ m.s}^{-1}$  permet une colonisation maximale. Selon ces auteurs, à des vitesses supérieures, les densités bactériennes sont plus faibles, en raison vraisemblablement d'un décrochage d'une partie du biofilm par les forces de friction. D'après Mc COY et al. (1981), une augmentation de la vitesse du courant de 1,3 à  $2,6 \text{ m.s}^{-1}$  accroît de 45 heures la phase initiale, plus ou moins stable,

mais par contre accélère la croissance du biofilm. CHARACKLIS (1973) observe ce même retard de croissance et cette même accélération en travaillant à des vitesses de circulation similaires. Même en travaillant à des vitesses lentes, le passage de 0,5 à 15  $\text{cm.s}^{-1}$  s'accompagne d'une augmentation de la colonisation bactérienne observée par PEDERSEN (1982). Par rapport à un fluide stagnant ou peu mobile (eau de mer naturelle), un fluide circulant conduit à un renouvellement constant de la couche d'eau en contact avec la surface immergée et donc, des microorganismes susceptibles d'y adhérer. De plus, la turbulence de l'eau augmente la probabilité de contact entre les bactéries et la surface immergée (DANIELS, 1972). Ces résultats sont en opposition avec ceux de STANLEY (1983) qui note que l'agitation du milieu, en même temps qu'elle augmente la probabilité de contact des cellules avec la surface, diminue le temps de contact de la cellule avec la surface, ce qui a pour effet de ralentir l'adhésion bactérienne.

La représentation synthétique des résultats des sept séries expérimentales (Figure 14 A et B) et des vitesses de colonisation suivant les saisons (Figure 15 A, B et C), montrent de très nettes variations selon la période expérimentale. D'une façon générale, après 24 heures d'immersion, durant la croissance du biofilm, le logarithme du nombre de cellules fixées augmente linéairement par rapport au temps d'immersion. Mais des différences apparaissent au niveau des vitesses de croissance et des densités bactériennes atteintes aux diverses périodes. Entre les résultats de janvier et de juillet, la densité maximale passe de  $10^5$  cellules. $\text{cm}^{-2}$  à plus de  $10^7$  cellules. $\text{cm}^{-2}$ , en ce qui concerne par exemple les filtres en polycarbonate. Pour ce même matériel, la vitesse de colonisation oscille autour de  $10^3$  cellules. $\text{cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$  en janvier, par contre en juillet, elle atteint  $1,8.10^5$  cellules. $\text{cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$  en six jours, en même temps que les densités maximums ( $10^7$  cellules. $\text{cm}^{-2}$ ). La colonisation estivale apparaît se produire en trois étapes : une étape de 24 heures marquée par un faible accroissement de la densité, une étape de cinq jours caractérisée par un accroissement intense, puis une étape finale ou stationnaire pendant laquelle la densité bactérienne évolue peu. Les autres périodes de prélèvement donnent des résultats intermédiaires. La croissance du biofilm selon ces trois mêmes phases a déjà été notée par PEDERSEN (1982) en milieu

circulant. Dans les mêmes conditions, TOSTESON et al. (1983) notent que l'accroissement pondéral du biofilm augmente de façon linéaire avec le temps. Au contraire, KORNEGAY et ANDREWS (1970) indiquent que la croissance du biofilm se fait de façon exponentielle dès le début des immersions puis devient linéaire avant d'atteindre la 3e phase, caractérisée par une croissance nulle.

D'après les résultats, la phase de croissance rapide apparaît courte en été et longue en hiver. Les conditions expérimentales n'ayant pas varié de mai 1983 à mai 1984, il faut chercher au niveau du milieu extérieur des facteurs susceptibles d'influer sur le phénomène étudié. Selon FLETCHER (1977), BRYERS et CHARACKLIS (1981), la charge du fluide en bactéries influe sur l'intensité de la colonisation. Les dénombrements de bactéries effectués, tant dans l'eau de surface que dans l'eau des conduites, n'indiquent pas de variations sensibles de l'abondance bactérienne, et aucune tendance saisonnière n'a été relevée. De plus, statistiquement, les deux distributions ne montrent aucune différence, il ne semble donc pas que le pompage et la remise en circulation de l'eau dans le système expérimental appauvrisse ou enrichisse le milieu en bactéries.

La relative stabilité du nombre total de bactéries en suspension dans l'eau de mer a été rapportée à plusieurs reprises. Ainsi, CAMMEN et WALKER (1982) observent qu'en baie de Fundy (Canada), la densité de bactéries libres varie très peu ( $0,2$  à  $4 \cdot 10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>) entre le printemps et l'automne. FUKAMI et al. (1981) montrent que la flore bactérienne totale de surface (un mètre) reste stable (en moyenne  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>) même pendant une phase de bloom phytoplanctonique. Il faut cependant considérer cette stabilité avec certaines réserves car JACQ et al. (1984) montrent que des variations de densité très rapides et de fortes amplitudes ( $\times 10\ 000$ ) peuvent apparaître dans le milieu naturel. Etant donné la périodicité des prélèvements (hebdomadaire), certaines de ces variations ont pu échapper à ce contrôle. Cependant, lors d'une expérience ponctuelle le 9 août 1983, des prélèvements ont été effectués toutes les heures et aucune variation n'a été notée. L'onde de marée ne semble pas avoir eu d'effet sur la distribution des bactéries dans la couche d'eau prélevée (30 cm), HARVEY et al. (1983) observent un résultat similaire pour les bactéries qui se

trouvent à cette profondeur. Par contre, ils notent que la concentration de la flore bactérienne qui se trouve dans la pellicule d'eau de surface, varie sous l'effet du vent et de la marée.

La température est sans doute le paramètre (parmi ceux mesurés) qui évolue le plus, entre 8°C et 17°C. La tendance à la diminution de la température débute fin août et se poursuit jusqu'en février. A la fin de ce mois, la tendance s'inverse. Ces changements dans l'évolution des températures de l'eau correspondent assez bien aux différences de colonisation observées. Après la colonisation lente observée en janvier, une légère accélération est notée dès mars. A l'inverse, après les maxima de juillet, une décélération est observée à partir de novembre. L'effet positif de la température sur l'attachement des bactéries a été effectivement montré par FLETCHER (1977), FLOODGATE (1972) et LEWIS (1982), mais ce résultat n'a pas été retrouvé par MOLIN et NILSSON (1983), en raison vraisemblablement de l'utilisation de protocoles expérimentaux différents. Parmi les autres paramètres physico-chimiques de l'eau mesurés, le pH peut influencer la fixation bactérienne (FELDNER et al. 1983) mais durant l'année, sa valeur n'a que très faiblement varié (légèrement supérieure à 8). En utilisant différentes concentrations d'oxygène dissous, MOLIN et NILSSON (1983) n'observent pas de différence dans les taux de colonisation. D'après SANDERS et al. (1971), le taux d'oxygène dissous n'est pas un facteur limitant à la croissance du biofilm. Les concentrations d'oxygène dissous observées durant toute l'année sont voisines de 8 mg.l<sup>-1</sup>. En fait, si dans le cas présent la température semble en relation avec les phénomènes de colonisation bactérienne, d'autres facteurs de l'environnement, plus ou moins interactifs, interviennent certainement.

Sur le plan quantitatif, la colonisation bactérienne des surfaces immergées en eau de mer circulante montre donc des fluctuations saisonnières, fluctuations dont il faudra tenir compte pour évaluer l'efficacité de diverses techniques de nettoyage.

Les deux essais de lutte contre le développement du biofilm, par injection d'une dose de 0,1 ppm de chlore (Hypochlorite de sodium) dans l'eau de mer, donnent des résultats très différents. La première expérience qui a été effectuée dès la mise en service de la station, montre que cette

dose permet de ralentir la croissance du biofilm, sur une période de 15 jours. Par contre, après que la station ait fonctionné en continu pendant 9 mois, cette concentration ne semble plus suffisante. En utilisant la même quantité de chlore, BERGER et al. (1985) notent que cette concentration n'est pas non plus suffisante pour ralentir la formation du biofilm de façon efficace. Par contre, en travaillant sur une souche bactérienne pure (*Sphaerotilus* sp.), GRAINGE et LUND (1969) indiquent que cette dose, injectée dans les circuits à raison d'une heure par jour, empêche la croissance du biofilm, sans tuer les cellules. D'après CHARACKLIS et DYDEK (1976), même une concentration de 25 ppm de chlore ne tue pas les cellules déjà fixées, et il faut injecter 250 ppm pour décrocher le biofilm. A cette concentration, par son pouvoir oxydant, le chlore dépolymériserait et solubiliserait suffisamment les structures fibrillaires extracellulaires synthétisées par les bactéries pour se fixer, et le biofilm ainsi fragilisé serait décollé des surfaces par les forces de friction du courant d'eau. En fait, dès son contact avec l'eau de mer, l'hypochlorite de sodium se décompose. L'oxyde de chlore ainsi produit se lie avec différents anions et oxyde la matière organique dissoute ou particulaire en suspension dans le milieu, perdant ainsi de son pouvoir oxydant vis-à-vis du biofilm. Selon la composition chimique de l'eau, cette perte est plus ou moins importante et donc, plus que la concentration injectée, c'est la teneur en chlore résiduel qu'il est important de connaître (FAVA et THOMAS, 1978). Dans cette étude elle était constante et égale à 0,05 ppm. Contrairement à nos résultats, LEWIS (1982) observe qu'une concentration de 0,1 ppm suffit pour ralentir la croissance du biofilm en hiver et qu'au contraire, elle est insuffisante en période estivale. Mais BERGER et al. (1985) indiquent qu'avec le temps, une dose continue de chlore de 0,1 ppm permet de sélectionner des souches bactériennes plus résistantes et capables de synthétiser des polymères de fixation moins sensibles aux réactions d'oxydation. Entre les deux expériences, la station a fonctionné durant neuf mois en continu. Une telle sélection a donc pu se développer dans l'ensemble de la structure, ce qui expliquerait l'inefficacité du nettoyage en période hivernale.

Du fait des variations précédemment décrites, il n'a pas été possible de cerner l'influence de la vitesse de circulation d'eau sur l'efficacité de la chloration.

D'après ces résultats quantitatifs, il ne semble pas que la nature des différents matériaux ait influencé le développement du biofilm bactérien. Afin de comparer les matériaux entre eux, une étude statistique des résultats est actuellement effectuée au laboratoire du Pr CHARACKLIS (Montana, U.S.A.). D'après l'étude statistique de la distribution des bactéries à la surface d'un seul échantillon d'acier inoxydable, il est apparu que la répartition des cellules se fait de façon surdispersée, ce qui entraîne une sous estimation de la population réellement fixée. En travaillant sous des vitesses de courant plus faibles, MILLS et MAUBREY (1981) observent que la fixation des bactéries se fait au hasard dans les premiers temps d'immersion, puis la population devient plus hétérogène, du fait du développement de microcolonies. En milieu expérimental et en eau stagnante, CORPE (1974) note que la répartition des bactéries sur des surfaces de verre est homogène. Par contre FLOODGATE (1972), sur le même matériel, indique que les bactéries se répartissent de façon surdispersée, en se fixant préférentiellement sur des lignes de "stress" (imperfections) de ce matériel. Dans les mêmes conditions, FLETCHER (1979) note que la répartition des bactéries sur des surfaces peut être homogène ou hétérogène, suivant la nature chimique du matériel. En eau stagnante, il apparaît donc que la nature des matériaux peut influencer la répartition des cellules bactériennes sur les surfaces. Cependant, dans cette étude, ces variations ont pu être masquées par l'influence des forces de friction du courant d'eau. Du fait de la position légèrement surélevée des échantillons à l'intérieur des conduites, les bactéries se sont fixées en plus grand nombre sur les bords qui se trouvent face au courant et sous le courant, et plus faiblement sur les bords latéraux et au centre des échantillons. Ce type de distribution a déjà été observé par MUNTEANU et MALY (1981) et par KORTE et BLINN (1983), lors de la fixation d'algues unicellulaires sur des supports immergés parallèlement au courant d'eau d'une rivière. Ce phénomène serait régi par les forces du courant d'eau. En effet, les mouvements de tourbillon qui se développent à l'avant et à l'arrière du plot (EVANS, 1968) augmentent la probabilité de collision des cellules avec les supports, par rapport au courant laminaire qui se développe à la surface du plot (une représentation schématique de ces courants est donnée dans l'annexe VIII).

L'étude qualitative a été réalisée par deux méthodes : d'une part un suivi des types morphologiques identifiables en microscopie, d'autre part une analyse de taxonomie numérique des bactéries hétérotrophes cultivables.

D'une façon générale, les bactéries représentent les premiers organismes colonisateurs des échantillons. Après 10 et 15 jours d'immersion et seulement en période estivale, quelques ciliés et radiolaires ont été observés. Cette succession a déjà été notée par CORPE (1977). La fixation secondaire des protozoaires est souvent reliée au rôle trophique que peut représenter le film bactérien pour ces organismes ou pour des larves de métazoaires (DISALVO et COBET, 1974 ; MITCHELL et YOUNG, 1972). Ce phénomène peut aussi être relié au fait qu'en se fixant, les bactéries peuvent changer les propriétés physico-chimiques de l'interface et rendre la surface attractive pour ces organismes (FLOODGATE, 1968 ; MARSZALEK et al., 1979 ; KORTE et BLINN, 1983 ; KNIGHT JONES, 1951). Le biofilm bactérien peut aussi induire la métamorphose de certaines larves d'organismes marins (KIRCHMAN et GRAHAM, 1982).

Cependant, cette succession n'est pas une règle et SKERMAN (1956) en Nouvelle-Zélande, observe que les premiers colonisateurs sont des diatomés et O'NEIL et WILCOX (1971) que des larves de balanes se fixent à des supports bien avant les bactéries.

Au cours de ce travail, l'étude morphologique du biofilm bactérien montre la présence importante des formes bacillaires dans les premiers stades de la colonisation. Les formes coccoïdes suivent de près les bacilles et ces deux groupes apparaissent largement dominants, même à des temps d'immersion plus longs. La plus grande proportion de coques, dénombrés sur les filtres en polycarbonate, est sans doute due au pouvoir de résolution plus faible du microscope photonique, utilisé pour étudier ce matériau. Le microscope électronique à balayage permet plus souvent de trancher entre les formes coccoïdes et bacilles très courts, encore que des erreurs soient fréquentes.

Les formes pédonculées (*Caulobacter* et *Hyphomicrobium*), filamenteuses et "polaires" apparaissent comme des colonisateurs secondaires et



ne sont jamais numériquement dominantes. Cette succession a été précédemment décrite par CORPE (1973), où les formes secondaires n'apparaissent qu'après le 3e jour d'immersion, mais deviennent dominantes dès le 4e jour. MARSHALL et al. (1971 b) observent le même phénomène, mais les formes secondaires apparaissent dès le 2e jour d'immersion. Au cours de cette étude, ces formes sont apparues à des temps d'immersion variables, suivant la saison, entre 1 heure et 2 jours. Il est cependant difficile de se prononcer sur ce phénomène, car ces types bactériens se présentent sous forme de bacille lorsqu'ils sont en suspension dans le milieu et ce n'est qu'après s'être fixés qu'ils changent de forme. Cette transformation morphologique se fait à des vitesses variables, suivant les conditions physico-chimiques que ces bactéries rencontrent au niveau de l'interface (POINDEXTER, 1981 a ; FELDNER et al., 1983 ; Mc COY et COSTERTON, 1982).

Ces différents types morphologiques se fixent aux supports suivant des systèmes variés. Par la microscopie électronique à balayage, les formes bacillaires et coccoïdes apparaissent être fixées aux surfaces par des structures fibrillaires extracellulaires. D'après RICHARDS et TURNER (1984), ce type de structure ne représente qu'un artefact dû à la méthode de préparation des échantillons (fixation par du glutaraldéhyde). En utilisant une méthode cryogénique, ils montrent qu'en réalité, les sécrétions cellulaires forment un mucus qui enveloppe et masque les cellules. La nature chimique de ces sécrétions est très variable et dépend des souches bactériennes (CORPE, 1970). Ce matériel serait de nature polysaccharidique et protéique (MARSHALL, 1981 ; FLETCHER et MARSHALL, 1982 ; CORPE, 1974 ; FLOODGATE, 1972).

Certains bacilles se fixent par un pôle de la cellule ("polaires"). D'après MARSHALL et CRUICKSHANK (1973), cette orientation serait due à la localisation, en ce point de la cellule, d'une zone hydrophobe, qui faciliterait l'adsorption de la bactérie à ce niveau. La surface cellulaire ne serait d'ailleurs pas en contact direct avec la surface solide, mais reliée par des ponts polymériques extracellulaires, probablement de nature polysaccharidique. Les formes pédonculées adhèrent aux surfaces à l'aide d'un crampon (POINDEXTER, 1981 a).

D'après les résultats de cette étude morphologique, il apparaît que la succession des différents types bactériens se développe de façon similaire sur les trois matériaux. Comme pour l'étude quantitative de la colonisation bactérienne, il ne semble pas que la nature du matériel ait influencé cette succession d'un support à l'autre. De même, l'étude qualitative de la flore bactérienne hétérotrophe fixée simultanément sur les trois matériaux, après huit jours d'immersion, montre que les peuplements sont voisins. Malgré leur composition chimique différente, ces matériaux présentent cependant des caractères similaires vis-à-vis de l'adsorption bactérienne (hydrophiles). En immergeant différents matériaux, CARSON et ALLSOPP (1983) notent que des supports hydrophiles (acier inoxydable et verre) sont colonisés par des populations bactériennes voisines, dont les genres dominants sont représentés par des *Pseudomonas* et des *Alteromonas*. Au contraire, sur des substrats hydrophobes (résinés et peintures), les populations bactériennes sont plus diversifiées. De même, GERCHAKOV et al. (1978), sur 100 souches bactériennes isolées durant une période d'immersion de 40 jours, ne notent qu'une faible différence entre les populations fixées sur des surfaces de verre et d'acier inoxydable.

Par l'étude microscopique, il est apparu que différents types morphologiques bactériens se succèdent à la surface des supports, au cours du temps d'immersion. De la même façon, l'étude qualitative de la population hétérotrophe colonisatrice d'un seul matériel, les filtres en polycarbonate, montre que la composition de cette population évolue au cours du temps. Il apparaît que la majorité des bactéries qui sont fixées après un jour d'immersion sont des *Pseudomonadaceae* (57 %), les *Vibrionaceae* ne représentant que 10 % de la population. A l'inverse, après huit et quinze jours d'immersion, les *Vibrionaceae* constituent le groupe dominant (73 %). Les autres groupes bactériens, Entérobactéries, coques et bacilles Gram positif, ne sont jamais présents en très grand nombre. Après un jour d'immersion, CORPE (1977) observe une population similaire fixée à des surfaces de verre. Par contre, après quatre jours, les *Caulobacter* et les *Hyphomicrobium* représentent 75 à 100 % de la population. Mais CAPBLANC et CASSAN (1979) notent que la nature du biofilm bactérien varie suivant la saison et le site de prélèvement. De même, O'NEIL et WILCOX (1971) observent que la composition du biofilm en un même site peut varier d'une année sur

l'autre. Au cours de notre étude, il est apparu que, parmi les bactéries fixées aux filtres Nuclepore, après huit jours d'immersion, les *Vibri-naceae* sont plus nombreux en août qu'en novembre.

Parmi les différents types bactériens rencontrés, les bactéries sulfatoréductrices ont été dénombrées plus particulièrement sur un milieu spécifique. Lors de la construction d'un ouvrage métallique en mer, il est en effet important de pouvoir évaluer la croissance de ce groupe bactérien. Vis-à-vis d'une structure métallique, par les réactions électrochimiques qu'elles développent au cours de leur métabolisme, les bactéries sulfato-réductrices sont très agressives. Elles interviennent directement au niveau des processus de corrosion des matériaux et accélèrent leur dégradation (LAQUE, 1975 ; CHANTEREAU, 1980 ; COSTERTON et LASHEN, 1984). Le nombre des bactéries sulfatoréductrices, isolées des filtres Nuclepore, est toujours resté faible, même après deux mois d'immersion. La même expérience n'a malheureusement pas été effectuée parallèlement sur une surface métallique, pour comparaison. Mais il est vraisemblable que le substrat utilisé ne stimule pas la croissance de ce type de bactéries. En effet, sur des surfaces de verre immergées pendant 12 jours, O'NEIL et WILCOX (1971) observent le même phénomène, alors que sur des surfaces d'acier inoxydable immergées simultanément, les densités de ce type bactérien sont déjà importantes. Bien que les densités bactériennes totales et les successions des types morphologiques soient similaires sur les trois matériaux, il apparaît donc que la nature chimique du matériel immergé peut influencer la croissance de certains types bactériens. Ce phénomène a d'ailleurs pu être visualisé en microscopie électronique à balayage sur les échantillons d'aluminium. Sur ce matériel, certaines bactéries peuvent ainsi former des microcolonies importantes au niveau des zones de corrosion.

Au cours de ce travail, certaines différences quantitatives et qualitatives sont apparues suivant la technique d'étude utilisée. Dans certains cas, ces variations sont constantes et dans d'autres "transitoires". Entre les dénombrements microscopiques et ceux effectués sur le milieu de culture 2216 E, la différence est à peu près constante tout au long de l'étude, par contre, entre deux milieux de culture ou deux méthodes de dénombrements sur un même milieu, ces différences peuvent varier suivant l'échantillon considéré.

Quelle que soit la période de prélèvement, les dénombrements de la flore bactérienne viable en suspension dans le milieu marin ont toujours été inférieurs aux numérations totales effectuées par microscopie (facteur 100 en moyenne). De même pour les populations bactériennes fixées, il apparaît que le nombre de bactéries décrochées de la surface des filtres Nuclepore par "Stomacher" et qui se développent sur le milieu 2216 E, ne représente que 0,3 % de la population fixée dénombrée par microscopie. De plus, la méthode microscopique permet de mettre en évidence de nombreux types morphologiques bactériens, alors que la majorité des cellules isolées sur le milieu 2216 E ne sont que des bacilles. En utilisant différentes techniques de numération, JANNASCH et JONES (1959) notent que la méthode microscopique permet de dénombrer 13 à 9.700 fois plus de bactéries que les méthodes de culture.

Bien que le milieu utilisé soit le moins sélectif possible (2216 E), toutes les bactéries n'ont pu s'y développer, notamment les bactéries oligotrophes (AKAGI et al., 1977). En effet, dans le milieu naturel, l'activité des microorganismes hétérotrophes est très liée à la quantité de matière organique et inorganique disponible (AKAGI et al., 1977 ; HOROWITZ et al., 1983 ; ZOBELL, 1943) et il est ainsi possible de distinguer deux types de bactéries hétérotrophes : les bactéries oligotrophes (KUZNETSOV et al., 1979) et les bactéries copiotrophes (POINDEXTER, 1981 b).

Les bactéries oligotrophes se présentent généralement sous forme de petites cellules capables de se développer rapidement sur des milieux contenant des concentrations minimums en matières organiques. Elles ne peuvent pas se développer sur des milieux riches mais par contre, sont capables de croître sous une grande variété de conditions physiologiques et de composés nutritifs. Ces cellules peuvent être équipées d'appendices qui ont pour fonction d'augmenter la surface d'échange de la membrane cellulaire (*Caulobacter*, *Hyphomicrobium*).

Les bactéries copiotrophes se présentent sous des formes variées. Pour se développer, elles requièrent une quantité relativement élevée en matériel nutritif et dans ces conditions, leur croissance est très rapide.

En utilisant deux milieux de culture de concentration très différente en matériel nutritif (l'un très riche, l'autre très pauvre), il a été possible d'observer une évolution des populations bactériennes fixées au cours du temps, en fonction de leur besoin en éléments nutritifs. En examinant les types morphologiques bactériens fixés et en considérant les formes pédonculées comme représentatives de la population oligotrophe, une succession de ce type a déjà pu être mise en évidence. De plus, en utilisant ces deux milieux de culture, il semblerait que cette succession se fasse très rapidement. Après six heures d'immersion, la densité des bactéries copiotrophes fixées aux filtres Nuclepore est plus importante. Ensuite, les densités de bactéries se développant sur les deux milieux sont similaires et la proportion des bactéries oligotrophes, ainsi dénombrées (50 % de la population), indique que les bactéries pédonculées ne représentent qu'une faible partie de la population oligotrophe totale.

Malgré ces différences quantitatives observées suivant le milieu d'isolement utilisé, il apparaît qu'une fois isolés, ces deux types bactériens (oligotrophe et copiotrophe) se développent ensuite très bien sur le milieu de culture opposé.

Les bactéries copiotrophes se sont très bien développées sur le milieu pauvre. L'adaptation de ces bactéries à des conditions de culture extrêmes a déjà été décrite par NOVITSKY et MORITA (1976) sur le *Vibrio*. Ant 300 et ensuite par AMY et MORITA (1983) sur 16 souches bactériennes hétérotrophes isolées du milieu marin.

Dans leur revue bibliographique, KUZNETSOV et al. (1979) rapportent que, si les bactéries oligotrophes ne peuvent se développer sur un milieu riche en premier isolement, elles sont par contre capables de très bien se développer sur un milieu riche en deuxième culture (le tableau de synthèse des principales propriétés de culture de ces bactéries, proposé par ces auteurs, est reporté dans l'annexe IX). De même, dans un environnement subarctique, HOROWITZ et al. (1983) suggèrent que l'euryhétérotrophie, par opposition à l'oligotrophie, serait caractéristique des populations bactériennes de ce milieu. De plus, ISHIDA et al. (1980) suggèrent que le groupe des bactéries oligotrophes peut, lui-même, être divisé en deux : les bactéries oligotrophes strictes, qui ont tendance à rester planctoniques,

et les bactéries oligotrophes facultatives qui ont tendance à se fixer à des surfaces (particules). Cette dernière remarque laisserait supposer que la population bactérienne qui se fixe à des surfaces ne serait donc composée que de bactéries copiotrophes et oligotrophes facultatives.

En plus de ces différences de dénombrements qui apparaissent suivant le milieu de culture utilisé et suivant la technique de numération employée (microscopie ou culture), certaines variations "transitoires" sont apparues pour un même milieu de culture, suivant qu'il soit à l'état solide ou liquide.

Ainsi, les bactéries isolées des filtres Nuclepore après huit et quinze jours d'immersion, sur le milieu 2216 E, se développent en plus grande quantité dans sa forme liquide que sur sa forme solide, dans les mêmes proportions que les bactéries en suspension isolées de l'eau de mer (environ 10 fois plus). En effectuant des dénombrements de bactéries viables en suspension dans le milieu marin, JANNASCH et JONES (1959) notent que la méthode NPP permet de dénombrer 20 à 35 fois plus de bactéries que la méthode par étalement sur milieu solide. Ils suggèrent que cette différence provient du fait que, sur le milieu solide, les agrégats cellulaires et les cellules fixées à des particules ne se développent que sous la forme d'une colonie unique. Ce phénomène d'aggrégation pourrait être responsable de la différence de dénombrement observée dans cette étude car, comme l'ont remarqué ZOBELL (1943), CORPE (1973) et MILLS et MAUBREY (1981), à l'intérieur de la population bactérienne fixée, le nombre d'aggrégats cellulaires augmente avec le temps d'immersion.

Au contraire, après un jour d'immersion, les bactéries hétérotrophes décrochées des supports se développent en plus grand nombre (20 fois plus) sur le milieu 2216 E solide que dans le même milieu liquide. Il semblerait donc que la possibilité qu'offre le milieu solide, à ces premières bactéries colonisatrices, de se fixer à des particules solides, permette à une plus grande partie de la population de se développer.

Ce phénomène n'a été observé qu'une seule fois et il est donc difficile de le généraliser. Cependant, il pourrait être lié à l'effet positif qu'apporte, dans certaines conditions, une surface sur le métabolisme

des cellules (FLETCHER, 1979 ; ELLWOOD et al., 1982) et/ou à la différence d'activité que présentent les bactéries suivant le temps d'immersion des échantillons.

D'après les résultats de cette étude, il apparaît que le volume des cellules bactériennes fixées sur les filtres Nuclepore varie de façon importante durant l'immersion et de façon différente suivant la saison considérée. Ces variations pourraient correspondre à un changement de l'activité des cellules (KJELLEBERG et al., 1982).

Que ce soit en période estivale ou hivernale, les premières bactéries qui se fixent aux surfaces sont très petites (de 0,08 à 0,2  $\mu\text{m}^3$ ). Ce phénomène a déjà été observé par MARSHALL et al. (1971 b), qui suggèrent que ces cellules pourraient correspondre à des formes naines de bactéries hétérotrophes. En effet, le milieu océanique, bien qu'il soit sujet à des variations très rapides d'enrichissement ou d'appauvrissement (POINDEXTER, 1981 b), est généralement considéré comme un milieu pauvre. La concentration de carbone organique est souvent inférieure à 1 ou 0,5  $\text{mg.l}^{-1}$  (MENZEL et RYHER, 1970). Dans ce milieu, la majorité des bactéries se trouve sous forme de petites cellules (ZIMMERMAN et MEYER-REIL, 1974 ; TORRELLA et MORITA, 1981) et serait en état de "dormance" (MORITA, 1982). Ainsi NOVITSKY et MORITA (1976 et 1978), de même que AMY et MORITA (1983), observent que de nombreuses bactéries hétérotrophes copiotrophes sont capables de résister à un jeûne prolongé et s'y adaptent de façon active. Au cours de ce processus, ces bactéries diminuent leur taille, changent l'aspect externe de leur surface et abaissent leur activité métabolique (KJELLEBERG, 1984).

Durant le mois de mai 1984, une fois fixées, les cellules bactériennes augmentent ensuite leur volume de façon importante (4 fois) durant les douze premières heures d'immersion. Cette variation pourrait correspondre à l'augmentation de volume (12 fois) qui précède la division cellulaire, observée sur un *Vibrio* sp. espèce DW1 après 30 jours de jeûne, lorsqu'il retrouve des conditions nutritives favorables (KJELLEBERG et al., 1982). Dans le milieu naturel, le film chimique primaire adsorbé à la surface des supports (BAIER, 1980) pourrait représenter cet apport nutritif. L'augmentation rapide du volume cellulaire, observée en période estivale, pourrait donc précéder une phase de multiplication active qui se développerait

durant la phase de colonisation active et rapide observée à cette saison. Ensuite, le volume des cellules diminue, en même temps que la croissance du biofilm ralenti.

Par contre en hiver, le volume des cellules n'augmente que très lentement et la croissance du biofilm est parallèlement lente et régulière. A cette période de l'année, la quantité et la qualité des éléments nutritifs présents à l'interface, de même que les conditions physico-chimiques du milieu, notamment la température, ne sont sans doute pas favorables à l'augmentation rapide de l'activité métabolique des cellules.

L'effet positif que peut apporter une surface sur le métabolisme et la croissance des bactéries, une fois fixées, a déjà été observé lors de nombreux travaux. Ainsi, par microautoradiographie, FLETCHER (1979) note qu'un *Pseudomonas* sp. fixé métabolise plus vite des acides aminés marqués que les mêmes cellules en suspension, mais indique que suivant la nature de la surface, l'activité est plus ou moins importante. De même KIRCHMAN et MITCHELL (1982) observent que des cellules épiphytes incorporent du glucose marqué à un taux nettement supérieur à celui des cellules en suspension. Cependant, en mesurant l'incorporation du même substrat, GORDON et al. (1983) notent qu'un *Vibrionaceae* est plus actif en suspension qu'une fois fixé. En utilisant un milieu de culture de faible concentration en carbone, ELLWOOD et al. (1982) observent qu'un *Pseudomonas* associé à une surface croît deux fois plus vite que les cellules qui restent en suspension dans le milieu. Ces auteurs interprètent ce phénomène sur les bases de l'hypothèse de chimiosmorégulation du potentiel membranaire. Lors de cette régulation, des protons (H<sup>+</sup>) diffusent à l'extérieur de la membrane cellulaire. La présence d'une interface empêcherait ces protons de diffuser dans le milieu et ceux-ci pourraient être à nouveau incorporés dans la cellule par des ATPases, produire une plus grande quantité d'ATP et donc augmenter le métabolisme et la croissance des cellules. Dans le milieu naturel, ZOBELL (1943) interprète l'effet bénéfique d'une surface sur l'activité cellulaire, du fait de la concentration de matériel nutritif à l'interface et par la non diffusion des exoenzymes digestifs des cellules dans le milieu.

Comme il a été cité précédemment, du fait de la pauvreté du milieu océanique, la majorité des bactéries de ce milieu se trouve sous forme de



petites cellules (ZIMMERMAN et MEYER-REIL, 1974). Ces bactéries pourraient représenter des formes de résistance de bactéries hétérotrophes, face à de longues périodes de jeûne (KJELLEBERG et al., 1982). D'après DAWSON et al. (1981), pour ces petites cellules, l'adhésion à une surface représenterait une tactique de survie. Cependant, le milieu naturel peut être sujet à des variations rapides d'enrichissement (POINDEXTER, 1981 b). Suivant la valeur nutritive du milieu naturel les bactéries libres, avant d'adhérer à une surface, peuvent donc présenter un volume cellulaire et une activité métabolique variables.

Dans le chapitre suivant, le comportement d'un *Pseudomonas* sp., isolé lors de cette première expérience, a été étudié à la fois dans la phase liquide et au niveau d'une surface, suivant qu'il ait ou non subi une période de jeûne préalable.

C H A P I T R E    I I I

---

ETUDE AU LABORATOIRE DE LA COLONISATION BACTERIENNE  
- INFLUENCE DE L'ETAT PHYSIOLOGIQUE DES BACTERIES -

CHAPITRE III - ÉTUDE AU LABORATOIRE DE LA COLONISATION  
BACTÉRIENNE - INFLUENCE DE L'ÉTAT  
PHYSIOLOGIQUE DES BACTÉRIES

Au cours de l'expérience précédente, il est apparu que les premiers organismes qui colonisent les supports sont des bactéries hétérotrophes dont la majorité est représentée par des bacilles de très petite taille. En fonction du temps d'immersion, le volume des cellules fixées montre ensuite des variations, qui peuvent être très rapides en période estivale.

Au cours de ce travail, un *Pseudomonas* isolé de la surface d'un filtre Nuclepore, immergé pendant un jour, a été placé dans des conditions de jeûne extrême pendant 60 heures. L'étude a porté sur les variations du taux de fixation de cette bactérie, à une surface d'aluminium, selon qu'elle ait subi ou non un jeûne préalable. Parallèlement, les variations des volumes cellulaires et des nombres de cellules en division ont été mesurées, respectivement à l'intérieur des populations libres et fixées.

1 - CHOIX DE LA SOUCHE BACTÉRIENNE

La souche bactérienne utilisée pour cette étude de recolonisation a été choisie parmi celles qui ont été isolées des supports durant les expériences qualitatives de mai et novembre 1984.

Cinq bacilles Gram négatif de la famille des *Pseudomonadaceae* ou des *Vibrionaceae* (Bergey's manual, 1974) ont été préalablement retenus (cf. Annexe VI). Trois de ces souches proviennent des surfaces d'acier inoxydable, une de filtre Nuclepore et une de l'aluminium.

Sachant que toutes ces souches ont la faculté d'adhérer à des supports, la sélection s'est faite suivant deux critères. Il fallait tout

d'abord que la souche se développe bien dans le milieu de culture liquide 2216 E, à la température du laboratoire (18° - 20°C), mais aussi qu'elle le fasse sans floculation. Ce dernier point est très important pour permettre une meilleure précision dans les mesures, au cours des dilutions et lors des comptages microscopiques.

Le tableau n° 7, donne les réponses de chaque bactérie vis-à-vis de différentes températures d'incubation. La lecture des tubes est faite après deux jours d'incubation ou huit jours pour les températures de 6° et 12°C. L'intensité du trouble est évaluée à l'oeil nu.

Parmi les deux souches bactériennes qui se développent bien aux températures choisies, sans flocculer, la bactérie 1J21, isolée de la surface d'un filtre Nuclepore, est choisie de façon arbitraire.

<i>Souches</i> \ <i>T °C</i>	6	12	18	25	30	37
I 19*	++	++	++	-	-	-
I 17	-	-	-	+	+	++
I 18	++	+	+	-	-	-
Alu 3	++	++	++	++	-	-
1J21	+	+	++	++	+	-

++ : trouble intense      + : faible trouble      - : aucun trouble

\* : souche se développant en flocculant

Tableau 7 : Suivi du développement de cinq souches bactériennes, à différentes températures d'incubation, dans un milieu liquide 2216 E.

## 2 - CARACTERISTIQUES DE LA SOUCHE BACTERIENNE ETUDIEE

### 2.1. CARACTERES MORPHOLOGIQUES - ECOLOGIQUES - BIOCHIMIQUES

Cette bactérie est un bacille Gram négatif mobile, non sporulé, qui ne se développe pas sur un milieu de salinité nulle (0 ‰ NaCl). Elle possède une oxydase, une catalase et ne présente pas d'activité protéolytique (gélatinase). Elle ne fermente pas le glucose et ne dégrade aucun des carbohydrates qui lui ont été proposés (saccharose, L.arabinose, mannitol, fructose, glucose, maltose, amidon, rhamnose, galactose, mannose, sorbitol et glycérol). Elle ne réduit pas les nitrates en nitrite, ne possède pas d'uréase, ne produit pas d'H<sub>2</sub>S à partir du thiosulfate et n'utilise pas le citrate comme seule source de carbone.

La plupart de ces caractères définissent cette bactérie comme un *Pseudomonadaceae* (Bergey's Manual, 1974).

### 2.2. TAUX DE CROISSANCE

#### 2.2.1. Protocole

La croissance de la souche 1J21 est suivie dans le milieu liquide 2216 E. Après inoculation, un flacon d'un litre, contenant 900 ml de ce milieu, est incubé pendant 58 heures à 20°C. Il est constamment agité sur un agitateur horizontal (GFL mbH and Co) à raison de 112 périodes par minute.

Les prélèvements sont effectués toutes les quatre heures et les densités bactériennes sont évaluées suivant les deux techniques décrites au chapitre I (1.3.3. et 2.1.), c'est-à-dire sur milieu de culture gélosé 2216 E et par épifluorescence.

#### 2.2.2. Résultats

Les courbes de croissance obtenues par les deux méthodes de numération sont représentées sur la figure 31.

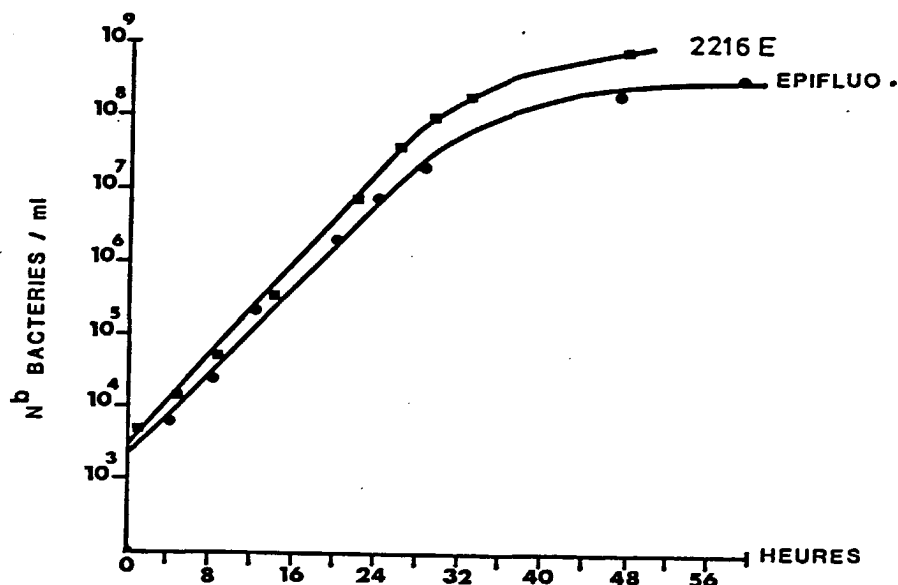


Figure 31 : Croissance de la bactérie 1J21 en milieu de culture liquide 2216 E à 20°C, selon deux méthodes de numération (● épifluorescence, ■ étalement sur 2216 E gélosé).

Du fait de la concentration de l'inoculum  $2.10^3$  cellules.ml<sup>-1</sup>, la phase de latence n'apparaît pas sur ce graphique. Dès le début de l'expérience, la croissance se développe de façon exponentielle, jusqu'à 32 heures d'incubation. Ensuite, elle décroît et la phase stationnaire se développe après 48 heures.

Quel que soit le temps de prélèvement, les numérations effectuées sur milieu de culture sont toujours supérieures aux dénombrements faits par épifluorescence. Cet écart est sensiblement constant durant toute la croissance et est égal à un facteur 2.

Le taux de croissance spécifique de cette bactérie est évalué entre 8 heures et 24 heures d'incubation, selon la formule suivante (MONOD, 1942) :

$$\mu = \frac{\text{Log } x_2 - \text{Log } x_1}{(T_2 - T_1) \text{ Log } 2}$$

$x_2$  = densité bactérienne à 24 h ( $T_2$ )

$x_1$  = densité bactérienne à 8 h ( $T_1$ )

D'après l'évolution des densités de bactéries viables, il est de  $0,63.h^{-1}$ .

Ce type de culture en milieu clos, non aéré, ne permet d'obtenir qu'une concentration finale de  $3,4$  à  $7,4.10^8$  cellules.ml<sup>-1</sup>.

Le pourcentage de cellules en division, dénombrées en épifluorescence, varie au cours de la croissance de la bactérie (Figure 32). La multiplication cellulaire augmente très rapidement après l'inoculation. Elle passe par un maximum de 50 % après 8 heures d'incubation, puis reste sensiblement constante (23 à 27 %) durant la phase de croissance exponentielle. Après 32 heures d'incubation, le pourcentage de cellules en division diminue progressivement pour atteindre 12 % à la 56e heure.

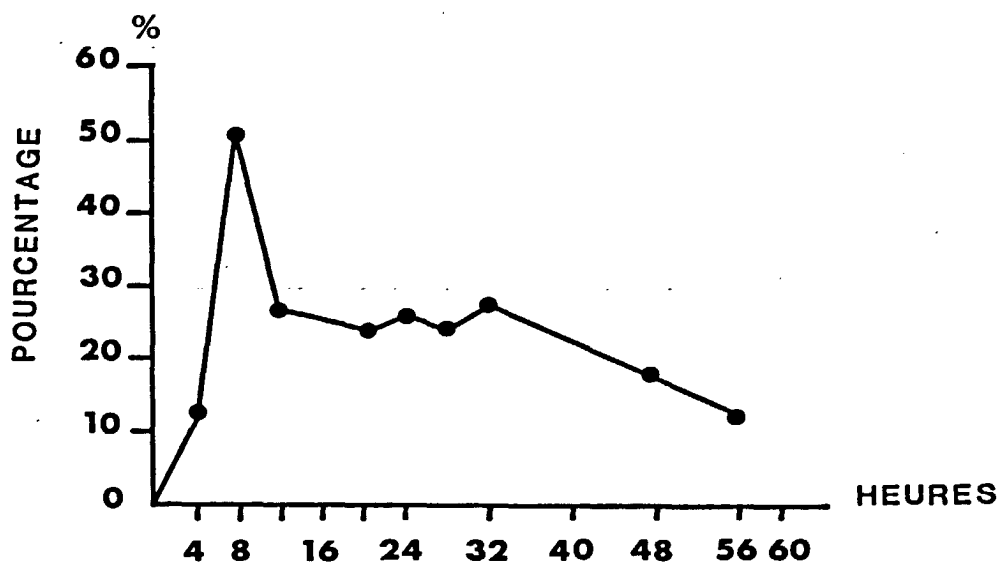


Figure 32 : Variation du pourcentage de cellules en division au cours de la croissance de la souche 1J21 à 20°C.

### 3 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

#### 3.1. CONDITIONS DE CULTURE

La souche bactérienne est cultivée dans le même milieu et suivant les mêmes conditions que celles décrites précédemment au paragraphe 2.2.1. Afin d'avoir une concentration cellulaire suffisante, deux flacons d'un litre sontensemencés. La croissance des cellules est ensuite suivie par épifluorescence.

#### 3.2. PROTOCOLE DE MISE EN ETAT DE JEÛNE

Les cellules sont récupérées du milieu de culture, en fin de phase de croissance exponentielle (environ  $10^7$  cellules.ml<sup>-1</sup>), par centrifugation à 2 000 x g pendant 20 minutes (technique modifiée de NOVITSKY et MORITA, 1978). Les cellules contenues dans le culot de centrifugation sont rincées deux fois. Suivant l'utilisation ultérieure des cellules, deux milieux de rinçage différents sont utilisés :

- les bactéries mises en état de jeûne avant d'être utilisées pour l'expérience de colonisation sont directement rincées avec la solution saline stérile (MO) (NOVITSKY et MORITA, 1976), qui sert de milieu de jeûne. Les cellules sont ensuite maintenues 60 heures dans ce milieu, à une densité initiale de  $3,2 \cdot 10^7$  cellules.ml<sup>-1</sup> ;

- les bactéries utilisées directement pour l'expérience de colonisation, sans subir de jeûne, sont rincées dans de l'eau de mer artificielle (EM) (LYMAN et FLEMING, 1940).

Les compositions de ces deux milieux, EM et MO, sont données dans l'Annexe IV.

#### 3.3. DESCRIPTION DU SYSTEME EXPERIMENTAL

Le matériel de colonisation choisi est un alliage d'aluminium de quelques dizaines de microns d'épaisseur (feuilles d'aluminium Alfac à usage ménager). Des rectangles de 5 x 10 cm sont découpés dans ces feuilles, puis passés au four à 450°C pendant une nuit, afin de les stériliser et de détruire la matière organique pouvant être fixée à leur surface.



Ces échantillons sont ensuite introduits aseptiquement, verticalement, dans des piluliers de prélèvement de 30 ml, stériles, en plastique (Bourseuil, Réf. TPS 30), de façon à ce que toute la paroi interne de ces récipients soit couverte par ce matériel.

Les bactéries récupérées par centrifugation et rincées dans les deux milieux EM et MO sont parallèlement remises en suspension dans le milieu expérimental, qui est composé d'eau de mer artificielle stérile, contenant  $10 \text{ mg.l}^{-1}$  de Casaminoacides (Difco). Cette quantité d'acides aminés représente un apport de  $2,7 \text{ mg.l}^{-1}$  de carbone organique dissous. La souche 1J21 ne dégradant aucun des sucres qui lui ont été proposés lors de la détermination de ses caractères biochimiques (paragraphe 2.1.), il a semblé préférable de lui proposer un mélange d'acides aminés comme source de matériel carboné. La concentration en oxygène dissous de ce milieu est de  $7,31 \text{ mg.l}^{-1}$ .

A partir de ces suspensions, deux séries de quatre suspensions cellulaires de concentrations décroissantes,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$  et  $10^3$  cellules. $\text{ml}^{-1}$ , sont ensuite effectuées par dilution. Cette gamme de concentrations cellulaires encadre les densités de bactéries en suspension généralement dénombrées dans le milieu marin (Chapitre II - 1.2.). Trente millilitres de chaque suspension cellulaire sont ensuite versés dans chacun des piluliers contenant une feuille d'aluminium. Ces suspensions de bactéries sont laissées en contact avec les surfaces d'aluminium pendant 30 minutes, 1 h, 2 h, 4 h et 6 h, à  $20^\circ\text{C}$ . Chaque expérience est triplée.

A la fin de chaque expérience, chaque suspension cellulaire est récupérée, puis fixée au formaldéhyde (concentration finale 2 %). Le pilulier contenant toujours la feuille d'aluminium est ensuite rincé deux fois avec de l'eau de mer artificielle stérile, puis rempli d'une solution d'eau de mer artificielle stérile formolée (2 %) pendant 24 heures. Cette solution est ensuite remplacée par de l'eau distillée stérile formolée (2 %) afin de ralentir les processus de corrosion de l'aluminium et donc permettre une meilleure conservation des échantillons.

### 3.4. MESURE DES VARIATIONS DE DENSITE ET DE VOLUME CELLULAIRE

Au cours de cette expérimentation, le nombre des cellules fixées à l'aluminium et en suspension dans les différents milieux, est évalué par comptage de 20 champs microscopiques (grossissement 1 000 x) en épifluorescence (Chapitre I - 3.1.3.).

Les variations des volumes cellulaires sont évaluées à l'aide d'un analyseur d'images (Optamax PS2), à partir de microphotographies (Chapitre I - 3.1.5.). L'étude de la variation des volumes cellulaires des bactéries fixées et en suspension n'a été effectuée que pour les échantillons ayant été en contact avec les suspensions cellulaires de  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>.

### 3.5. ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS

La normalité de la distribution des bactéries déposées à la surface des filtres après filtration, ainsi que celle de la distribution des bactéries fixées aux échantillons d'aluminium, sont estimées par la méthode de la droite de Henri (LIORZOU, 1973). Pour chaque distribution, les bactéries sont dénombrées sur 200 champs microscopiques sur un échantillon, afin de vérifier la loi.

La normalité de la distribution du volume cellulaire des bactéries, à l'intérieur d'un même échantillon, est vérifiée par la même méthode sur l'un des prélèvements. Le calcul porte sur la mesure du volume de 220 cellules. Le résultat est ensuite étendu à tous les autres échantillons. Les calculs de ces trois tests statistiques sont présentés dans l'annexe V.

Les valeurs de tous les résultats à venir seront présentées avec un intervalle de confiance à 95 %, calculé à partir de la table de Student.

#### 4 - RESULTATS

##### 4.1. VARIATION DU VOLUME CELLULAIRE AU COURS DES MANIPULATIONS

Au cours des différentes manipulations de préparation, le volume des cellules varie énormément (Tableau 8).

	Cellules après 24 h de crois- sance dans le milieu liquide 2216 E	Cellules après centrifugation	Cellules après 39 h de jeûne	Cellules après 60 h de jeûne
Volumes* cellulaires $\mu\text{m}^3$	$0,83 \pm 0,04$	$0,47 \pm 0,02$	$0,24 \pm 0,01$	$0,177 \pm 0,009$

\* Les intervalles de confiance à 95 % sont calculés d'après la table de Student.

Tableau 8 : Variation du volume cellulaire au cours des manipulations

Lorsque les cellules sont récupérées du milieu liquide 2216 E, en fin de phase de croissance, elles ont une forme de bâtonnet très large, d'un volume moyen de  $0,83 \mu\text{m}^3$ . Après centrifugation et deux rinçages avec le milieu EM, les cellules gardent leur forme de bacille mais le volume baisse de moitié, il est de  $0,47 \mu\text{m}^3$ . La différence de pression osmotique qui existe entre le milieu 2216 E (salinité : 28 ‰) et le milieu de rinçage EM (salinité : 35 ‰) pourrait être responsable de cette variation. Le volume  $0,47 \mu\text{m}^3$  correspond à celui des cellules qui servent pour l'expérience de colonisation sans phase de jeûne préalable.

Au cours du jeûne dans le milieu MO, les cellules sont progressivement passées de leur forme de bâtonnet à une forme sphérique. Au cours de cette période, les cellules sont passées par un volume de  $0,24 \mu\text{m}^3$  après 39 heures d'incubation et mesurent  $0,177 \mu\text{m}^3$  après 60 heures. Ce résultat montre que les cellules ont ainsi perdu 78 % de leur volume initial, en fin de phase de croissance exponentielle dans le milieu 2216 E. Ce dernier volume correspond à celui qu'elles ont au début de l'expérience de colonisation précédée d'une phase de jeûne.

#### 4.2. DENSITES CELLULAIRES AU DEBUT DE L'EXPERIENCE

Le nombre total de bactéries, ainsi que le nombre de cellules viables, de chaque suspension cellulaire, sont contrôlés au début de l'expérience, respectivement par épifluorescence et par étalement sur milieu gélosé 2216 E (Tableau 9).

Concentrations théoriques Nombre $\text{C.ml}^{-1}$	Cellules n'ayant pas jeûné (EM)		Cellules ayant jeûné 60 h (MO)	
	Épifluorescence	2216 E	Épifluorescence	2216 E
$10^6$	$5,7 \cdot 10^6$	$7,3 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^6$
$10^5$	$2,8 \cdot 10^5$	$4,7 \cdot 10^5$	$8,7 \cdot 10^4$	$2,2 \cdot 10^5$
$10^4$	$2,1 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^4$	$7,3 \cdot 10^3$	$1,6 \cdot 10^4$
$10^3$	$3,4 \cdot 10^3$	$5,9 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$

Tableau 9 : Densités des suspensions cellulaires au début des expériences.

Quel que soit le traitement qu'ont subi les cellules, les densités de bactéries viables sont toujours supérieures à celles des densités totales. Le facteur de différence entre ces deux méthodes de dénombrement est à peu près constant, quelle que soit la dilution. Il vaut 1,5 environ pour les cellules rincées dans le milieu EM et 2,2 pour les cellules qui ont jeûné 60 heures dans le milieu MO. Malgré les différences de dénombrement qui apparaissent entre la méthode microscopique et de culture, il semble que la majorité des cellules soit restée viable après le jeûne.

Dans tous les cas, les densités trouvées ne sont pas égales aux densités théoriques prévues, elles leurs sont soit inférieures, soit supérieures. Dans les paragraphes suivants, chaque suspension cellulaire sera quand même désignée par sa valeur théorique.

### 4.3. BACTERIES QUI N'ONT PAS SUBI DE JEÛNE

#### 4.3.1. Evolution des bactéries en suspension

Les variations des nombres de cellules en suspension et des pourcentages de cellules en division sont respectivement représentées sur la figure 33 et le tableau 10.

Nombre de cellules en suspension/ml	Temps					
	0	30 mn	1 h	2 h	4 h	6 h
10 <sup>3</sup>	4,2	4,7	4,3	4,5	5	18,2
10 <sup>4</sup>	4,5	4,6	8,6	7	7,9	8,8
10 <sup>5</sup>	4,8	-	9,5	7,7	5,8	10,9
10 <sup>6</sup>	4,6	-	5,6	6,4	3,7	4,8

Tableau 10 : Pourcentages de bactéries en division dans les suspensions cellulaires.

Pour les concentrations 10<sup>3</sup> et 10<sup>6</sup> cellules.ml<sup>-1</sup>, les densités restent stables, ainsi que les pourcentages de cellules en division qui évoluent entre 3,7 et 6,4 %. Après la 4e heure, la proportion des cellules en division de la suspension 10<sup>3</sup> cellules.ml<sup>-1</sup> augmente rapidement jusqu'à 18,2 %, mais ce changement ne fait que très peu varier la densité cellulaire.

Pour les concentrations 10<sup>4</sup> et 10<sup>5</sup> cellules.ml<sup>-1</sup>, la légère augmentation des densités, qui se développe après la 2e heure, multiplie respectivement les deux concentrations cellulaires par 4 et 2 en fin d'expérience. Le pourcentage de cellules en division est doublé en une heure. Il passe, en moyenne, de 4,5 à 9 %. Ensuite il baisse, puis réaugmente lentement au cours des heures suivantes, pour atteindre respectivement 8,8 et 10,9 %.

#### 4.3.2. Evolution des densités et des vitesses de colonisation des bactéries fixées

La colonisation des surfaces d'aluminium par les bactéries des différentes suspensions, ainsi que les vitesses de colonisation, sont représentées sur la figure 34.

Etant donné le trop faible nombre de cellules fixées, dénombrées par champ microscopique pour la suspension  $10^3$  cellules.ml<sup>-1</sup>, et l'erreur de mesure qui en découle, les courbes de colonisation correspondantes n'ont pas été représentées.

Pour la suspension  $10^4$  cellules.ml<sup>-1</sup>, le nombre des bactéries fixées reste sensiblement identique durant les quatre premières heures d'immersion, environ  $2,5 \cdot 10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>. Durant les deux dernières heures, la population fixée est multipliée par 2,4. Au niveau des vitesses de colonisation, ceci se traduit par une chute importante de cette vitesse jusqu'à la 4e heure d'incubation ( $2,8 \cdot 10^2$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>), suivie d'une brusque augmentation en fin d'expérience ( $1,7 \cdot 10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>).

Pour la suspension  $10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup>, le nombre de bactéries fixées augmente lentement jusqu'à deux heures d'immersion ( $1,1 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>), puis de façon plus rapide, pour atteindre  $5,8 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup> en fin d'expérience. La population fixée est ainsi multipliée par 13,7 entre 30 minutes et 6 heures d'immersion. La vitesse de colonisation atteint sa valeur maximum,  $1,3 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> après 4 heures d'incubation.

Pour la suspension de concentration  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>, la densité de bactéries fixées est très importante dès le début de l'expérience ( $1,6 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>) et augmente rapidement jusqu'à 2 heures d'incubation ( $8,1 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>). C'est à cette heure que la vitesse de colonisation est maximum ( $4,9 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>) puis elle ralentit progressivement. La densité atteinte en fin d'expérience est de  $1,2 \cdot 10^6$  cellules.cm<sup>-2</sup>, ce qui représente 7,4 fois la densité de cellules fixées après 30 minutes.

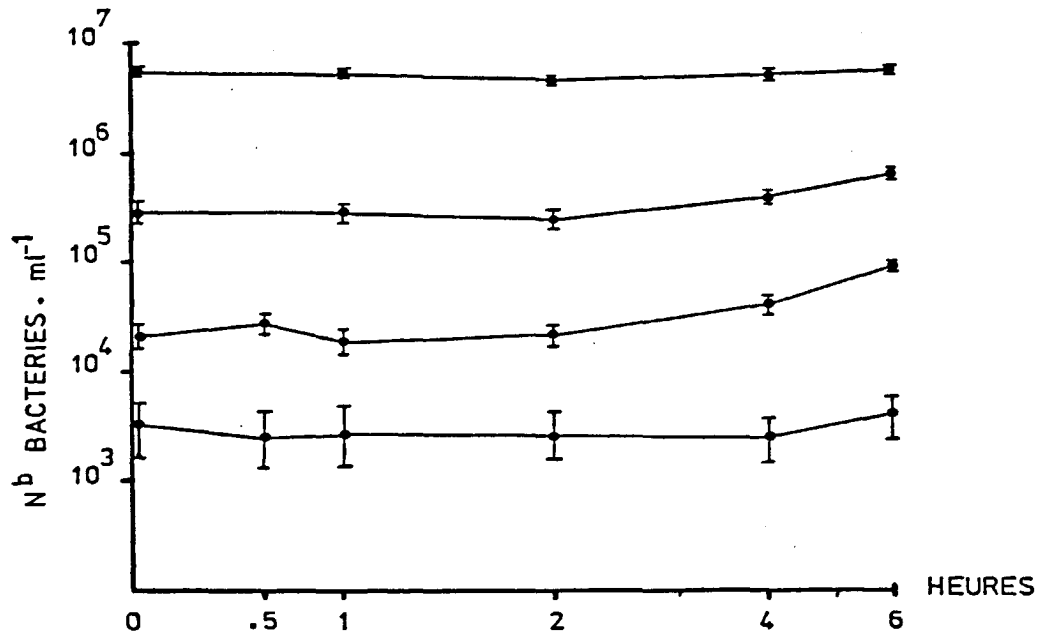


Figure 33 : Evolution des densités bactériennes en suspension durant l'expérimentation, pour les cellules qui n'ont pas subi de jeûne (représentation Log-Log).

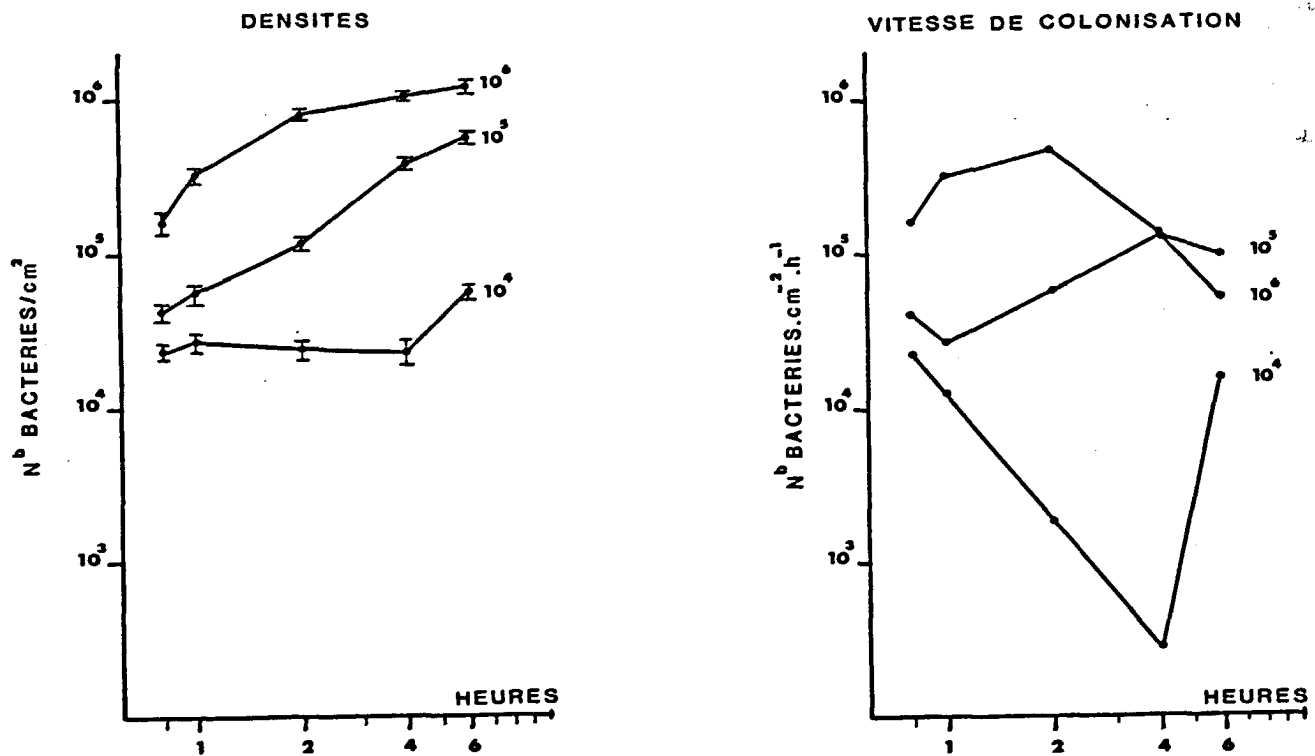


Figure 34 : Evolution des densités de bactéries fixées et des vitesses de colonisation, pour les cellules qui n'ont pas subi de jeûne (représentation Log-Log).

A l'intérieur de ces populations bactériennes fixées, les évolutions des pourcentages de cellules en division au cours du temps, ont été notées et représentées dans le tableau 11.

Nombre de bactéries en suspension/ml	Temps				
	30 mn	1 h	2 h	4 h	6 h
$10^4$	0,6	0,25	1,35	4,4	6,7
$10^5$	0,41	0	8,2	5,3	5,2
$10^6$	0,21	1,65	6,3	5,9	2,8

Tableau 11 : Pourcentages de bactéries en division dans les populations bactériennes fixées.

Pour la suspension  $10^4$  cellules.ml<sup>-1</sup>, le pourcentage de cellules en division augmente avec le temps d'immersion et atteint 6,7 % après six heures.

Pour les suspensions  $10^5$  et  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>, ce pourcentage passe par un maximum après deux heures d'immersion (respectivement 8,2 et 6,3 %).

#### 4.3.3. Evolution des volumes cellulaires

Le volume des cellules fixées aux surfaces d'aluminium et de celles qui restent en suspension dans le milieu, varie énormément au cours du temps d'immersion (Figure 35).



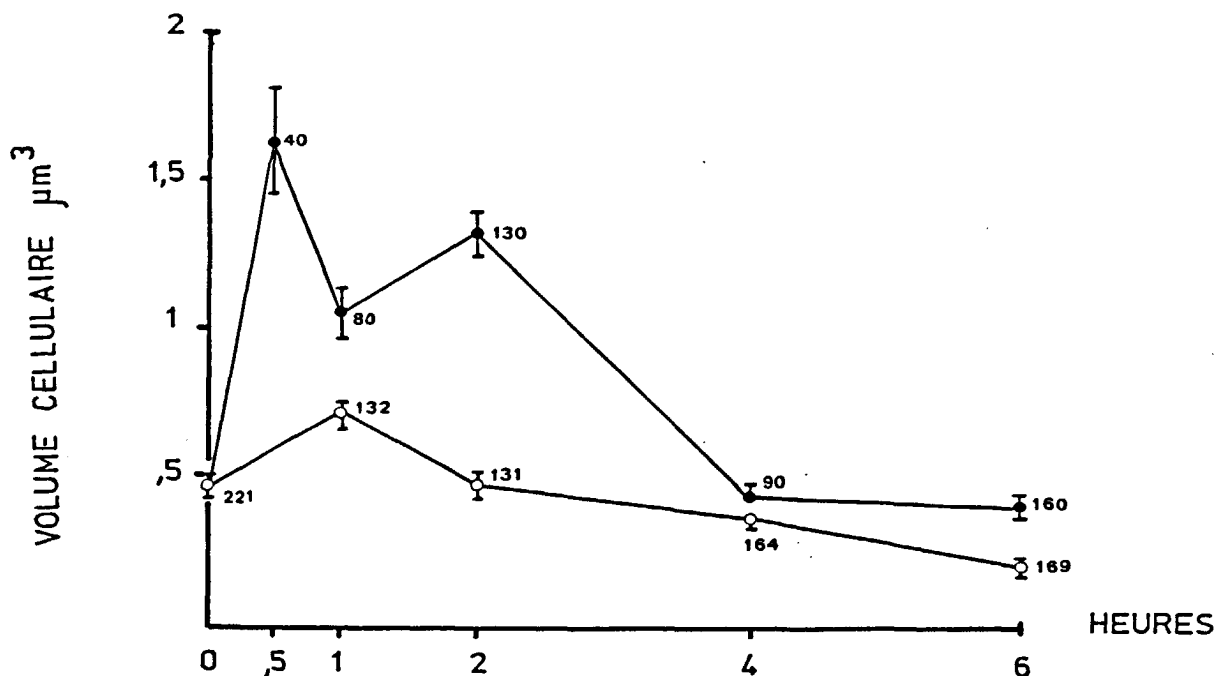


Figure 35 : Variations des volumes des cellules fixées à l'aluminium ou qui restent en suspension durant l'expérience de colonisation, pour la concentration  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>.

( • cellules fixées ; ○ cellules en suspension)

Les chiffres notés à côté des points correspondent aux nombres d'individus qui sont mesurés, afin de déterminer cette valeur moyenne.

Le volume initial des bactéries en suspension est de  $0,47 \mu\text{m}^3$ . Il augmente ensuite très rapidement et passe par une valeur maximum de  $0,72 \mu\text{m}^3$  après la première heure d'incubation. Durant cette phase, la vitesse d'augmentation de taille des cellules est de  $0,25 \mu\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ . Ensuite, le volume des cellules diminue progressivement, pour atteindre  $0,21 \mu\text{m}^3$  après six heures d'incubation.

Les résultats présentés pour les cellules fixées ne sont qu'indicatifs et ne représentent qu'une sous-estimation des valeurs réelles. En effet, lorsque les bactéries sont récupérées après centrifugation, elles ont une forme de petit bâtonnet (Paragraphe 4.1.) et elles se fixent verticalement sur les supports, par un pôle de leur cellule. Cette position

A	B
C	D
E	

PLANCHE 4

VARIATION DU VOLUME CELLULAIRE DES BACTERIES FIXEES  
A DES SURFACES D'ALUMINIUM, AU COURS DU TEMPS

(Photos prises au microscope à épifluorescence)

Caractéristiques :

- Souche 1J21
- Cellules rincées dans de l'eau de mer artificielle
- Milieu de suspension : eau de mer artificielle contenant  
10 mg.l<sup>-1</sup> de casaminoacides (Difco)

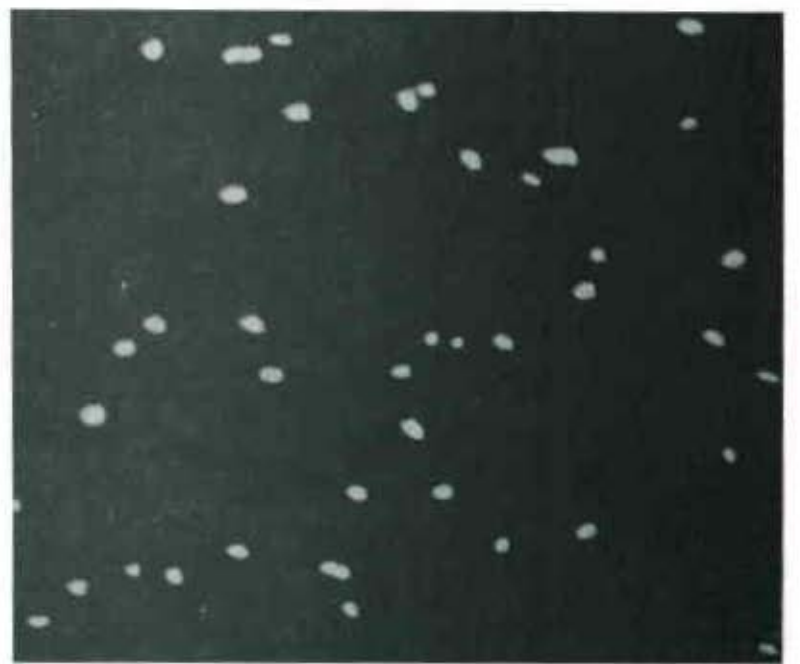
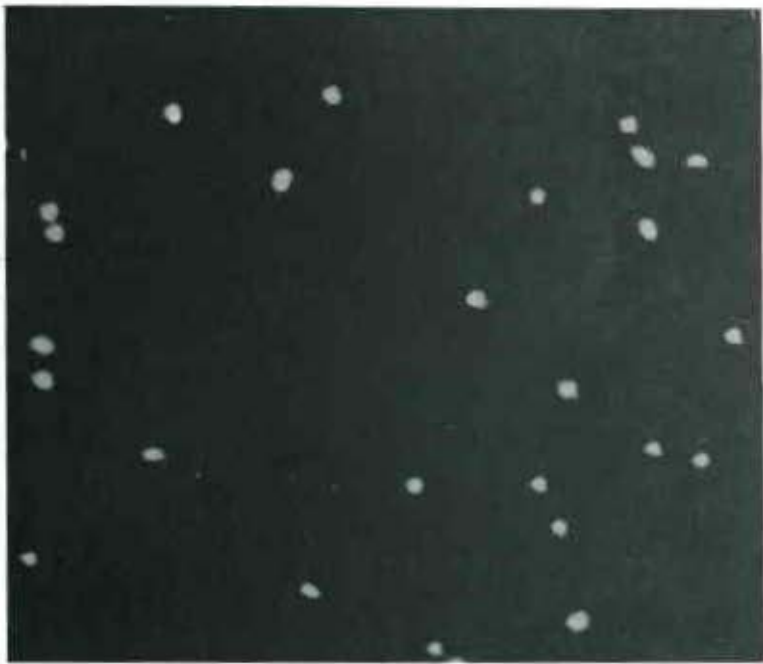
A : Durée d'immersion du support : 30 minutes

B : Durée d'immersion du support : 1 heure

C : Durée d'immersion du support : 2 heures

D : Durée d'immersion du support : 4 heures

E : Durée d'immersion du support : 6 heures



empêche de mesurer convenablement les variations de leur volume. Seules les cellules se présentant plus ou moins de profil, sur les microphotographies, sont prises en compte pour effectuer les mesures de volume.

Après 30 minutes d'immersion, les cellules fixées ont un volume de  $1,64 \mu\text{m}^3$ . Dans les heures qui suivent, leur volume diminue progressivement. Après quatre et six heures d'immersion, les cellules ont respectivement un volume de  $0,44$  et  $0,42 \mu\text{m}^3$  et se trouvent sous forme sphérique. Ces variations de morphologie sont illustrées sur la planche photo n° 4.

#### 4.4. BACTERIES AYANT JEÛNE PENDANT 60 HEURES

##### 4.4.1. Evolution des bactéries en suspension

Les variations des nombres de cellules en suspension et des pourcentages de cellules en division sont respectivement représentées sur la figure 36 et le tableau 12.

Nombre de cellules en suspension/ml	Temps					
	0	30 mn	1 h	2 h	4 h	6 h
$10^3$	0	0	12,5	9,0	12,5	15,0
$10^4$	0	0	4,2	18,8	13,8	14,5
$10^5$	0	1,5	12,0	12,0	7,0	7,6
$10^6$	0	1,0	3,5	6,3	4,0	5,6

Tableau 12 : Pourcentages de bactéries en division dans les suspensions cellulaires.

Pour les concentrations théoriques  $10^4$  et  $10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup>, les densités des cellules sont respectivement multipliées par 3 et 2,5 en deux heures, puis se stabilisent. C'est pendant ces deux heures que les propor-

tions de cellules en division partent de 0 et atteignent leurs maximums, respectivement 18,8 et 12 %, puis diminuent pour se stabiliser à 14,5 et 7,6 %.

Pour la concentration  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>, bien que le schéma d'évolution du pourcentage de cellules en division soit le même, mais à des valeurs plus faibles (maximum 6,3 % à 2 heures), l'augmentation de la densité se prolonge jusqu'à la 4e heure et la population est ainsi multipliée par 4.

Pour la concentration  $10^3$  cellules.ml<sup>-1</sup>, étant donné le faible nombre de cellules dénombrées par champ microscopique, l'erreur faite sur chaque mesure est trop grande et empêche de conclure sur une évolution quelconque.

#### 4.4.2. Evolution des densités et des vitesses de colonisation des bactéries fixées

La colonisation des surfaces d'aluminium par les bactéries des différentes suspensions, ainsi que les vitesses de colonisation, sont représentées sur la figure 37.

Etant donné le trop faible nombre de cellules fixées, dénombrées par champ microscopique, pour les suspensions  $10^3$  cellules.ml<sup>-1</sup>, et l'erreur de mesure qui en découle, les courbes de colonisation correspondantes n'ont pas été représentées.

Pour la suspension  $10^4$  cellules.ml<sup>-1</sup>, la population de bactéries fixées ne commence à augmenter qu'après deux heures d'incubation, pour atteindre une densité finale de  $2,4 \cdot 10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>. Cette valeur est 108 fois plus grande que la densité de cellules fixées après 30 minutes. La vitesse de colonisation est maximum,  $6,6 \cdot 10^3$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> en fin d'expérience.

Pour les suspensions  $10^5$  et  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>, le nombre de bactéries fixées augmente rapidement dès le début de l'expérience et tend à s'accélérer avec le temps.

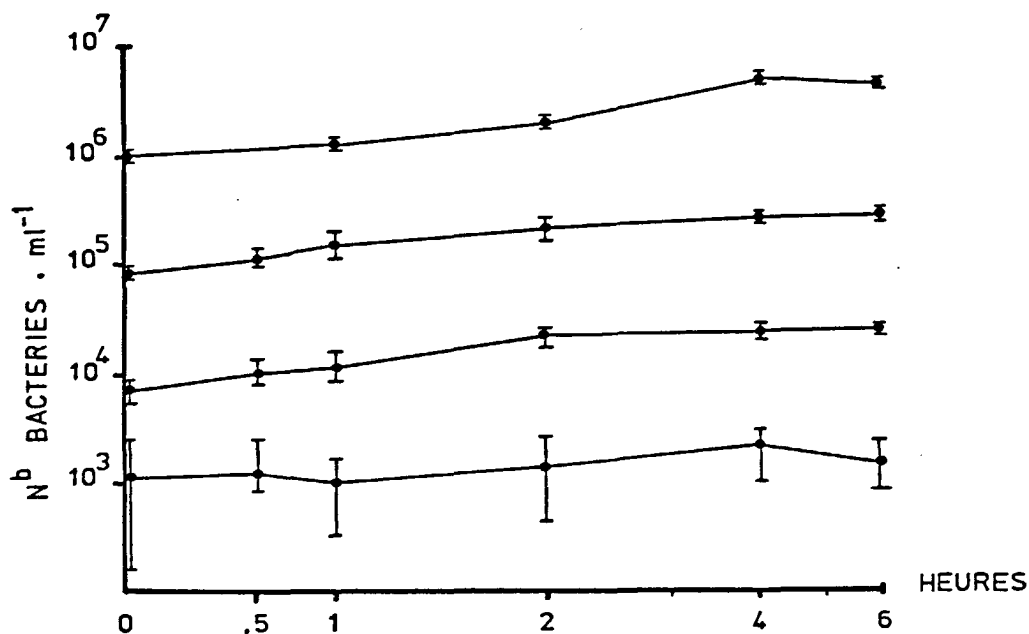


Figure 36 : Evolution des densités bactériennes en suspension durant l'expérimentation, pour les cellules qui ont jeûné 60 heures (représentation Log-Log).

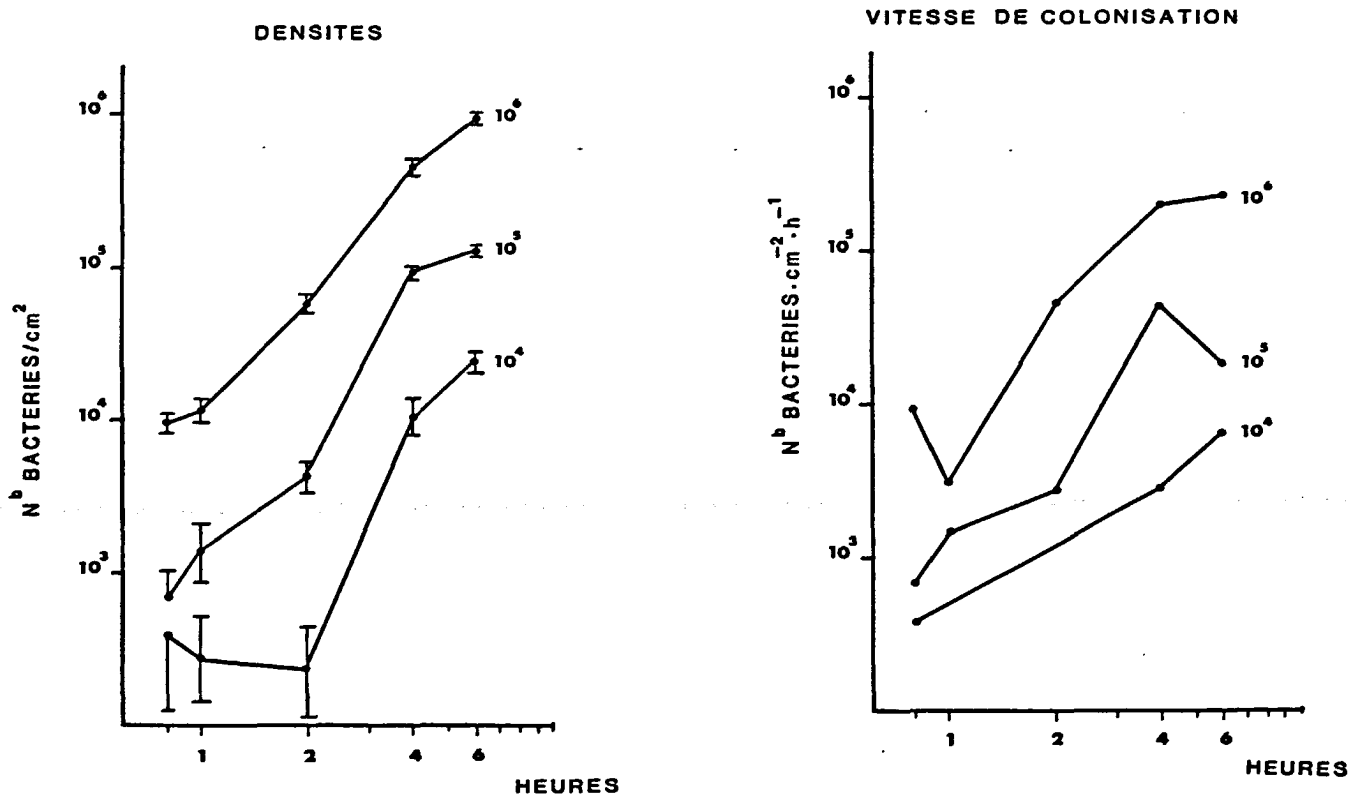


Figure 37 : Evolution des densités de bactéries fixées et des vitesses de colonisation, pour les cellules qui ont jeûné 60 heures (représentation Log-Log).

Pour la suspension  $10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup>, la vitesse de colonisation est maximum après quatre heures ( $4,5 \cdot 10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup>) puis ralentie. La population fixée est multipliée par 196 entre 30 minutes et 6 heures d'immersion (densité finale  $1,3 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>). Pour la suspension  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>, la vitesse de colonisation, après une brusque chute après une heure d'immersion, augmente constamment pour atteindre  $2,3 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>.h<sup>-1</sup> en fin d'expériences. La densité de cellules fixées après 6 heures d'immersion est de  $9,3 \cdot 10^5$  cellules.cm<sup>-2</sup>, ce qui représente 97 fois la densité de cellules fixées après 30 minutes.

A l'intérieur de ces populations bactériennes fixées, les évolutions des pourcentages des cellules en division au cours du temps, ont été notées et représentées dans le tableau 13.

Nombre de cellules en suspension/ml	Temps				
	30 mn	1 h	2 h	4 h	6 h
$10^4$	0	0	0	7,6	6,9
$10^5$	0	0	9,6	5,9	4,9
$10^6$	1,3	1,9	2,2	4,6	6,5

Tableau 13 : Pourcentages de bactéries en division dans les populations bactériennes fixées.

Pour la suspension  $10^4$  cellules.ml<sup>-1</sup>, le pourcentage de cellules en division est nul durant les deux premières heures d'immersion et atteint une valeur maximum (7,6 %) après quatre heures d'immersion.

Pour la suspension  $10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup>, ce pourcentage est nul durant la première heure et est maximum après deux heures d'immersion (9,6 %).

Pour la suspension  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>, ce pourcentage augmente progressivement avec le temps d'immersion. Il est de 6,5 % en fin d'expérience.

#### 4.4.3. Evolution des volumes cellulaires

Durant l'expérience de colonisation, les cellules fixées aux surfaces d'aluminium montrent des variations de volumes plus importantes que celles des cellules qui restent en suspension (Figure 38).

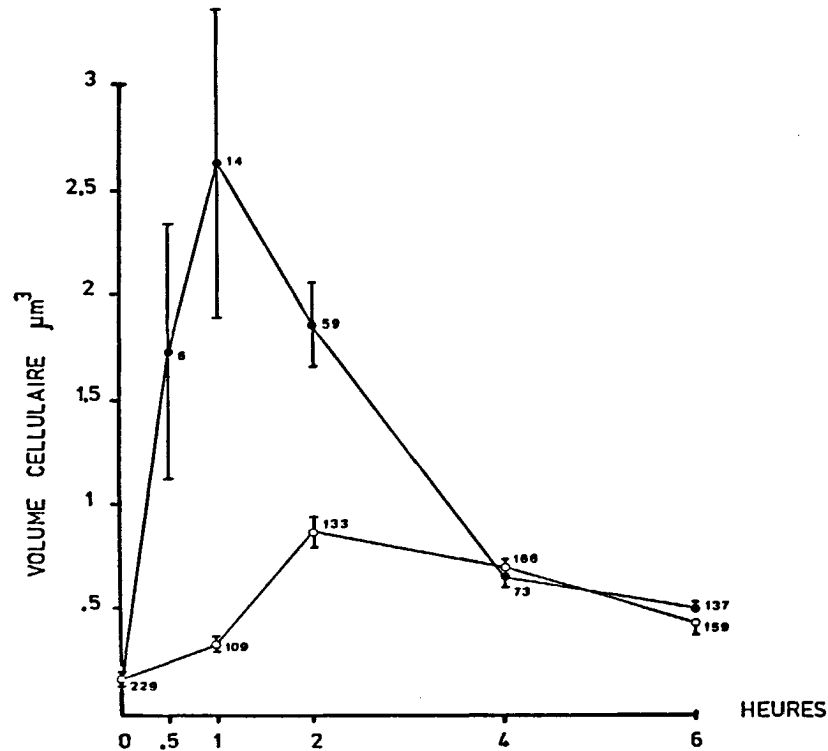


Figure 38 : Variations des volumes des cellules fixées à l'aluminium ou qui restent en suspension durant l'expérience de colonisation, pour la concentration  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>.

(● cellules fixées ; ○ cellules en suspension)

Les chiffres notés à côté des points correspondent aux nombres d'individus qui sont mesurés, afin de déterminer cette valeur moyenne.

Après un jeûne de 60 heures, les cellules en suspension ont une forme sphérique et un volume de  $0,17 \mu\text{m}^3$ . Elles réagissent très rapidement à l'apport nutritif et augmentent leur volume durant les deux premières heures d'incubation, pour atteindre un maximum de  $0,88 \mu\text{m}^3$ . Durant cette phase, les cellules augmentent leur taille à une vitesse de  $0,35 \mu\text{m}^3 \cdot \text{h}^{-1}$ . Ensuite, leur taille diminue régulièrement pour atteindre  $0,42 \mu\text{m}^3$  en fin d'expérience.



Après 30 minutes, les cellules qui sont fixées ont un volume de  $1,77 \mu\text{m}^3$  et atteignent un maximum de  $2,6 \mu\text{m}^3$  après une heure d'immersion. Ce faisant, elles retrouvent une forme de bâtonnet, mais dans ce cas, les cellules s'allongent dans le plan du support et semblent se fixer à la surface de l'aluminium sur toute leur longueur. Leur volume diminue ensuite très rapidement dans les heures qui suivent et elles redeviennent sphériques après six heures d'immersion, avec un volume de  $0,51 \mu\text{m}^3$ .

## 5 - CONCLUSION

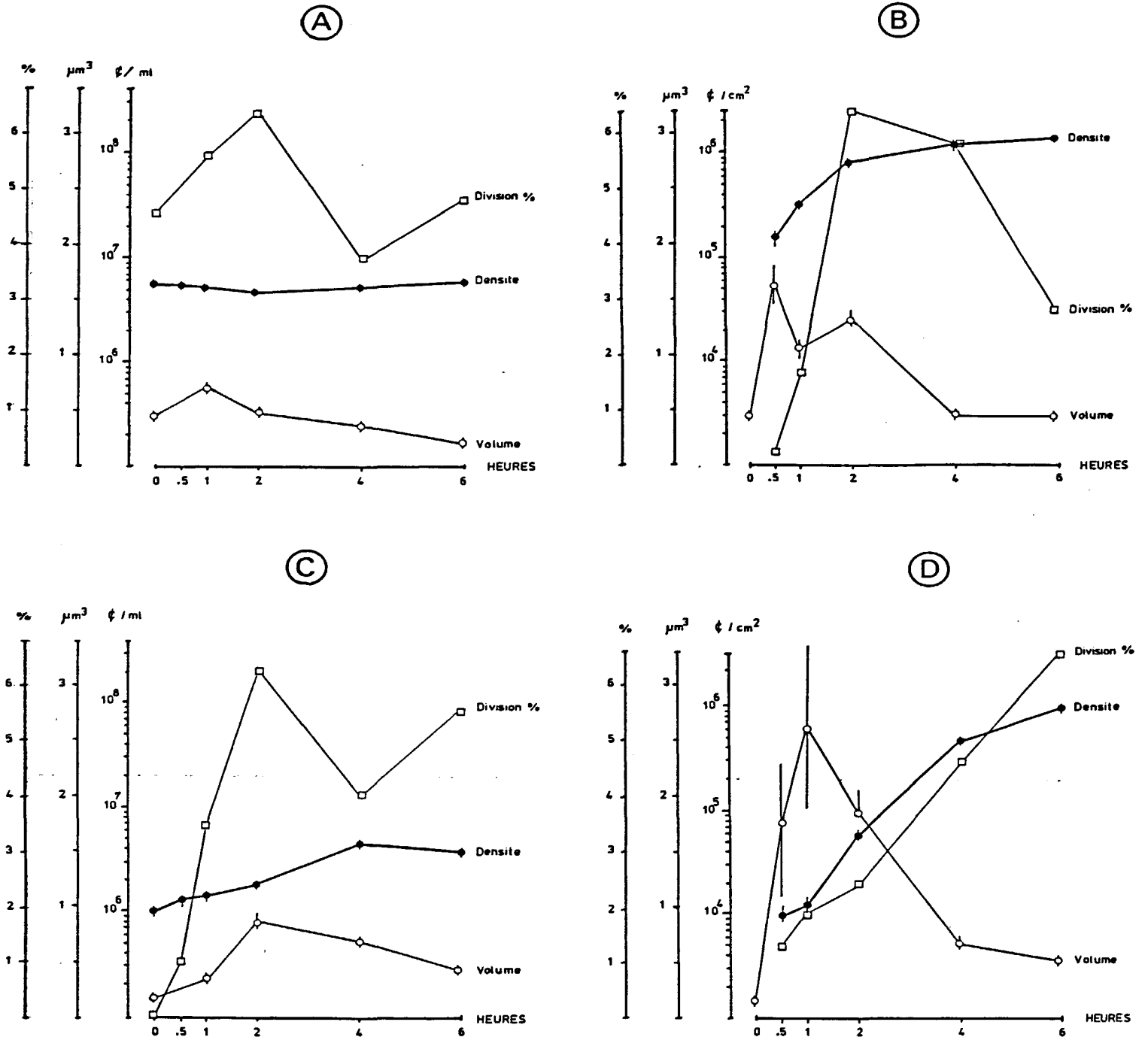
Les conclusions à tirer de cette étude expérimentale sont les suivantes :

La souche de *Pseudomonadaceae* isolée du milieu marin et utilisée pour cette expérience, a été capable de s'adapter pour survivre, pendant 60 heures, dans un milieu extrêmement pauvre en matériel nutritif. Au niveau cellulaire, cette adaptation s'est accompagnée de certains changements morphologiques. Les bactéries ont ainsi perdu 78 % de leur volume initial, elles sont passées d'une forme de bâtonnet à une forme sphérique et ont cessé de se diviser. Malgré les différences de dénombrement qui sont apparues entre la méthode microscopique et celle de culture, il semble que la majorité des cellules soient restées viables après ce jeûne.

Les différents paramètres mesurés durant l'expérience de colonisation ont évolué différemment suivant que les cellules aient été privées ou non de matériel nutritif et suivant qu'elles soient restées en suspension dans le milieu ou qu'elles se soient fixées.

Les figures 39 A, B, C et D, qui représentent les évolutions des densités, des pourcentages de cellules en division et des volumes cellulaires correspondant aux suspensions bactériennes de concentrations  $10^6$  cellules. $\text{ml}^{-1}$ , permettent de synthétiser l'ensemble des phénomènes observés durant cette étude.

La densité des bactéries qui n'ont pas jeûné et qui restent en suspension est sensiblement constante (Figure 39, A). Dès le début de



- A : Cellules qui n'ont pas jeûné, en suspension
- B : Cellules qui n'ont pas jeûné, fixées
- C : Cellules ayant jeûné, en suspension
- D : Cellules ayant jeûné, fixées

**Figure 39** : Evolution des densités des volumes cellulaires et des pourcentages de cellules en division dans les différentes situations, au cours de la période expérimentale.

l'expérience, les volumes cellulaires augmentent parallèlement à l'augmentation du nombre de cellules en division. Par contre, après la première heure, le volume des cellules commence déjà à diminuer, alors que les taux de division continuent d'augmenter pendant une heure avant de baisser eux aussi.

Dès le début de l'expérience, la densité des cellules fixées est très importante et très peu d'entre elles se divisent (Figure 39, B). Une fois fixées, leur volume augmente de façon importante en 30 minutes. Durant les deux premières heures, les taux de division et les densités augmentent, tandis que leur volume commence à diminuer. Ensuite, en même temps que la colonisation des surfaces ralentit, le taux des divisions baisse.

Pour les suspensions cellulaires qui ont subi un jeûne, les densités augmentent parallèlement à l'augmentation des taux de division et des volumes cellulaires, dès le début de l'expérience (Figure 39, C). Après la deuxième heure, le phénomène s'inverse, sauf pour les densités qui continuent à augmenter pendant deux heures avant de se stabiliser.

Dans ce cas, les densités de cellules fixées au début de l'expérience sont faibles, mais augmentent rapidement et constamment durant la période expérimentale, ainsi que les taux de division (Figure 39, D). Durant la première heure, les volumes cellulaires augmentent énormément, puis diminuent rapidement.

Dans tous les cas, les évolutions de ces trois paramètres semblent très liées et la fixation des cellules aux surfaces d'aluminium leur permet d'atteindre très rapidement des volumes deux à trois fois supérieurs à ceux qu'elles peuvent atteindre lorsqu'elles sont en suspension.

## 6 - DISCUSSION

Le *Pseudomonas* isolé de la surface d'un filtre de polycarbonate et utilisé pour cette expérience de colonisation a été capable de s'adapter, pour survivre, à une période de jeûne de 60 heures. Durant cette période, les cellules ont diminué leur volume de façon très importante (78 %). Elles sont passées d'un volume de  $0,83 \mu\text{m}^3$ , en fin de phase de croissance, à  $0,17 \mu\text{m}^3$  après 60 heures de jeûne. En 27 heures, dans le même milieu, HUMPHREY et al. (1983) observent qu'un *Pseudomonas* peut perdre 73 % du volume qu'il présente en milieu de phase croissante et un *Vibrio*, 45,5 %. Le *Vibrio*, utilisé par DAWSON et al. (1981) peut respectivement perdre 66 et 71 % de son volume après 60 et 120 heures de jeûne. Suivant la souche, il apparaît donc que les variations de volume ne sont pas les mêmes. Il faut cependant remarquer que les rinçages par centrifugation font déjà perdre 43,4 % du volume initial des cellules. Dans ce cas, la diminution de volume est sans doute due à la différence de pression osmotique qui existe entre le milieu de culture et le milieu de rinçage.

Les processus qui interviennent lorsqu'une souche bactérienne est placée en suspension dans un milieu extrêmement pauvre sont complexes et se divisent en deux étapes (NOVITSKY et MORITA, 1977 ; KJELLEBERG et al., 1982). Les quatre à cinq premières heures sont caractérisées par une phase de nanisme durant laquelle les cellules sont métaboliquement actives. Ce processus se développe par une fragmentation des cellules sans recroissance durant deux heures, suivie d'une réduction continue de la taille des cellules ainsi formées. Ainsi, le nombre de cellules de la population augmente sans que la biomasse ne varie. Durant la phase de jeûne qui suit cette phase de nanisme, les cellules continuent de diminuer de taille sans fragmentation. Elles présentent une faible activité métabolique et, après quelques jours, une petite partie d'entre elles perd la faculté de se re-développer sur un milieu riche (perte de viabilité).

Malgré les différences de comptage qui sont apparues entre la méthode microscopique et l'étalement sur milieu de culture, il semble que la majorité des cellules soient restées viables après ce jeûne de 60 heures. Durant une expérience de jeûne prolongée, AMY et al. (1983) notent une différence similaire entre les nombres de bactéries totales et viables, durant les quatre premières semaines expérimentales et suggèrent qu'elle pourrait

provenir de la perte de certaines cellules, causée par l'augmentation du nombre des manipulations nécessaires pour déterminer le nombre total de cellules.

Les bactéries qui restent en suspension dans le milieu durant les six heures de l'expérience montrent des évolutions différentes suivant qu'elles ont jeûné ou pas. Pour les concentrations cellulaires  $10^6$  cellules.ml<sup>-1</sup>, la quantité de matériel nutritif contenu dans le milieu expérimental semble suffisante pour permettre une recroissance des cellules qui ont jeûné, contrairement aux cellules simplement rincées. Ainsi, durant les deux premières heures, ces cellules augmentent leur volume tout en se divisant. La proportion de cellules en division est de 4 à 6 % et le temps de génération de trois heures. Ensuite, le volume cellulaire diminue. Après un jeûne de cinq semaines, NOVITSKY et MORITA (1976) observent que l'addition de 2,5 g.l<sup>-1</sup> de glucose entraîne une augmentation du volume cellulaire et la recroissance d'un *Vibrio.*, sans période de latence préalable. Cependant, AMY et al. (1983) notent un ralentissement de la réponse des cellules en fonction de l'augmentation de la période de jeûne (entre une et deux semaines). Les cellules qui n'ont été que rincées réagissent de la même façon mais dans des proportions plus faibles.

Quel que soit le traitement qu'ait subi la souche avant de coloniser les surfaces d'aluminium, il apparaît que les densités initiales de cellules fixées augmentent, en fonction de la densité des suspensions cellulaires, pour les deux types de suspension. Par contre, les densités de bactéries initialement fixées sont moins importantes lorsque les cellules ont jeûné.

En travaillant à des concentrations cellulaires plus élevées ( $1.10^8$  à  $5.10^9$  cellules.ml<sup>-1</sup>), FLETCHER (1977) observe une augmentation similaire, en immergeant des surfaces de polystyrène pendant deux heures dans des suspensions de concentrations croissantes, d'un *Pseudomonas* sp. Elle observe ainsi que ces résultats sont similaires aux modèles décrivant l'adsorption moléculaire de solutions sur des surfaces et suggère que, du fait que l'adhésion bactérienne peut être décrite par un modèle mathématique concernant des processus physico-chimiques, les premiers évènements de

la fixation bactérienne pourraient être contrôlés, d'une façon non négligeable, par des phénomènes non biologiques. Cependant, si la taille des cellules bactériennes leur permet d'être influencées, comme des particules colloïdales, par les propriétés électrochimiques de l'interface (DANIELS, 1980), elles n'en sont pas moins des organismes vivants dont les propriétés de surface dépendent de leur état physiologique et des propriétés du milieu environnant (DANIELS, 1972 ; MARSHALL et CRUICKSHANK, 1973). Ces variations peuvent en effet influencer l'adhésion bactérienne (FLETCHER et Mc ELDOWNEY, 1984). Ainsi FLETCHER (1977) observe que l'adhésion des bactéries aux surfaces est différente suivant l'âge de la cellule.

En plus de ces propriétés de surfaces cellulaires, certaines bactéries sont mobiles et présentent des mouvements propres (Bergey's Manual, 1974), ce qui permet à certaines cellules de s'approcher d'une surface et d'orienter leur adhésion (POINDEXTER, 1981 a). Cette propriété de mobilité peut, dans certains cas, avoir une grande influence sur l'adhésion bactérienne. Ainsi, STANLEY (1983) note que la perte de cette faculté diminue de 90 % le taux de fixation d'un *Pseudomonas aeruginosa*, dans les minutes qui suivent l'immersion d'une surface. D'après KJELLEBERG et al. (1982), durant une période de jeûne, le *Vibrio*. sp. espèce DW1 perd sa mobilité en 73 heures.

Durant cette expérience, les variations de morphologie, des propriétés de surface et la perte de mobilité des cellules intervenant lors du jeûne, pourraient être responsables de la différence des nombres de bactéries fixées initialement aux surfaces observées, suivant que les cellules aient jeûné ou non. Cependant, KJELLEBERG et al. (1983) observent que les cellules en état de jeûne adhèrent plus fortement aux supports, du fait de l'augmentation de l'hydrophobicité de la surface des cellules, qui se développe lors du processus de jeûne. De même DAWSON et al. (1981) notent des changements de la surface externe des cellules, notamment l'apparence des polymères de liaison, qui seraient probablement responsables de l'augmentation du degré d'adhésion des cellules naines.

Lorsque les cellules ne sont que rincées, elles présentent encore une forme de bâtonnet et se fixent verticalement sur les supports, par un pôle apical de la cellule. D'après MARSHALL et CRUICKSHANK (1973), cette

orientation serait due à la présence, en cet endroit de la cellule, d'une zone relativement hydrophobe qui serait rejetée de la phase aqueuse. Au contraire, les cellules qui ont jeûné se trouvent sous forme de coques et, lorsqu'elles se fixent, il n'est plus possible de mettre en évidence une orientation quelconque. Cependant, une fois fixées, elles augmentent de volume et reprennent leur forme de bâtonnet. Mais dans ce cas, elles ont tendance à se fixer à la surface du support, sur toute la longueur de la cellule. L'orientation perpendiculaire au support ne serait donc pas obligatoire pour ces bactéries et dépendrait de la forme initiale de la cellule et donc de son état de jeûne.

Malgré les différences de densités de bactéries fixées qui apparaissent entre ces deux types cellulaires, la cinétique d'adhésion des cellules en état de jeûne est cependant plus importante que pour les cellules rincées. Ainsi, DAWSON et al. (1981) notent que plus la période de jeûne est longue (entre 10 minutes et 5 heures), plus la vitesse d'adhésion augmente. Mais contrairement à nos résultats, les densités de cellules fixées augmentent aussi proportionnellement. Il faut cependant préciser que ces auteurs ont utilisé des cellules bactériennes en cours de jeûne (durant la phase de nanisme) et le milieu de jeûne représentait aussi le milieu expérimental de colonisation. Au contraire, dans notre expérience, les cellules ont été utilisées après une période de jeûne de 60 heures et ont ensuite été placées dans un milieu de colonisation faiblement nutritif (2,7 mg de carbone.l<sup>-1</sup>). Il semblerait donc que l'adhésion peut être influencée, d'une part par la durée du jeûne et les transformations physiques et métaboliques qui en découlent, et d'autre part par la "position" de la cellule vis-à-vis de l'état de jeûne, phase d'adaptation au jeûne ou au contraire phase de reprise d'activité.

Etant donné les densités de cellules fixées atteintes, en fin d'expérience, par la suspension des cellules qui n'ont été que rincées (1,2.10<sup>6</sup> cellules.cm<sup>-2</sup>), le ralentissement de l'adhésion observé pourrait être dû à une saturation de la surface (FLETCHER, 1977 ; PAUL et LOEB, 1983). Cependant, ces auteurs, en travaillant sur des espèces bactériennes différentes, indiquent que les densités de saturation seraient beaucoup plus fortes (3,8 à 4.10<sup>7</sup> cellules.cm<sup>-2</sup>). Ces résultats sont difficilement com-

parables, du fait du rôle important que joue le volume des cellules et donc de la surface occupée par chaque cellule, sur le phénomène de saturation.

L'augmentation du nombre des cellules fixées dépend, d'une part de la fixation continue de nouvelles cellules, et d'autre part de la multiplication des cellules déjà fixées. Dans les deux situations observées, l'évolution du nombre des cellules en division semble proportionnelle à celle des courbes de densités. Lorsque les cellules ont jeûné, le nombre des cellules en division augmente constamment, en même temps que les densités cellulaires fixées. A l'inverse, pour les cellules rincées, lorsque le pourcentage des cellules en division diminue, la fixation bactérienne ralentie. Quel que soit le traitement qu'ait subi la souche, les premières cellules qui adhèrent aux surfaces ne montrent que très peu de formes de divisions. D'après KJELLEBERG et al. (1982), des cellules ayant jeûné pendant 30 jours doivent augmenter 12 fois leur taille avant d'entrer en phase de croissance. D'après nos résultats, l'adhésion à une surface a permis au *Pseudomonas* testé d'augmenter son volume plus rapidement et de façon plus importante (15 fois en 1 heure pour les cellules qui ont jeûné et 3,5 fois en 30 mn pour les cellules rincées), que dans la phase liquide (5 fois en 2 heures pour les cellules qui ont jeûné et 1,5 fois en 1 heure pour les cellules rincées). Une fois le maximum de taille atteint, le volume des cellules diminue progressivement, en même temps qu'elles se divisent. Des résultats similaires sont notés par KJELLEBERG et al. (1982) qui observent qu'un *Vibrio* fixé, ayant jeûné, peut réagir à une très faible addition de matériel nutritif dans le milieu et présente un maximum de taille deux heures après. Ces auteurs signalent de plus que, lorsque les cellules sont fixées, elles peuvent répondre plus vite et à des concentrations en matériel nutritif très faibles, qui ne permettent pas une recroissance de ces mêmes cellules libres. L'accumulation de matériel nutritif à l'interface (BAIER, 1980) et/ou l'interface elle-même, permettraient donc une croissance plus efficace des bactéries dans un milieu pauvre (MARSHALL, 1980) et augmenteraient leur activité métabolique (FLETCHER, 1979 ; ELLWOOD et al., 1982).

Durant cette étude, il a été observé que la fixation d'une cellule en état de jeûne, à une surface, dans un milieu faiblement nutritif



(2,7 mg de carbone.l<sup>-1</sup>), lui a permis d'une part d'augmenter son volume très rapidement et de façon importante, d'autre part de se diviser de façon active. De plus, la cinétique de croissance du biofilm, qui semble très liée au taux de division des cellules fixées, est plus importante lorsque les cellules ont jeûné. Bien que ces résultats soient obtenus dans des conditions expérimentales très différentes de celles du milieu naturel et sur une seule souche bactérienne, ces phénomènes suggèrent que les variations de colonisations bactériennes observées dans le milieu naturel, pourraient être liées à ce type de réaction. L'augmentation rapide du volume des cellules, en période estivale, serait suivie d'une phase de division active qui déclencherait le départ de la phase de croissance rapide du biofilm. A l'inverse, l'évolution lente et de faible amplitude des volumes cellulaires, observée en hiver, ne serait pas suffisante pour permettre une division intense des bactéries et une croissance rapide du biofilm. Il est de plus apparu que les volumes des bactéries fixées aux surfaces d'aluminium ont augmenté de façon plus rapide et plus importante que ceux des bactéries libres.

CONCLUSION GENERALE

## CONCLUSION GÉNÉRALE

Les résultats exposés dans les chapitres précédents ont permis de préciser certains évènements, qui apparaissent lors de la colonisation bactérienne de la surface de différents matériaux immergés en eau de mer circulante (acier inoxydable UB6, aluminium AG4, filtre de polycarbonate).

Par l'étude microscopique quantitative de la colonisation des matériaux, il est apparu que la croissance du biofilm microbien se réalise en trois phases. Une colonisation initiale, parfois instable (environ  $10^4$  cellules.cm<sup>-2</sup>), une colonisation intense (de  $10^4$  à environ  $10^7$  cellules.cm<sup>-2</sup> en une semaine), suivie d'un ralentissement au-delà de dix jours. Bien que la microflore totale de l'eau de mer (dénombrée par épifluorescence) soit demeurée stable durant l'année expérimentale, l'amplitude et la durée des différentes phases de la colonisation bactérienne varient au cours des saisons. Parmi les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer mesurés, il semblerait que la température soit l'un des paramètres qui a le plus influencé ce phénomène.

La nature chimique des matériaux ne semble pas avoir influencé la colonisation bactérienne. Quantitativement, les trois matériaux ont été colonisés de façon similaire, tout au long de l'année. De même, l'étude qualitative des bactéries hétérotrophes fixées après huit jours d'immersion, indique qu'ils sont colonisés par des flores bactériennes voisines. Cette similitude pourrait être due au caractère d'hydrophobicité voisin que présentent les trois matériaux (environ 36 dynes.cm<sup>-1</sup>). Ce caractère physique des supports, en influençant la formation du film chimique, qui représente la première étape de la colonisation, a pu influencer les différentes séquences biologiques qui se succèdent à la surface des trois supports. Cependant, outre ce caractère propre aux matériaux, l'étude de la microdistribution des bactéries à la surface des échantillons indique que les forces de friction du courant d'eau peuvent aussi jouer un rôle

important au niveau des densités de bactéries fixées. Quel que soit le matériel, la répartition des cellules à la surface des échantillons est sensiblement identique et semble fortement influencée par ces forces de courant. Au cours du temps d'immersion, cette répartition peut aussi être influencée par la nature chimique du matériel. L'étude microscopique des échantillons d'aluminium montre, en effet, que des concentrations cellulaires importantes peuvent se développer, au niveau des piqures de corrosion.

L'injection en continu de 0,1 ppm de chlore dans l'eau de mer alimentant le système expérimental ne semble pas suffisante pour empêcher, à long terme, la fixation d'un grand nombre de bactéries. Cette faible dose pourrait permettre la sélection de bactéries plus résistantes et ne serait pas suffisante pour dépolymériser les sécrétions synthétisées par les bactéries fixées.

L'étude qualitative de la microflore fixée aux supports, que ce soit par le suivi des types morphologiques identifiables en microscopie ou par l'analyse numérique des bactéries hétérotrophes cultivables, a permis de montrer que la composition du biofilm évolue au cours du temps d'immersion.

Les premiers colonisateurs des supports sont des bactéries qui se présentent sous la forme de bacilles et de coques de petites tailles. Ensuite, cette population bactérienne se diversifie par l'apparition de différents types morphologiques, mais les bacilles et les coques restent généralement dominants sur toute la période expérimentale. Bien que cette succession se réalise toute l'année, elle le fait à des rythmes différents suivant la saison. Elle est plus rapide en période estivale et plus lente en période hivernale.

Dans les premiers temps d'immersion, la majorité des bactéries fixées sont des *Pseudomonadaceae*, ensuite le groupe des *Vibrionaceae* devient dominant. Cette succession pourrait être due à la formation de zones anaérobies qui se développent lors de l'épaississement du biofilm, sélectionnant ainsi les souches bactériennes capables de se développer en anaérobiose.

L'étude des exigences nutritionnelles des bactéries pionnières hétérotrophes indique que ce sont des bactéries copiotrophes, qui ont besoin d'une quantité de matériel nutritif relativement élevée pour pouvoir se développer. La petite taille de ces cellules pionnières laisse cependant supposer qu'avant de se fixer, elles étaient en état de jeûne. Ensuite, suivant le temps d'immersion, le volume des bacilles et des coques fixés aux supports varie énormément, mais de façon différente suivant la saison considérée.

D'après les résultats de l'expérience de colonisation effectuée sur un *Pseudomonas* sp. ayant jeûné avant d'être remis en suspension dans un milieu faiblement nutritif, il apparaît que cette bactérie est capable de faire varier son volume cellulaire de façon très importante. De plus, lorsque ces cellules sont fixées à une surface, la vitesse et l'amplitude de ces variations sont plus importantes que lorsqu'elles restent en suspension dans le milieu. Au cours de cette étude, il est aussi apparu que la cinétique de croissance du biofilm semble très liée au taux de division des cellules fixées. L'augmentation du volume des cellules en état de jeûne, qui suit l'addition de matériel nutritif dans le milieu, pourrait représenter une étape obligatoire avant la multiplication intense des cellules.

Dans le milieu naturel, au printemps, l'évolution rapide des volumes des bacilles et des coques fixés pourrait correspondre à ce phénomène. A cette époque, les conditions physico-chimiques de l'interface solide-liquide seraient favorables à une augmentation rapide du volume des cellules, qui déclencherait une phase de multiplication active et serait responsable de la croissance intense du biofilm observée après la première journée d'immersion. Au contraire, en hiver, l'accroissement plus lent des volumes cellulaires ne serait pas suffisant pour permettre aux bactéries de se multiplier activement, ce qui ralentirait la croissance du biofilm.

Pour les bactéries du milieu naturel qui se trouvent généralement en état de jeûne, le film chimique primaire pourrait représenter une source importante de matériel nutritif et l'adhésion à une surface permettrait à ces cellules d'augmenter leur activité métabolique et représenterait une tactique de survie.

Au terme de ce travail, il apparaît que la méthode de mesure directe (microscopie) employée pour étudier la colonisation bactérienne de différents matériaux, représente une technique fiable et rapide. Par rapport aux méthodes de mesures indirectes, qui peuvent être physiques (mesure des variations des forces de friction ou du coefficient de transfert thermique) ou chimiques (dosage d'un marqueur bactérien spécifique), cette technique présente l'avantage de pouvoir travailler sur des densités de bactéries très faibles et donc de visualiser la réponse bactérienne à un test sur des temps d'immersion très courts. Au contraire, les méthodes indirectes utilisent généralement des appareils de mesure sophistiqués, dont la sensibilité ne permet pas de travailler sur de très faibles quantités de matériel bactérien. Cependant, notre méthode montre ses limites dès que les temps d'immersion sont trop longs et les densités bactériennes trop importantes. L'utilisation simultanée de cette méthode microscopique associée à des techniques bactériologiques, et d'une méthode chimique (dosage de certains lipides bactériens) qui a commencé à se mettre en place au sein de notre équipe, devrait, à l'avenir, permettre une étude plus efficace du développement du biofilm microbien.

Le système d'échantillonnage peu volumineux et d'emploi simple, mis au point pour les besoins de cette étude, semble fiable et permet d'étudier simultanément la colonisation microbienne sur différents matériaux. Du fait de sa conception, il peut de plus être adapté sur de nombreux types de circuits d'eau.

Dans le cadre du projet ETM, le système d'échantillonnage et la technique d'étude utilisée sont donc facilement transportables et pourront permettre l'étude et le contrôle du biofilm microbien sur les différents sites de construction de ces centrales.

B I B L I O G R A P H I E

## BIBLIOGRAPHIE

- ABSOLUM D.R., LAMBERTI F.N., POLICOVA Z., ZINGG W, VAN OSS C.J.  
& NEWMANN A.W., 1983 - Surface thermodynamics of bacterial  
adhesion - *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 90-97.
- AFTRING R.P. & TAYLOR B.F., 1979 - Assessment of microbial fouling in  
an ocean thermal energy conversion experiment - *Appl. Environ.  
Microbiol.*, 38 : 734-739.
- AKAGI Y., TAGA N. & SIMIDU U., 1977 - Isolation and distribution of oli-  
gotrophic marine bacteria - *Can. J. Microbiol.*, 23 : 981-987.
- AMY P.S., PAULING C. & MORITA R.Y., 1983 - Starvation survival processes  
of a marine *Vibrio*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 1041-1098.
- AMY P.S. & MORITA R.Y., 1983 - Starvation survival patterns of sixteen  
freshly isolated open ocean bacteria - *Appl. Environ. Microbiol.*  
45 : 1109-1115.
- ANDERSON T.F., 1951 - Techniques for the preservation of three dimensional  
structures in preparing specimens for the electron microscope -  
*Trans. New-York Acad. Sci.*, 13 : 130 p.
- BAIER, R.E., 1970 - Surface properties influencing biological adhesion.  
In : *Adhesion in biological systems* (Eds Richards S., Marly) -  
*New York, Academic Press* : 15-48.
- BAIER R.E., 1972 - Influence of the initial surface condition of materials  
on bioadhesion - In : *Proceedings of the Third International  
Congress on Marine Corrosion and Fouling* - National bureau of  
*standards, Gaithersburg, M.D.* : 633-639.



- BAIER R.E., 1980 - Substrata influences on adhesion of microorganisms and their resultant new surface properties - In : *Adsorption of microorganisms to surfaces* (Eds : Bitton G. & Marshall, K.C.) A Wiley Interscience Publication - New York : 59-104.
- BERGER L.R., BERGER J.A. & BASSE J.L., 1985 - Control of microbial biofouling in OTEC heat exchangers - Presented at the A.S.M. Hawaii Branch Meeting.
- BERGEY'S Manual of determinative bacteriology, 1974 - Coeditors Buchanan R.E. & Gibbons N.E. - Eighth Edition - The Williams & Wilkins Company, Baltimore.
- BERK S.G., MITCHELL R., BOBBIE R.J., NICKELS J.S. & WHITE D.C., 1981 - Microfouling on metal surfaces exposed to seawater - *International Biodeterioration*, 17 : 29-37.
- BOTT T.L. & BROCK T.D., 1970 - Growth and metabolism of periphytic bacteria : methodology - *Limnol. and Oceanogr.*, 15 : 333-342.
- BOTT T.R. & MILLER P.C., 1983 - Mechanisms of biofilm formation on aluminium tubes - *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 33 B : 177-184.
- BOWDEN W.B., 1977 - Comparison of two direct-count techniques for enumerating aquatic bacteria - *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 : 1229-1232.
- BRYANT R.D., COSTERTON J.W. & LAISHLEY E.J., 1983 - The role of *Thiobacillus albertis* glycocalyx in the adhesion of cells to elemental sulfur. *Can. J. Microbiol.*, 30 : 81-90.
- BRYERS J.D. & CHARACKLIS W.G., 1981 - Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system : Overall kinetics - *Water Research*, 15 : 483-491.
- CAMMEN L.M. & WALKER J.A., 1982 - Distribution and activity of attached and free-living suspended bacteria in the bay of Fundy - *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 39 : 1655-1663.

- CAPBLANCQ J. & CASSAN M., 1979 - Etude du périphyton d'une rivière polluée (l'Agout) - I - Structure et développement des communautés sur substrats artificiels - *Annls. Limnol.*, 15 : 193-210.
- CARON D.A. & SIEBURTH J.M., 1981 - Disruption of the primary fouling sequence on fiber glass reinforced plastic submerged in the marine environment - *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 268-273.
- CARSON J. & ALLSOPP D., 1983 - Composition of fouling bacterial film on submerged materials - *Biodeterioration*, 5 : 291-303.
- CHANTEREAU J., 1980 - Corrosion bactérienne - Bactéries de la corrosion. *Eds Technique et Documentation* : 280 p.
- CHARACKLIS W.G., 1973 - Review Paper - Attached microbial growths - I - Attachment and growth - *Water Research - Pergamon Press*, 7 : 1113-1127.
- CHARACKLIS W.G. & DYDEK S.T., 1976 - The influence of carbon-nitrogen ratio on the chlorination of microbial aggregates - *Water Research*, 10 : 515-522.
- CHARACKLIS W.G., NIMMANS M.J. & PICOLOGLOU B.F., 1981 - Influence of fouling biofilm on heat transfer - *Heat transfert engineering*, 3 : 23-37.
- CHARACKLIS W.G., TRULEAR M.G., BRYERS J.D. & ZELVER N., 1982 - Dynamics of biofilm processes : Methods - *Water Research*, 16 : 1207-1216.
- CHET I., ASKETH P. & MITCHELL R., 1975 - Repulsion of bacteria from marine surfaces - *Appl. Environ. Microbiol.*, 30 : 1043-1045.
- CORPE W.A., 1970 - Attachment of marine bacteria to solid surfaces. In : Adhesion in biological systems - *Academic press, Inc, New-York - London*, Chap. 4 : 73-87.

- CORPE W.A., 1973 - Microfouling : The role of primary film forming marine bacteria - In : *3rd International Congress on Marine Corrosion and Fouling - Northwestern University Press, Evanston, Ill :* 598-609.
- CORPE W.A., 1974 - Periphytic marine bacteria and the formation of microbial films on solid surfaces - In : *Effects of the ocean environment on microbial activities - Eds Colwell R. & Morita R.Y., Park Press, Baltimore Md :* 397-417.
- CORPE W.A., 1975 - Metal-binding properties of surfaces materials from marine bacteria - *Dev. Ind. Microbiol.*, 16 : 249-255.
- CORPE W.A., 1977 - Marine microfouling and OTEC heat exchangers - In : *Proceedings of the OTEC biofouling and corrosion symposium - Seattle, Washington (Eds : Gray R.H.) :* 31-44.
- COSTERTON J.W., 1980 - Some techniques involved in study of adsorption of microorganisms to surfaces - In : *Adsorption of microorganisms to surfaces (Eds : Bitton G. & Marshall K.C.) - A Wiley Interscience Publication - New-York :* 403-423.
- COSTERTON J.W. & LASHEN E.S., 1984 - Influence of biofilm on efficacy of biocides on corrosion-causing bacteria - *Materials performance*, 23 : 13-17.
- DAHLBACK B., HERMANSSON M., KJELLEBERG S. & NORKRANS B., 1981 - The hydrophobicity of bacteria - An important factor in their initial adhesion at the air-water interface - *Arch. Microbiol.*, 128 : 267-270.
- DAHLBACK B. & PEDERSEN K., 1982 - Viability of a marine microbial biofilm - *Current Microbiol.*, 7 : 209-212.
- DANIELS S.L., 1972 - The adsorption of microorganisms onto solid surfaces : A review - *Developments in industrial microbiology*, 13 : 211-253.

- DANIELS S.L., 1980 - Mechanisms involved in sorption of microorganisms to solid surfaces - In: *Adsorption of microorganisms to surfaces* (Eds Bitton G. & Marshall K.C.) - A Wiley Interscience Publication - New York : 8-58.
- DAWSON M.P., HUMPHREY B.A. & MARSHALL K.C., 1981 - Adhesion : a tactic in the survival strategy of a marine *Vibrio* during starvation. *Current Microbiology*, 6 : 195-199.
- DELILLE D. & LAGARDE E., 1974 - Contribution à l'étude écologique des milieux subantarctiques. Chap. V. *Revue de l'Institut Pasteur de Lyon*, T 7, 2 : 149-165.
- DEMPSEY M.J., 1981 - Marine bacterial fouling : A scanning Electron Microscope study - *Mar. Biol.*, 61 : 305-315.
- DEXTER S.C., SULLIVAN J.D., WILLIAMS III J. & WATSON S.W., 1975 - Influence of substrate wettability on the attachment of marine bacteria to various surfaces - *Appl. Environ. Microbiol.*, 30 : 298-308.
- DISALVO L.H. & COBET A.B., 1974 - Control of an estuarine microfouling sequence on optical surfaces using low intensity ultraviolet irradiation - *Appl. Microbiol.*, 27 : 172-178.
- DOW C.S., WESTMACOTT D. & WHITTENBURY R., 1976 - Ultrastructure of budding and prosthecate bacteria - In: *Microbial ultrastructure, the use of the electron microscope* (Eds : Fuller R. & Lovelock D.W.) Academic Press : 187-221.
- EATON A., CHAMBERLIN C. & COONEY M., 1980 - Colonization of Cu-Ni surfaces by microfouling organisms. In *Cardenser biofouling Control symposium proceeding*. Eds. Grarey et al. Ann. Arbor. Sci. publishers Inc. 105-119.

- ELLIOT J.M. & DECAMPS, 1973 - Guide pour l'analyse statistique des échantillons d'invertébrés benthiques - *Annls. Limnol.*, 9 : 79-120.
- ELLWOOD D.C., KEEVIL C.W., MARSH P.D., BROWN C.M. & WARDELL J.N., 1982 - Surface-associated growth - *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, 297 : 517-532.
- EVANS H.L., 1968 - Laminar Boundary-Layer theory - *Addison Wesley Pub. Co.*
- FAVA J.A. & THOMAS D.L., 1978 - Use of chlorine to control OTEC biofouling - *Ocean Engng.*, 5 : 269-288.
- FELDNER J., BREDT W. & KAHANE R., 1983 - Influence of cell shape and surface charge on attachment of *Mycoplasma pneumonia* to glass surfaces - *Journal of bacteriology*, 153 : 1-5.
- FLETCHER M., 1976 - The effects of proteins on bacterial attachment to polystyrene - *J. Gen. Microbiol.*, 94 : 400-404.
- FLETCHER M., 1977 - The effects of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene - *Can. J. Microbiol.*, 23 : 1-6.
- FLETCHER M., 1979 - The attachment of bacteria to surfaces in aquatic environments - In : *Adhesion of microorganisms to surfaces* (Eds : Ellwood D.C., Melling J. & Rutter) - *Academic Press* : 87-108.
- FLETCHER M. & LOEB G.I., 1979 - Influence of substratum characteristics on the attachment of a marine *Pseudomonad* to solid surfaces - *Appl. Environ. Microbiol.*, 37 : 67-72.
- FLETCHER M. & MARSHALL K.C., 1982 - Bubble contact angle method for evaluating substratum interfacial characteristics and its relevance to bacterial attachment - *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 184-192.

- FLETCHER M. & MARSHALL K.C., 1982 - Are solid surfaces of ecological significance to aquatic bacteria ? - *Advances in microbial ecology*, 6 : 199-236.
- FLETCHER M. & Mc ELDFORNEY S., 1984 - Microbial attachment to nonbiological surfaces - *Current perspectives in microbial ecology* (Eds : Klug M.J. & Reddy C.A.) : 124-129.
- FLOODGATE G.D., 1966 - Factors affecting the settlement of a marine bacterium. *Veröffentlichungen des Institut für Meeresforschung in Bremerhavens*, 2 : 265-270.
- FLOODGATE G.D., 1968 - Primary fouling of bacteria - In : *Proceedings of OECD Workshop : Marine borers, fungi and fouling organisms of wood* (Eds : Gareth Jones E.B.) SK Eltringham : 117-123.
- FLOODGATE G.D., 1972 - The mechanism of bacterial attachment to detritus in aquatic systems - *Mem. Ist. Ital. Idrobiol.*, 29 : 309-323.
- FRY J.C. & HUMPHREY N.C.B., 1978 - Techniques for the study of bacteria epiphytic on aquatic macrophytes - In : *Society for applied bacteriology - Technical serie II - Techniques for the study of mixed populations* (Eds : Lovelock D.W. & Davies R.) - Academic Press, London, New-York, San Francisco : 1-26.
- FRY J.C. & DAVIES A.R., 1984 - An assessment of methods for measuring volumes of planktonic bacteria, with particular reference to television image analysis - *J. Appl. Bacteriol.*, 57 : 000-000.
- FUKAMI K., SIMIDU U. & TAGA N., 1981 - Fluctuation of the communities of heterotrophic bacteria during the decomposition process of phytoplankton. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 55 : 171-184.
- GERCHAKOV S.M., MARSZALEK D.S., ROTH F.J. & UDEY L.R., 1976 - Succession of periphytic microorganisms on metal and glass surfaces in natural seawater - In : *Proc. 4th Int. Congress on Marine Corrosion and Fouling - Eds Romanovsky - Juan-les-Pins, Antibes* : 203-210.

- GERCHAKOV S.M., ROTH F.J., SALLMAN B., UDEY L.R. & MARSZALEK, 1978 -  
Observations on microfouling applicable to OTEC systems -  
In : *Proceedings of the OTEC biofouling and corrosion symposium* :  
63-75.
- GORDON A.S., GERCHAKOV S.M. & MILLERO F.J., 1983 - Effects of inorganic  
particles on metabolism by a periphytic marine bacterium -  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 411-417.
- GRAINGE J.W. & LUND E., 1969 - Quick culturing and control of iron bacteria -  
*J. Amer. Wat. Works. Assoc.*, 61 : 242-245.
- HARVEY R.W., LION L.W. & YOUNG L.Y., 1983 - Transport and distribution of  
bacteria and diatoms in the aqueous surface microlayer of a  
salt marsh - *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 16 : 543-547.
- HOBBIE J.E., DALEY R.J. & JASPER S., 1977 - Use of nuclepore filters for  
counting bacteria by fluorescence microscopy - *Appl. Environ.  
Microbiol.*, 33 : 1225-1228.
- HUGH R. & LEIFSON E., 1953 - The taxonomic significance of fermentative versus  
oxydative metabolism of carbohydrates by various gram negative bac-  
teria. *J. Bact.*, 66 : 24-26.
- HUMPHREY B., KJELLEBERG S. & MARSHALL K.C., 1983 - Responses of marine  
bacteria under starvation conditions at a solid water interface -  
*Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 43-47.
- HOROWITZ A.M., KRICHEVSKY M.I. & ATLAS R.M., 1983 - Characteristics and  
diversity of subarctic marine oligotrophic, steno-heterotrophic  
and euryheterotrophic bacterial populations - *Can. J. Microbiol.*,  
29 : 527-535.
- ISHIDA Y., SHIBAHARA K., UCHIDA H. & KADOTA H., 1980 - Distribution of  
obligately oligotrophic bacteria in lake Biwa - *Bulletin of  
the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 46 : 1151-1158.

- JACQ E., QUEGUINER B., PRIEUR D. & TREGUER P., 1984 - Modification de l'aspect des peuplements bactériens en relation avec un bloom phytoplanktonique en rade de Brest - *Oceanis*, 11(3) : 213-222.
- JANNASCH H.W. & JONES G.E., 1959 - Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration - *Limnol. Oceanogr.*, 4 : 128-139.
- KIRCHMAN D., SIGDA J., KAPUSCUISKI R. & MITCHELL R., 1982 - Statistical analysis of the direct count method for enumerating bacteria - *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 376-382.
- KIRCHMAN D. & GRAHAM S., 1982 - Bacteria induce settlement and metamorphosis of *JANUA (Dexiospira) BRASILIENSIS* Graube (*Polychaeta : spirorbidae*) - *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 56 : 153-163.
- KIRCHMAN D. & MITCHELL R., 1982 - Contribution of particle-bound bacteria to total microheterotrophic activity in five ponds and two marshes - *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 : 200-209.
- KJELLEBERG S., HUMPHREY B.A. & MARSHALL K.C., 1982 - Effect of interfaces on small, starved marine bacteria - *Appl. Environ. Microbiol.* : 43 1166-1172.
- KJELLEBERG S., HUMPHREY B.A. & MARSHALL K.C., 1983 - Initial phases of starvation and activity of bacteria at surfaces - *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 978-984.
- KNIGHT JONES E.W., 1951 - Gregariousness and some other aspect of the settling behavior of *Spirorbis* - *J. Mar. Biol. Assoc., U.K.*, 51 : 201-222.
- KORNEGAY B.H. & ANDREWS J.F., 1970 - Characteristics and kinetics of biological fixed film reactors - *Final report, Federal water pollution control administration, Research grant WP 01181* : 216 p.



- KORTE V.L. & BLINN D.W., 1983 - Diatom colonization on artificial substrata in pool and riffle zones studied by light and scanning electron microscopy - *J. Phycol.*, 19 : 332-341.
- KUZNETSOV S.I., DUBININA G.A. & LAPTEVA N.A., 1979 - Biology of oligotrophic bacteria - *Ann. Rev. Microbiol.*, 33 : 377-387.
- LAQUE L.F., 1975 - The nature of corrosion processes - In : *Marine Corrosion* (Eds : Wiley J. & al.) New-York : 22-29.
- LEE L.H., 1968 - Adhesion of high polymers - IV - Relationships between surface wettability and bulk properties of high polymers - *Advances in Chemistry Series*, 87 : 106-123.
- LEWIS R.O., 1982 - Influence of biofouling countermeasures on corrosion of heat exchanger materials in seawater - *Materials performance*, 21 : 31-38.
- LIORZOU A., 1973 - Initiation pratique à la statistique - *Eds Eyrolles - Gauthier - Villars* : 313 p.
- LYMAN J. & FLEMING R., 1940 - Composition on sea water - *J. Mar. Res.*, 3 : 134-146.
- Mc COY W.F., BRYERS J.D., ROBBINS J. & COSTERTON J.W., 1981 - Observations of fouling biofilm formation - *Can. J. Microbiol.*, 27 : 910-917.
- Mc COY W.F. & COSTERTON J.W., 1982 - Fouling biofilm development in tubular flow systems - *Dev. Ind. Microbiol.*, 23 : 551-558.
- MC GRADY M.A., 1918 - Tables for rapid interpretation of fermentation tubes results. *The publ. Health. Journ.* 9(5) : 201-202.
- MARSHALL K.C., STOUT R. & MITCHELL R., 1971a - Mechanisms of initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces - *J. Gen. Microbiol.*, 68 : 337-348.

- MARSHALL K.C., STOUT R. & MITCHELL R., 1971b - Selective sorption of bacteria from seawater. *Can. J. Microbiol.*, 17 : 1413-1416.
- MARSHALL K.L., 1972 - Mechanisms of adhesion of marine bacteria to surfaces - In : *Proceedings of the Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling - National bureau of standards, Gaithersburg, MD* : 625-632.
- MARSHALL K.C. & CRUICKSHANK R.H., 1973 - Cell surface hydrophobicity and orientation of certain bacteria at interfaces - *Arch. Mikrobiol.*, 91 : 29-40.
- MARSHALL K.C., 1979 - Reactions of microorganisms, ions and macromolecules at interfaces - In : *Adhesion of microorganisms to surfaces (Eds : Ellwood D.C., Melling J. & Rutter P.) - Academic Press* : 93-106.
- MARSHALL K.L., 1980 - Bacterial adhesion in natural environments - In : *Microbial adhesion to surfaces. Eds Berkeley RCW and al., Chap. 4* : 187-193.
- MARSHALL K.C., 1981 - Bacterial behavior at solid surfaces - a prelude to microbial fouling. In *Fouling of heat transfer equipment. Eds. E.F.C. Somerscales et Knudsen J.G. Hemisphere Publishing Corporation, US* : 305-312.
- MARSZALEK D.S., GERCHAKOV S.M. & UDEY L.R., 1979 - Influence of substrate composition on marine microfouling - *Appl. Environ. Microbiol.*, 38 : 987-995.
- MEADOWS P.S., 1971 - The attachment of bacteria to solid surfaces - *Archiv. für Mikrobiologie*, 75 : 374-381.
- MENZEL D.W. & RYTHER J.H., 1970 - Distribution and cycling of organic matter in the oceans - In : *Organic matter in natural waters (Ed. HOOD D.W.) Institut of marine science college, Alaska* : 31-54.

- MERLINAT F., 1982 - Etude comparée de la formation du voile biologique sur un substrat métallique et un matériau de substitution. D.E.A. - U.B.O. : 24 p.
- MILLS A.L. & MAUBREY R., 1981 - Effect of mineral composition on bacterial attachment to submerged rock surfaces - *Microb. Ecol.*, 7 : 315-322.
- MITCHELL R. & YOUNG L., 1972 - The role of microorganisms in marine fouling - *Technical Report n° 3 - Office of Naval Research - Contrat N00014. 67.A.0298.0026, NR.306.025* : 23 p.
- MONOD J., 1942 - Recherches sur la croissance des cultures bactériennes - Dans : *Actualités scientifiques et industrielles (Eds : Herman & Cie)* : 210 p.
- MOLIN G. & NILSSON I., 1983 - Effect of different environmental parameters on the biofilm build up of *Pseudomonas putida* ATCC 11172 in chemostat - *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18 : 114-119.
- MORITA R.Y., 1982 - Starvation-survival of hétérotrophs in the marine environment - *Adv. Microbiol. Ecol.*, 6 : 171-198.
- MUNTEANU N. & MALY E.J., 1981 - The effect of current on the distribution of diatoms settling on submerged glass slides - *Hydrobiologia*, 78 : 273-282.
- NEIHOF R. & LOEB G., 1972 - Molecular fouling of surfaces in sea water - In : *Proceedings of the Third International Congress on Marine Corrosion and Fouling - National bureau of standards, Gaithersburg, MD* : 710-718.
- NICKELS J.S., BOBBIE R.J., LOTT D.F., MARTZ R.F., BENSON P.H. & WHITE D.C., 1981 - Effect of manual brush cleaning on biomass and community structure of microfouling film formed on aluminium and titanium surfaces exposed to rapidly flowing seawater - *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 1442-1453.

- NORRMAN G., CHARACKLIS W.G. & BRYERS J.D., 1977 - Control of microbial fouling in circular tubes with chlorine - *Development in industrial microbiology* : 581-590.
- NOVITSKY J.A. & MORITA R.Y., 1976 - Morphological characterization of small cells resulting from nutrient starvation of a psychrophilic marine *Vibrio*. - *Appl. Environ. Microbiol.*, 32 : 617-622.
- NOVITSKY J.A. & MORITA R.Y., 1977 - Survival of a psychrophilic marine *Vibrio* under long-term nutrient starvation - *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 : 635-641.
- NOVITSKY J.A. & MORITA R.Y., 1978 - Possible strategy for the survival of marine bacteria under starvation conditions - *Mar. Biol.*, 48 : 289-295.
- O'NEILL T.B. & WILCOX G.L., 1971 - The formation of a "primary film" on materials submerged in the sea at port Hueneme, California - *Pacific Sciences*, 25 : 1-12.
- OPPENHEIMER C.H. & ZOBELL C.E., 1952 - The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.*, 11 : 10-18.
- PAUL J.H. & LOEB G.I., 1983 - Improved microfouling assay employing a DNA specific fluorochrome and polystyrene as substratum - *Appl. Environ. Microbiol.*, 46 : 338-343.
- PEARCE W.A. & BUCHANAN T.M., 1980 - Structure and cell membrane binding properties of bacterial fimbriae - In : *Bacterial adherence* (Ed : Beachey E.H.) London, New-York : 289-344.
- PEDERSON K., 1982 - Factors regulating microbial biofilm development in a system with slowly flowing seawater - *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 1196-1204.

- PEELE E.P. & COLWELL R.R., 1981 - Application of a direct microscopic method for enumeration of substrate-responsive marine bacteria - *Can. J. Microbiol.*, 27 : 1071-1075.
- POINDEXTER J.S., 1981 a - The *Caulobacters* : ubiquitous unusual bacteria - *Microbiol. Rev.*, 45 : 123-179.
- POINDEXTER J.S. , 1981 b - Oligotrophy : fast and famine existence - In : *Advances in microbial ecology, Vol. 5, (Ed, Alexander M.) - Plenum Press, New-York* : 63-89.
- POSTGATE J.R., 1966 - Media for sulphur bacteria. *Lab. Pract.*, 15 : 1239-1244.
- PRIEUR D., 1981 - Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. *Thèse d'Etat, U.B.O. Brest* : 266 p.
- RUSESKA I., ROBBINS J., COSTERTON J.W. & LASHEN E.S., 1982 - Biocide testing against corrosion causing oil-field bacteria helps control plugging - *Technology Oil and Gas Journal* : 253-264.
- SANDERS W.M. III, BUNGAY H.R. & WHALEN W.J., 1971 - Oxygen microprobe studies on microbial slime films - *Chem. Engng. Prog. Symp. Ser. N° 90*, 67 : 69-74.
- SECHLER G.E. & GUNDERSEN K., 1972 - Role of surface chemical composition on the microbial contribution to primary films - *Proc. Third Internat. Congr. Marine corrosion and fouling. Ed. by Dugger G.L. Northwestern Univ. Press* : 610-616.
- SKERMAN T.M., 1956 - The nature and development of primary films on surfaces submerged in the sea - *N.Z. Journal of Science and Technology* : 44-57.
- SOKAL P.R. & MICHENER C.D., 1958 - A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ. Kansas. Sci. Bull.* 38 : 1409-1438.

- STANLEY M.P., 1983 - Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel - *Can. J. Microbiol.*, 29 : 1493-1499.
- TORELLA F. & MORITA R.Y., 1981 - Microcultural study of bacterial size changes and microcolony and ultramicrocolony formation by heterotrophic bacteria in seawater - *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 518-527.
- TOSTESON Y.R., AXTMAYER R.W., REVUELTA R., IMAM S., ZAIDI B.R., BALLANTINE D.L., SASSCER D.J. & MORGAN T., 1983 - Marine micro-fouling on aluminium and titanium heat exchanger surfaces at the CEER OTEC Puerto Rico facility - In : *Alternative energy sources III, 4 - Indirect solar/geothermal energy - Hemisphere Pub. Corp. Wash. DC, New-York, London* : 309-319.
- TROUSSELLIER M. & LEGENDRE P., 1981 - A functional evenness index for microbial ecology - *Microb. Ecol.*, 7 : 283-296.
- VAN ES F.B. & MEYER-REIL L.A., 1982 - Biomass and metabolic activity of heterotrophic marine bacteria - *Advances in Microbial Ecology*, 6 : 111-170.
- WATSON S.W., NOVITSKY T.J., QUINBY H.L. & VALOIS F.W., 1977 - Determination of bacterial number and biomass in the marine environment. *Appl. and Environ. Microbiol.*, 33 : 940-946.
- WEISE W. & RHEINHEIMER G., 1978 - Scanning electron microscopy and epifluorescence investigation of bacterial colonization of marine sand sediments - *Microb. Ecol.*, 4 : 175-188.
- WHITE D.C., DAVIS W.M., NICKELS J.S., KING J.D. & BOBBIE R.J., 1979 - Determination of the sedimentary microbial biomass by extractible lipid phosphate - *Ecologia*, 40 : 51-62.

YANSHUN L., DEZAN Y., ZIYUAN & RUIMEI Y., 1984 - Characteristics of micro-fouling organisms in Xiamen Harbour (China) - In : *Marine biology - 6th International Congress on Marine Corrosion and Fouling - Athens* : 9-21.

ZELVER N., LEGAN R. & CHARACKLIS W.G., 1981 - Biofouling control with UV/peroxide - *Water Reuse Symposium II, Washington DC* : 1-20.

ZIMMERMAN R. & MEYER-REIL L.A., 1974 - A new method for staining of bacterial populations on membrane filter - *Kiel Meeresforsch.*, 30 : 24-27.

ZIMMERMAN R., 1977 - Estimation of bacterial number and biomasse by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy - In : *Microbial ecology of a Brackish water environment (Ed : Rheinheimer)*, Springer-Verlag, Berlin : 103-120.

ZISMAN W.A., 1964 - Relation of the equilibrium contact angle to liquid and solid constitution - *Adv. Chem. Ser.*, 43 : 1-51.

ZOBELL C.E., 1943 - The effect of solid surfaces upon bacterial activity - *Journal of Bacteriology*, 46 : 39-56.

ANNEXES



TEST SUR L'ACTION DU NOIR IRGALAN

Afin de voir si le noir Irgalan n'a pas un effet nocif sur les bactéries, 2 tests ont été effectués.

Test 1 : Le noir Irgalan diffuse-t-il dans le milieu environnant des substances nocives qui seraient létales pour la flore bactérienne ?

Test 2 : Le noir Irgalan est-il répulsif et empêche-t-il la bonne fixation des microorganismes sur les filtres nuclépores ?

Test 1

Quatre prélèvements d'eau de mer de 10 ml ont été effectués simultanément dans un bac d'élevage au laboratoire. Dans 2 d'entre eux, 2 filtres noircis ont été immergés, pendant 24 heures. Les 2 autres n'ont rien reçu et ont servi de témoins.

La flore bactérienne viable en suspension dans chaque prélèvement, a ensuite été évaluée par ensemencement et dénombrement sur milieu de culture gélosé 2216E.

Cette expérience a été doublée.

Résultat

Bactérie.ml <sup>-1</sup>	Expérience du 15-2-83		Expérience du 23-2-83	
	Filtre noirci	Témoins	Filtre noirci	Témoins
Table 1	1,7 . 10 <sup>5</sup>	1,3 . 10 <sup>5</sup>	1,6 . 10 <sup>5</sup>	1,2 . 10 <sup>5</sup>
Table 2	1,8 . 10 <sup>5</sup>	1,4 . 10 <sup>5</sup>	1,5 . 10 <sup>5</sup>	0,9 . 10 <sup>5</sup>
Moyenne	1,75 . 10 <sup>5</sup>	1,35 . 10 <sup>5</sup>	1,55 . 10 <sup>5</sup>	1,1 . 10 <sup>5</sup>

D'après ces résultats, il semble que le noir Irgalan ne diffuse pas de substances nocives pour la flore bactérienne environnante.

Pour les 2 expériences, les dénombrements bactériens sont sensiblement identiques entre les tubes témoins et les tubes ayant contenu des filtres noircis pendant 24 heures. Il faut cependant remarquer que les échantillons témoins ont toujours une densité inférieure aux autres. Cette différence peut avoir 2 origines :

- Contamination des échantillons lors des manipulations.
- Le noir Irgalan stimule peut être le développement de certaines souches bactériennes.

### Test 2

Quatre filtres nuclépores (0,2 µm) ont été noircis au noir Irgalan et 2 autres n'ont subi aucun traitement. Ces 6 filtres ont été immergés pendant 6 jours dans un bac d'élevage du 22-2-83 au 28-2-83. Après émersion, les densités des bactéries fixées sur ces échantillons ont été évaluées par numération, soit par microscopie électronique à balayage, soit par microscopie à épifluorescence.

Après émersion, 2 filtres noircis et les 2 filtres blancs ont été fixés au glutaraldéhyde (2,5% dans de l'eau de mer filtrée stérile) et préparés pour la microscopie électronique. Les 2 autres filtres noircis ont été fixés au formaldéhyde (2% dans de l'eau de mer filtrée stérile) et préparés pour la microscopie à épifluorescence.

### Résultats

Nombre bactéries fixées / cm <sup>2</sup>	Microscopie électronique		Epifluorescence
	Filtre noirci	Filtre blanc	Filtre noirci
Filtre 1	3,2 . 10 <sup>6</sup>	3 . 10 <sup>5</sup>	3,1 . 10 <sup>6</sup>
Filtre 2	2,95 . 10 <sup>6</sup>	1,1 . 10 <sup>6</sup>	2,28 . 10 <sup>6</sup>
Moyenne	3,1 . 10 <sup>6</sup>	7 . 10 <sup>5</sup>	2,7 . 10 <sup>6</sup>

Pour un prélèvement effectué le 23-2-83, la densité des bactéries en suspension, dénombrée par épifluorescence est de  $1,1 \cdot 10^5$  cellules  $\cdot$  ml<sup>-1</sup>.

D'après ces résultats, le noir Irgalan ne semble pas gêner la fixation bactérienne et au contraire, il y a plus de cellules fixées sur les filtres noircis que sur les filtres blancs (4 fois).

Cette expérience a permis de tester les 2 méthodes de numération, microscopie électronique à balayage et épifluorescence. Les résultats des filtres noircis sont sensiblement les mêmes. Ceci est en accord avec les travaux de BOWDEN (1976).

### CHOIX D'UNE METHODE DE RINCAGE

L'étude qualitative du biofilm bactérien passe par l'isolement et la purification d'un certain nombre de souches bactériennes fixées. Etant donné leur porosité et leur souplesse, dès leur émergence, les filtres nuclépores coloriés peuvent être déposés sur un milieu de culture gélosé afin que les bactéries qui y sont fixées se multiplient et forment des colonies qui seront isolées et purifiées (NOVITSKY et MORITA, 1976 ; GERCHAKOV et al., 1978).

Cette méthode présente l'avantage de ne pas intervenir de façon plus ou moins brutale au niveau du biofilm. Il faut cependant s'assurer que les bactéries qui se développent, représentent bien la flore bactérienne fixée et non des bactéries qui peuvent se trouver piégées dans le film d'eau superficiel qui se forme sur le support lors de son émergence. Trois méthodes de rinçage ont donc été testées afin d'évaluer leur efficacité de nettoyage.

Après coloration au noir Irgalan, les filtres sont fixés sur leur support de PVC, puis immergés dans un aquarium d'eau de mer durant des périodes de temps croissantes : 1 h, 6 h, 1 jour, 3 jours, 7 jours.

Pour chaque temps d'exposition, 4 filtres sont émergés dont 2 sont directement fixés au formaldéhyde (2% dans de l'eau de mer filtrée stérile) et les 2 autres rincés selon la méthode choisie, puis fixés. Les dénombrements sont ensuite effectués par microscopie à épifluorescence.

Les 3 techniques testées sont : (figure 1)

Méthode I : Rinçage des filtres par agitation sur Vortex.

Dès leur émergence, les filtres (porosité 0,2  $\mu\text{m}$ ) sont plongés dans un tube à essai contenant 15 ml d'eau de mer stérile, puis le tube est agité pendant 5 secondes sur Vortex.

Méthode II : Rinçage des filtres dans de l'eau de mer stérile.

Dès leur émergence, les filtres (porosité 0,2  $\mu\text{m}$ ) sont passés doucement dans 5 bains successifs d'eau de mer stérile.

Méthode III : Rinçage par filtration d'eau au travers du filtre.

Les filtres nuclépores utilisés comme matériel de colonisation, pour cette expérience, ont une porosité de 3  $\mu\text{m}$ . La taille des cellules bactériennes

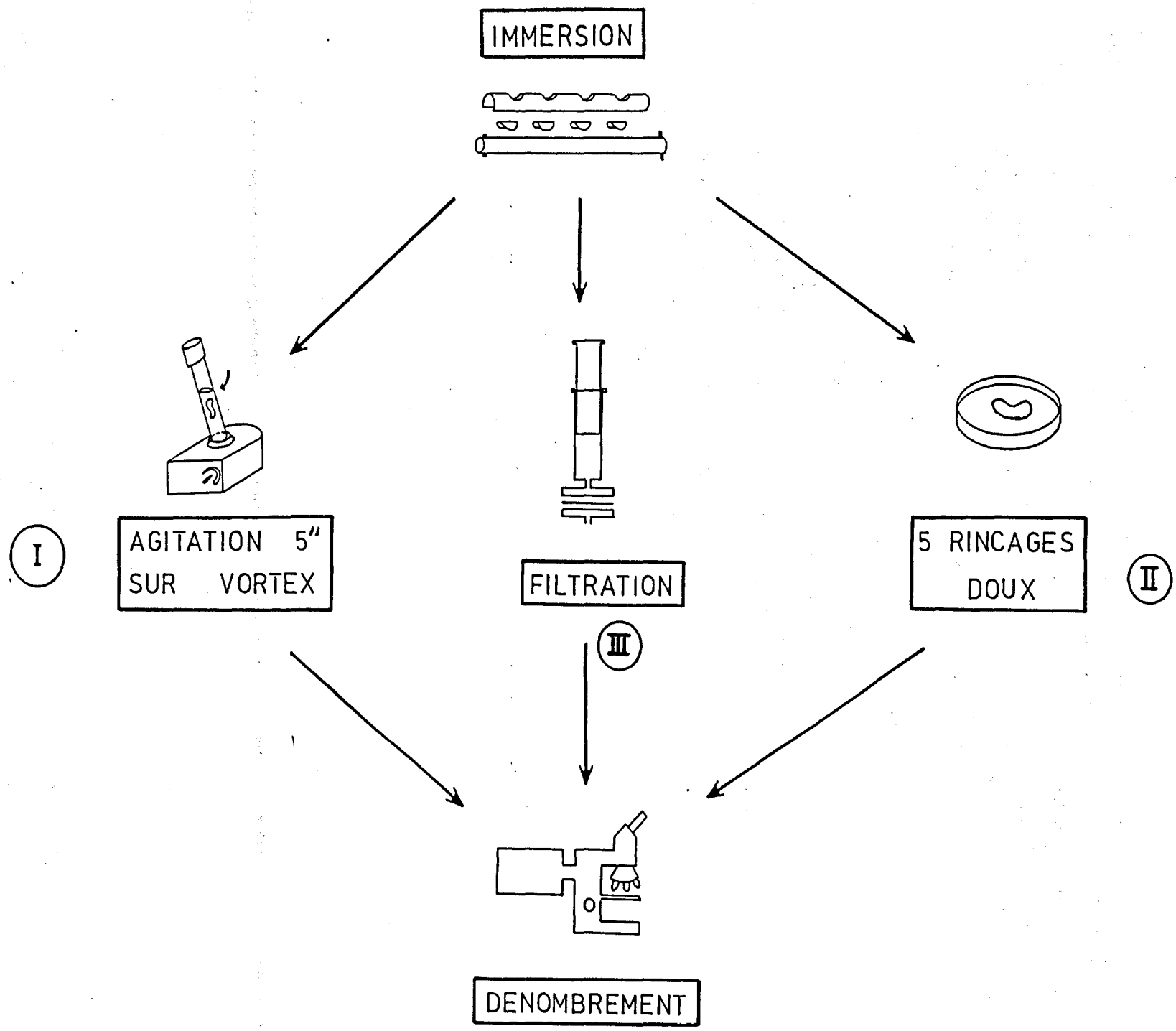


Fig. 1 : Représentation schématique des 3 méthodes de rinçage.

du milieu étant en moyenne comprise entre 0,1 et 2  $\mu\text{m}$ , ce diamètre de pore doit permettre à la majorité des bactéries qui ne sont pas bien fixées à ce support, de pouvoir passer au travers du filtre lors du rinçage. Dès leur émergence, les filtres sont placés dans un système porte filtre (Sartorius), face colonisée vers le haut. Par pression sur le piston de la seringue, 10 ml d'eau de mer stérile filtrée à 0,2  $\mu\text{m}$  sont filtrés au travers du filtre colonisé.

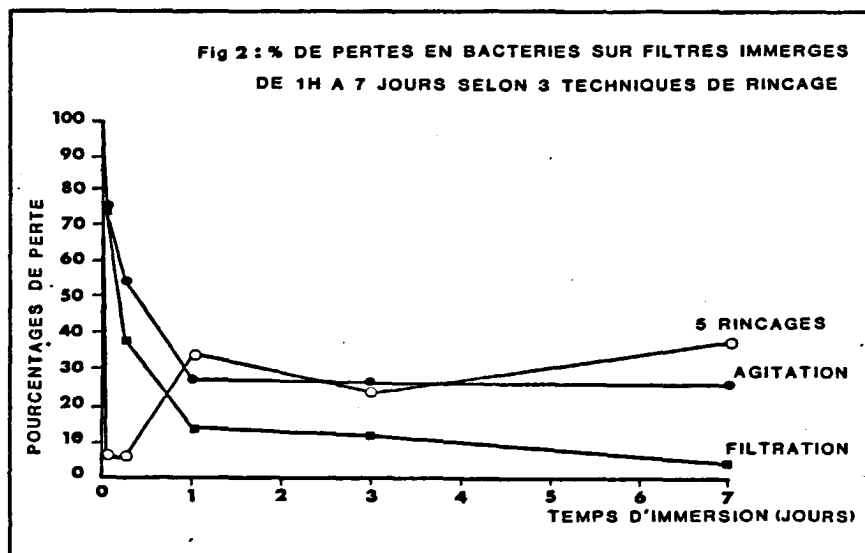
## RESULTATS

Les résultats sont présentés sur la figure 2.

La méthode I entraîne une perte de bactéries de 75,7 et 55%, respectivement pour des échantillons ayant séjournés 1 h et 6 h dans l'eau. Son efficacité baisse dès 1 jour d'immersion à 27% et se maintient à cette valeur, même si le temps d'immersion augmente. Ce résultat a été obtenu pour des échantillons immergés pendant 15 jours. (perte de 27,5%, valeur non représentée sur le graphique).

La méthode II enlève peu de bactéries, 6 et 8,3% pour les faibles temps d'immersion, respectivement 1 h et 6 h. Après 1 jour d'immersion le pourcentage de perte augmente, pour devenir maximum à 39,5% après 7 jours.

La méthode III enlève 76,8% des bactéries pour les échantillons ayant séjournés 1 h dans l'eau. Son efficacité baisse ensuite, avec l'augmentation du temps d'immersion des échantillons, pour atteindre un minimum de 4,5% après 7 jours.



## DISCUSSION :

Lors des études qualitatives du biofilm, seules les bactéries solidement fixées aux surfaces devaient être étudiées, après élimination des autres. MARSHALL et al. (1971) définit les 2 phases, réversible et irréversible de la fixation bactérienne à des surfaces. L'adhésion irréversible entraîne la fixation ferme des cellules aux surfaces. Elle est définie par le fait que les bactéries ne présentent plus de mouvements Brownien et ne sont plus décrochées par un rinçage avec une solution de NaCl à 2,5%. A ce stade les bactéries sont solidement fixées aux surfaces par des ponts de fibrilles polymériques qu'elles ont synthétisé. Lors de la phase réversible qui ne dure que quelques minutes, les bactéries peuvent être éliminées par rinçage. Quel que soit le temps d'immersion, du fait du renouvellement de l'eau en contact direct avec la surface, il y a constamment des bactéries en phase réversible de fixation. Il fallait aussi éliminer les bactéries qui peuvent rester piégées dans le film d'eau superficiel qui se forme sur le support, lors de son émergence.

La méthode généralement utilisée pour enlever les bactéries non fixées consiste à rincer 5 fois le support, soit dans de l'eau de mer filtrée stérile (DEXTER, 1979 ; CORPE, 1972) ; soit dans de l'eau déionisée stérile BRYANT, 1983 ; STANLEY, 1983). Certains auteurs ont montré qu'il n'y avait pas de différence à rincer les supports avec de l'eau de mer ou de l'eau distillée (CORPE, 1974 ; FLETCHER, 1976), bien que l'emploi de l'eau distillée entraînait une lyse de certaines cellules (CORPE, 1970). Par contre, MEADOWS (1965) montre qu'un séjour prolongé, d'une heure trente, des supports dans de l'eau de mer à 5‰ peut décrocher 70% des bactéries marines qui y étaient fixées.

Les résultats obtenus par la méthode des 5 rinçages dans de l'eau de mer semblent assez aléatoires. En effet, son efficacité apparaît la plus faible pour les échantillons ayant séjournés 1 h et 6 h dans l'eau, alors que ce sont les périodes où les supports sont les moins colonisés. De plus, la reproductibilité de cette méthode a été mise en doute du fait de l'influence trop importante que pouvait introduire la manipulation par la vigueur de ses rinçages.

La méthode III, de filtration, présente 2 inconvénients :

Bien que le diamètre des pores des filtres aient été important (3µm), ils ont été rapidement colmatés par des débris et des particules, ce qui a empêché le libre passage des bactéries. Le nombre de ces particules augmentant

parallèlement au temps d'immersion des échantillons, peut expliquer la chute continue de l'efficacité de cette méthode. De plus cette technique demande l'emploi de filtre de forte porosité (3  $\mu\text{m}$ ) donc de grande fragilité, ce qui est gênant pour une étude en eau de mer circulante. Les forces de frictions ou les particules transportées par le courant d'eau peuvent déchirer le filtre à tout moment.

La méthode d'agitation sur Vortex est simple, rapide et présente une bonne reproductibilité, quel que soit le temps d'immersion des échantillons. C'est elle qui a été retenue.



CHOIX D'UNE METHODE DE DECROCHAGE.

Pour étudier qualitativement le biofilm, il est possible de décrocher les bactéries fixées de leur support, de les récupérer dans de l'eau de mer stérile et de procéder à un ensemencement sur milieu de culture gélosé, suivi d'un isolement et d'une purification des souches.

C'est par cette méthode qu'ont été étudiées les bactéries fixées à des surfaces solides, telles que les surfaces métalliques (méthode décrite au chapitre 412).

Pour décrocher les bactéries fixées aux surfaces maléables que sont les filtres Nucléopore, il est également possible d'utiliser les techniques qui sont employées pour étudier la flore bactérienne épiphyte des algues (FRY et HUMPHREY, 1978). Trois types de méthodes ont ainsi été testées afin d'évaluer leur efficacité de décrochage.

Après coloration au noir Irgalan, les filtres (porosités 0,2  $\mu\text{m}$ ) sont montés sur le système d'échantillonnage décrit au chapitre 411 et immergés durant 7 jours dans un aquarium d'eau de mer. Pour chaque méthode, 4 filtres sont utilisés et 2 supplémentaires servent à démontrer la flore bactérienne totale fixée, avant décrochage, par microscopie à épifluorescence.

Dès leur émergence, tous les échantillons sont rincés par agitation sur Vortex.

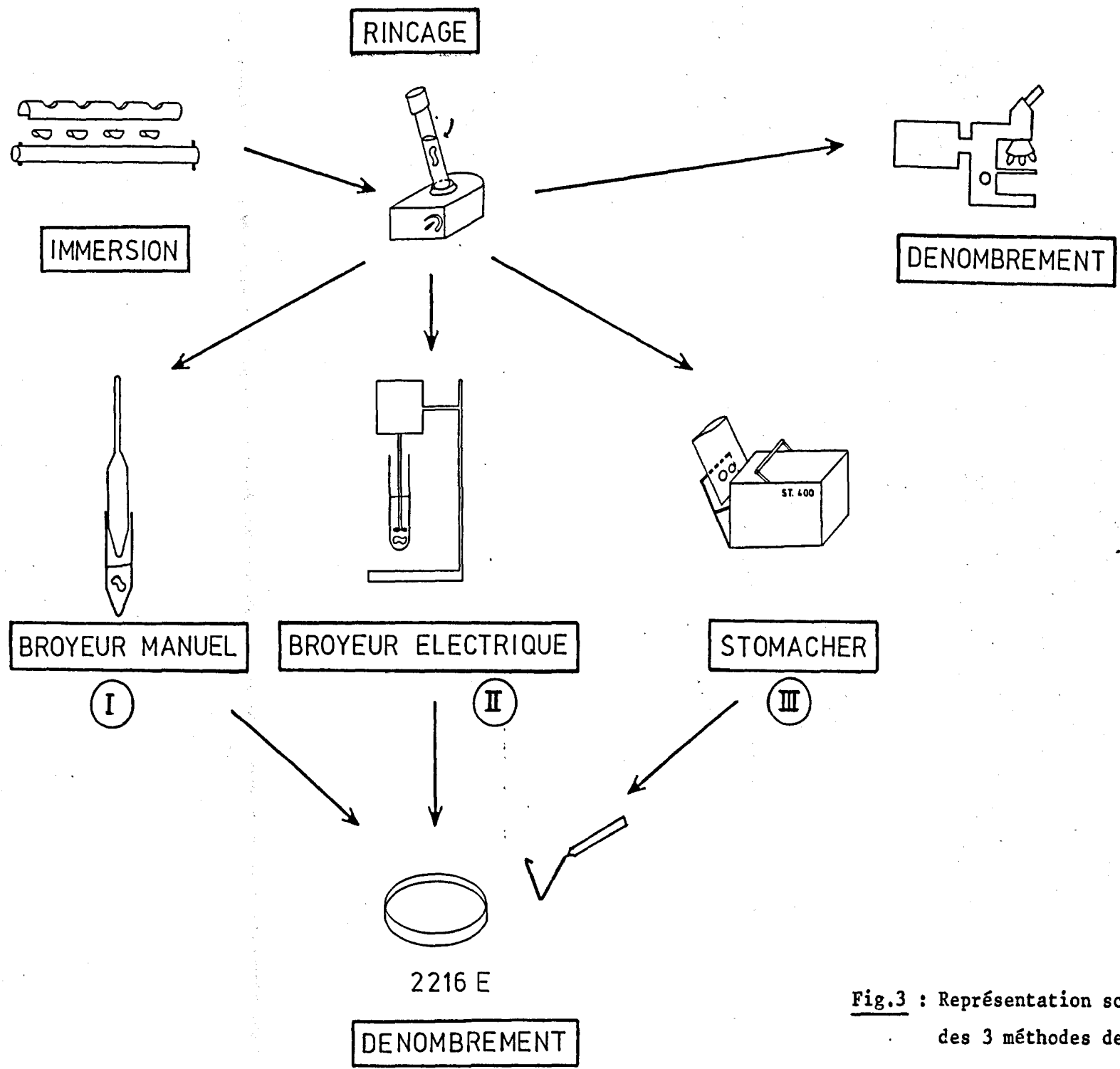
Quelle que soit la technique utilisée, le décrochage des bactéries se fait dans de l'eau de mer stérile. Cette eau sert ensuite à ensemencer, par étalement, un milieu de culture gélosé (2216E) afin de dénombrer les bactéries viables ainsi récupérées.

Les trois méthodes testées sont (figure 3).

Méthode I : Broyage des filtres avec un broyeur manuel en verre (DUALL 23, Kortès). Le filtre est broyé dans 5 ml d'eau de mer stérile pendant 2 minutes. L'eau est récupérée, le système est rincé avec 5 ml d'eau de mer stérile qui est aussi récupérée et à nouveau agitée sur Vortex.

Méthode II : Broyage des filtres avec un broyeur électrique Ultra Turrax (JAUKE et KUNDEL. K.G.).

Le protocole est le même que pour la méthode I.



**Fig.3** : Représentation schématique des 3 méthodes de décrochage.

Echantillon	Broyeur en verre				Broyeur électrique				Stomacher				Epifluorescence	
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2
Nombre bactéries. ml <sup>-1</sup> viables	1,02.10 <sup>4</sup>	1,6.10 <sup>4</sup>	5,7.10 <sup>3</sup>	3,6.10 <sup>3</sup>	1,1.10 <sup>4</sup>	5,10 <sup>2</sup>	1,7.10 <sup>3</sup>	1,8.10 <sup>3</sup>	5,8.10 <sup>4</sup>	1,5.10 <sup>4</sup>	3,2.10 <sup>4</sup>	2,3.10 <sup>4</sup>	-	-
Moyenne	8,8 . 10 <sup>4</sup>				3,7 . 10 <sup>4</sup>				3,2 . 10 <sup>5</sup>				-	
Nombre bactéries. cm <sup>-2</sup> *	9,1 . 10 <sup>3</sup>				3,8 . 10 <sup>3</sup>				3,3 . 10 <sup>4</sup>				9,8.10 <sup>6</sup> +	1,2.10 <sup>7</sup> +

\* : Surface colonisée est 9,6 cm<sup>2</sup>

+ : Densités totales avant décrochage. La densité totale de cellules qui restent fixées aux filtres après "stomacher" est de 2,8.10<sup>3</sup> bactéries par cm<sup>2</sup>, ce qui représente une perte de 99,97% (résultats non présentés dans le tableau)

TABLEAU 1 : EFFICACITE DE 3 METHODES DE DECROCHAGE.

Méthode III : Décrochage à l'aide d'un Stomacher "Lab-Blender 400". Le filtre est mis dans un sac de plastique stérile contenant 10 ml d'eau de mer stérile. Il est lui-même inséré dans un autre sac contenant 200 ml d'eau, afin de bien propager l'onde de choc et placé dans le Stomacher pendant 10 minutes.

#### RESULTATS :

Les résultats sont présentés dans le tableau 1.

Parmi les 3 méthodes, c'est le Stomacher qui permet de récupérer le plus de bactéries viables,  $3,3 \cdot 10^4$  bactéries.  $\text{cm}^{-2}$  et le broyeur électrique le moins  $3,8 \cdot 10^3$  bactéries.  $\text{cm}^{-2}$ . Bien que le Stomacher décroche 99,97% de la population totale fixée, la densité de cellules viables récupérées ne représente que 0,3% de cette population.

#### DISCUSSION :

Dans la littérature, les auteurs utilisent différentes méthodes pour récupérer des bactéries fixées à des supports solides.

CORPE (1972) frotte la surface avec un tampon d'ouate, qu'il plonge et agite dans de l'eau de mer stérile. Cette eau sert ensuite à ensemercer un milieu gélosé.

AFTRING (1983) gratte la surface avec un "Rubber Policeman" ou scalpel en caoutchouc et EATON et al. (1980) à l'aide d'un scalpel muni d'une lame au carbone. Il remettent ensuite les bactéries en suspension dans de l'eau de mer stérile et ensementent des milieux gélosés avec cette eau.

Lorsque le support de fixation est maléable comme les filtres Nucléopore d'autres méthodes utilisées pour étudier la flore épiphyte d'algues peuvent être utilisées (FRY et HUMPHREY, 1978).

La méthode qui a été retenue, qui donne les meilleurs résultats est la méthode III. Elle a déjà été remarquée comme étant très efficace (FRY et HUMPHREY, 1978).

Le broyeur électrique est apparu trop violent, il hache le filtre en petits morceaux, mais semble mal détacher les bactéries qui y adhèrent et entraîne peut être une certaine mortalité. De même pour le broyeur manuel en verre qui oblige le filtre à se plier face contre face, ce qui peut gêner la bonne diffusion des cellules dans l'eau, une fois qu'elles sont décrochées.

Milieu 2216 E, d'OPPENHEIMER et ZOBELL 1952

- Polypeptone (bacto peptone Difco)	4 gr
- Extraits de levure	1 gr
- FePO <sub>4</sub>	0,1 gr
- Eau distillée	250 ml
- Eau de mer vieillie	750 ml

Pour le milieu solide, ajouter 15 gr d'Agar (Bacto Agar Difco)

Milieu de HUGH et LEIFSON 1953

- Polypeptone (bacto peptone Difco)	0,2 gr
- Phosphate bipotassique	0,03 gr
- Bleu de bromothymol	0,5 ml d'une solution à 1%
- Eau de mer vieillie	75 ml
- Eau distillée	25 ml

Ajuster le pH à 7,1

Ajouter 1,5% (poids/volume) d'Agar (Bacto Agar Difco)

Faire fondre le milieu à l'autoclave puis répartir en tube (4,5 ml) et stériliser.

Préparer et stériliser à part une solution de glucose à 10%. Rajouter stérilement 0,5 ml de cette solution dans chaque tube.

Après ensemencement par piqûre, recouvrir le milieu de paraffine stérile pour obtenir des conditions anaérobies.

Milieu liquide pour numération de bactéries sulfatoréductrices

(DELILLE et LAGARDE 1974)

- Lactate de Sodium	20 ml
- Extraits de levure	500 mg
- Acide ascorbique	100 mg
- Sulfate de Magnésium	2 gr
- Phosphate dipotassique	10 gr
- Eau de mer vieillie	750 ml
- Eau distillée	250 ml

Ajuster le pH à 7,2

Répartition en tube Ø 16 mm (9ml par tube).

Avant ensemencement avec 1 ml de solution, addition dans chaque tube d'un clou préalablement dégraissé.

Milieu de STARKEY modifié (POSTGATE 1966)

- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 gr
- NH <sub>4</sub> Cl	1 gr
- Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,5 gr
- Ca Cl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,06 gr
- Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,06 gr
- Lactate de Sodium à 60%	6 ml
- Extrait de levure	1 gr
- FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,1 gr
- Citrate de Sodium	0,3 gr
- Eau de mer vieillie	750 ml
- Eau distillée	250 ml

Ajuster le pH à 7,5, puis ajouter 15 gr d'Agar (bacto Agar Difco).

Milieu de Baars (CHANTEREAU 1980)

- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 gr
- NH <sub>4</sub> Cl	1 gr
- Ca SO <sub>4</sub>	1 gr
- Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2 gr
- Lactate de Sodium à 60%	5 gr
- Eau de mer vieillie	750 ml
- Eau distillée	250 ml

Ajuster le pH à 7 - 7,5

Ajouter 15 gr d'Agar.

Préparer à part une solution à 1% de Fe SO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O et stériliser à la vapeur fluante 60 minutes 3 jours de suite.

Ajouter 50 ml de cette solution à 1000 ml de milieu au moment de l'emploi.

Milieu d'isolement des bactéries oligotrophes AKAGI, 1977.

- Polypeptone	10 mg
- Proteose peptone	5 mg
- Bacto soytone	5 mg
- Sodium glycolate	5 mg
- Sodium malate	5 mg
- D-Mannitol	5 mg
- Sucrose	5 mg
- Citrate ferrique	0,5 mg
- Eau de mer vieillie sur charbon actif	1000 ml

Ajuster le pH à 8,3

Le milieu solide est remplacé par des filtres de verre (Whatman) déposés dans des boîtes de petri en verre (Ø 50 mm).

Ils sont passés au four à 450°C pendant une nuit pour détruire la matière organique, puis imbibés avec le milieu ci-dessus.

Les filtres nuclépores sont déposés sur ce milieu et incubés 3 semaines à 17°C. Ils sont ensuite déposés sur ce même milieu gélosé (15 gr.l<sup>-1</sup> d'Agar) pendant une semaine pour permettre la croissance des colonies.

Milieu semi riche de TORRELLA et MORITA 1981

- Extrait de levure	1,2 gr
- Trypticase	2,3 gr
- Citrate de sodium	0,3 gr
- Acide glutamique	0,3 gr
- Nitrate de sodium	0,05 gr
- Sulfate de fer	0,005 gr
- Eau de mer vieillie	1000 ml

Ajuster le pH à 7,8

Milieu solide : ajouter 15 gr.l<sup>-1</sup> d'Agar.

Milieu de jeûne NOVITSKY et MORITA 1978

- Na Cl	26 gr
- K Cl	0,8 gr
- Mg Cl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	5,6 gr
- Mg SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7,6 gr
- Eau distillée	1 litre

Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> concentration finale 0,05%

EAU DE MER ARTIFICIELLE LIMAN ET FLEMING 1939'

- Na Cl	23,4 gr
- Mg Cl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10,6 gr
- Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	3,91 gr
- Ca Cl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	2,17 gr
- K Cl	0,66 gr
- Na HCO <sub>3</sub>	0,19 gr
- K Br	0,096 gr
- H <sub>3</sub> bo <sub>3</sub>	0,026 gr
- Sr Cl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,04 gr
- Na F	0,003 gr
- Tampon Tris.	0,5 gr
- H Cl	3 ml
- Eau distillée	1000 ml
- KM <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 ml
- NH <sub>4</sub> Cl	0,5 ml

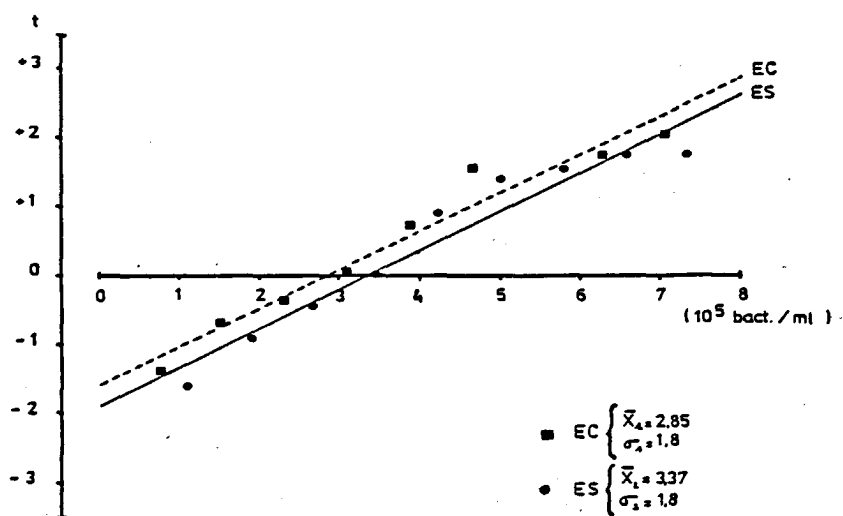
Ajuster le pH à 7

TEST DE NORMALITE

Distribution de la flore bactérienne totale en suspension  
au cours de l'année

L'estimation de normalité des distributions des bactéries en suspension dans l'eau de mer de surface (ES) et dans l'eau de mer des conduites (EC), a été effectuée par la méthode de la droite de Henri, après réduction de chaque valeur d'un facteur  $10^5$ .

TEST DE NORMALITE PAR LA DROITE DE HENRI



Les facteurs de corrélation de chacune de ces droites sont proches de 1, ils sont respectivement de 0,979 pour EC et de 0,967 pour ES. Il est possible d'admettre que les deux distributions suivent une loi normale de paramètres.

ES :  $\bar{X}_1 = 2,85$   $\sigma_1 = 1,8$

EC :  $\bar{X}_2 = 3,37$   $\sigma_2 = 1,8$



Les deux distributions sont comparées par comparaison des deux moyennes  $\bar{X}_1$  et  $\bar{X}_2$  avec  $\sigma_1$  et  $\sigma_2$  égaux

$$s^2 = \frac{(N_1-1) (\sigma_1)^2 + (N_2-1) (\sigma_2)^2}{N_1 + N_2 - 2}$$

$$s^2 = \frac{(50 - 1) (1,8)^2 + (50 - 1) (1,8)^2}{50 + 50 - 2} = 3,24$$

$$\frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{s \cdot \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 \times N_2}}}$$

suit une loi de Student à  $(N_1 + N_2 - 2)$  degrés de liberté

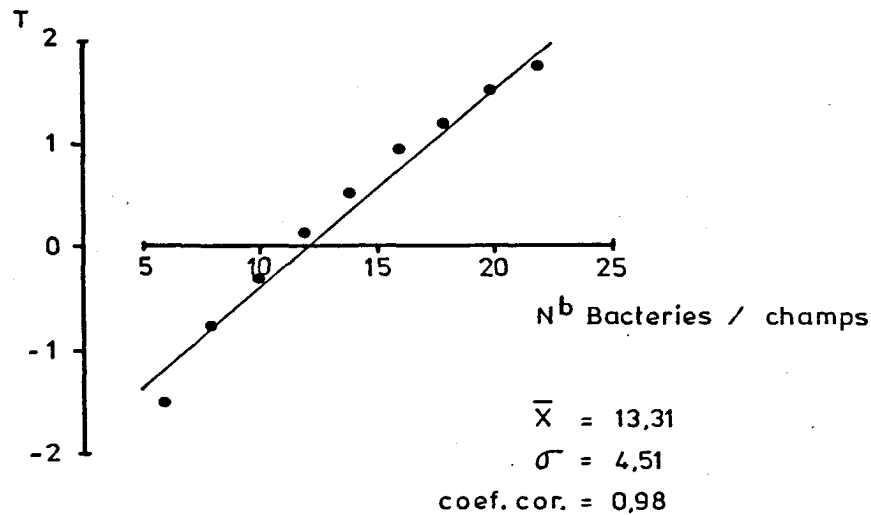
$$\frac{3,37 - 2,85}{1,8 \cdot \sqrt{\frac{50+50}{2 \cdot 500}}} = 1,44 \text{ et dL} = 98$$

Pour un pourcentage d'erreur de 5 %, l'hypothèse  $H_0$  (distributions identiques) est vraie ( $1,44 < 1,984$ ).

Distribution des bactéries à la surface d'un filtre Nuclepore  
après filtration

L'estimation de la normalité de la distribution des bactéries a été effectuée à partir des comptages de 200 champs microscopiques. L'échantillon testé correspond à une suspension cellulaire de concentration  $10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup> au temps 2 heures. Le test de normalité employé est celui de la droite de Henri.

TEST DE NORMALITÉ - DROITE DE HENRI -



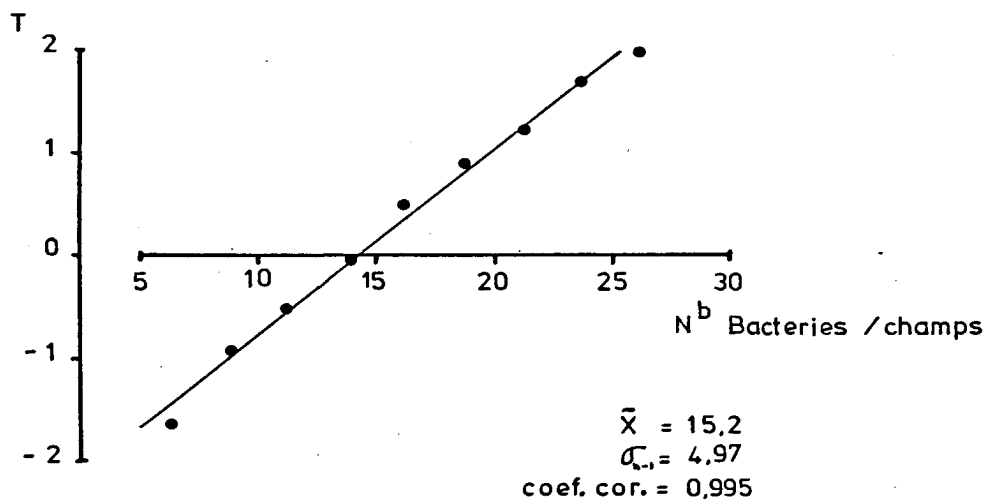
Le facteur de corrélation (0,98) de cette droite permet d'admettre l'hypothèse de la normalité de la distribution des bactéries à la surface du filtre. Cette hypothèse a été étendue à tous les autres échantillons filtrés.

Distribution des bactéries fixées à la surface d'une feuille d'aluminium

L'estimation de la normalité de la distribution des bactéries fixées à été effectuée à partir des comptages de 190 champs microscopiques. L'échantillon testé correspond à la suspension cellulaire de concentration  $10^5$  cellules.ml<sup>-1</sup>, simplement rincée et mise en contact durant 1 heure avec la surface.

Le test de normalité employé est celui de la droite de Henri.

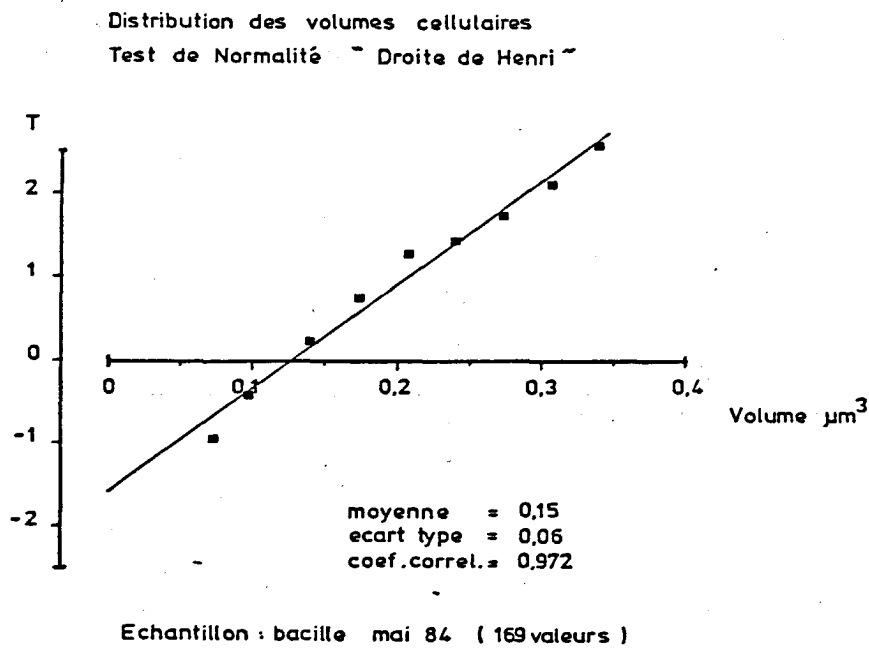
TEST DE NORMALITE - DROITE DE HENRI -



Le facteur de corrélation (0,995) de cette droite permet d'admettre l'hypothèse de la normalité de la distribution des bactéries fixées à la feuille d'aluminium. Cette hypothèse a été étendue à tous les autres échantillons.

Distribution des volumes cellulaires à l'intérieur d'un échantillon  
du milieu naturel

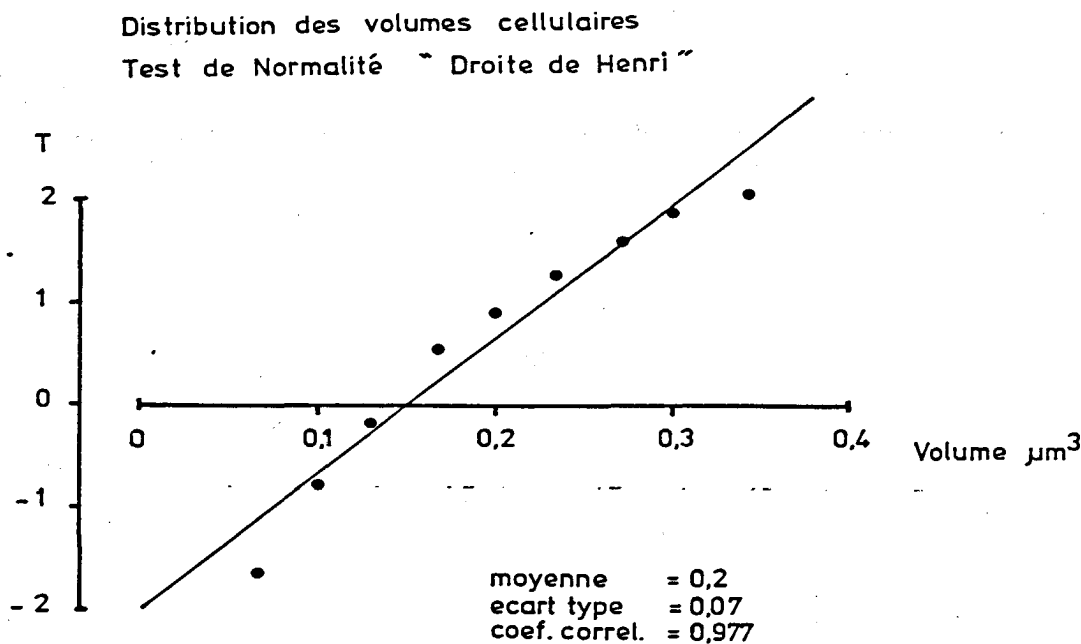
L'estimation de la normalité de la distribution des volumes cellulaires des bacilles correspondant au prélèvement du mois de mai 84, a été effectuée par la méthode de la droite de Henri.



Le facteur de corrélation de la droite obtenue étant proche de 1 (0,972), il est possible d'admettre que, pour un type cellulaire donné, la gamme des volumes est distribuée selon une loi Normale.

Distribution des volumes cellulaires de la souche 1J21 après 60 heures de jeûne

L'estimation de la normalité de la distribution des volumes cellulaires de la souche 1J21 a été effectuée sur l'échantillon des cellules ayant jeûné 60 heures. Elle a été effectuée par la méthode de la droite de Henri.



Echantillon : souche 1J21 après 60H de jeûne  
(229 valeurs)

Le facteur de corrélation de la droite obtenue est proche de 1 (0,977). Il est possible d'admettre que, pour cet échantillon, la gamme des volumes est distribuée selon une loi Normale.

CARACTERISTIQUES ECOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES SOUCHES  
BACTERIENNES ISOLEES DE L'EAU DE MER LE 9 AOUT 1983.

Nature des tests	Pourcentages de réponses positives aux différents tests			
	Eau de mer 6 h (20 souches)	Eau des tubes 6 h (20 souches)	Eau de mer 18 h (20 souches)	Eau des tubes 18 h (20 souches)
Gelatinase	20	75	40	75
NO <sub>3</sub> →NO <sub>2</sub>	5	55	10	75
β galactosidase	50	30	30	5
Saccharose	30	40	45	75
Arabinose	15	10	25	10
Mannose	65	55	30	75
Fructose	50	60	70	75
Glucose	65	70	90	75
Maltose	65	65	90	75
Amidon	20	30	30	60
Rhamnose	5	0	15	10
Galactose	60	60	65	70
Manitol	45	60	55	75
Sorbitol	0	0	5	0
Glycerol	15	50	30	70
Uréase	10	5	15	0
Tryptophanase	0	45	5	60
H <sub>2</sub> S	0	0	0	0
VP	0	5	0	10
Citrate	20	10	25	0
Oxydase	100	85	100	100
Catalase	90	100	90	90
Fermentation	40	60	60	75
Mobilité	85	100	70	100
Gram	0	0	0	0
Cocci	5	0	0	0
Spore	0	0	0	0
5°C	80	70	95	40
30°C	100	90	100	100
Na Cl 0‰	0	0	0	0

Indice Moyen d'activité	8,6	10,7	10,45	12,6
Indice de régularité fonctionnelle	0,53	0,57	0,56	0,48

CARACTERISTIQUES ECOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES SOUCHES  
BACTERIENNES ISOLEES SIMULTANEMENT DES 3 MATERIAUX APRES  
8 JOURS D'IMMERSION, EN NOVEMBRE 1984.

Nature des tests	Pourcentages de réponses positives aux différents tests		
	Filtres (17 souches)	Inox (22 souches)	Aluminium (21 souches)
Gélatinase	41,1	31,8	52,3
NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	35,2	9,09	23,8
β galactosidase	29,4	36,3	19
Saccharose	23,5	18,1	14,2
Arabinose	5,88	4,54	4,76
Mannose	35,2	9,09	14,2
Fructose	11,7	18,1	14,2
Glucose	35,2	22,7	23,8
Maltose	41,1	13,6	23,8
Amidon	29,4	9,09	23,8
Rhamnose	0	0	4,76
Galactose	35,2	13,6	14,2
Manitol	17,6	13,6	14,2
Sorbitol	0	0	0
Glycerol	11,7	4,54	9,52
Uréase	0	0	0
Tryptophanase	11,7	0	9,52
H <sub>2</sub> S	0	0	0
VP	17,6	27,2	14,2
Citrate	35,2	13,6	9,52
Oxydase	52,9	40,9	38
Catalase	82,3	81,8	38
Fermentation	41,1	9,09	23,8
Mobilité	64,7	45,4	42,8
Gram	0	0	0
Cocci	5,88	0	0
Spore	0	0	0
5°C	76,4	54,5	38
30°C	64,7	77,3	71,4
37°C	29,4	9	9,5
Na Cl 0‰	5,8	13,6	4,7
Lactose	0	0	4,7
Indices moyen d'activité	6,6	4,4	4,3
Indice de régularité fonctionnelle	0,6	0,44	0,51

CARACTERISTIQUES ECOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DES POPULATIONS  
BACTERIENNES ISOLEES DE L'EAU DE MER ET DECROCHEES DES FILTRES  
NUCLEPORE A DES TEMPS D'IMMERSION CROISSANTS.

Nature des tests	Pourcentages de réponses positives aux différents tests			
	Eau de mer (17 souches)	Filtre 1 jour (19 souches)	Filtre 8 jours (19 souches)	Filtre 15 jours (19 souches)
Gelatinase	52,9	26,3	42,1	31,5
NO <sub>3</sub> → NO <sub>2</sub>	41,1	47,3	0	21
β galactosidase	32,5	42,1	89,4	63,1
Saccharose	5,88	5,26	47,3	57,8
Arabinose	5,88	0	5,26	0
Mannose	58,8	31,5	47,3	36,8
Fructose	52,9	31,5	5,26	31,5
Glucose	58,8	31,5	21	36,8
Maltose	58,8	26,3	36,8	47,3
Amidon	52,9	26,3	15,7	42,1
Rhamnose	0	0	10,5	0
Galactose	58,8	26,3	15,7	31,5
Manitol	52,9	31,5	0	26,3
Sorbitol	0	0	0	5,26
Glycerol	58,8	21	0	15,7
Urease	5,88	0	0	0
Tryptophanase	41,1	41,5	0	21
H <sub>2</sub> S	0	0	0	0
VP	0	5,26	21	10,5
Citrate	0	0	5,26	10,5
Oxydase	70,5	15,7	78,9	63,1
Catalase	94,1	78,9	100	84,3
Fermentation	58,8	31,5	78,9	78,9
Mobilité	94,1	89,4	100	94,7
Gram	0	10,5	0	5,26
Cocci	0	0	0	5,26
Spore	0	0	0	0
5°C	82,3	47,3	94,7	36,8
30°C	88,2	100	100	94,7
37°C	29,4	89,4	94,7	78,9
Na Cl	11,7	10,5	0	10,5
Lactose	11,7	0	0	5,2

Indice moyen  
d'activité

9,5

6,1

7,2

8,1

Indice de  
régularité  
fonctionnelle

0,56

0,53

0,37

0,59



CARACTERISTIQUES ECOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES  
DES SOUCHES BACTERIENNES TESTEES (CHAPITRE 3 - § 1)

Nature des tests \ Souches	1J21	Alu 3	I 17	I 18	I 19
Gelatinase	-	-	+	+	+
NO <sub>3</sub> +NO <sub>2</sub>	-	+	-	-	-
β galactosidase	-	-	+	+	+
Saccharose	-	-	-	+	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Mannose	-	+	-	-	-
Fructose	-	+	-	+	-
Glucose	-	+	-	+	-
Maltose	-	+	-	-	-
Amidon	-	+	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Galactose	-	-	-	-	-
Manitol	-	+	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Glycerol	-	+	-	-	-
Uréase	-	-	-	-	-
Tryptophanase	-	+	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-
VP	-	-	+	+	-
Citrate	-	-	+	+	-
Oxydase	+	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Fermentation	-	+	-	-	-
Mobilité	+	+	+	+	+
Gram	-	-	-	-	-
Cocci	-	-	-	-	-
Spore	-	-	-	-	-
30°C	+	+	+	+	+
37°C	-	-	+	+	-
5°C	-	-	-	-	+
NaCl 0 ‰	-	-	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-

TEST MOUILLANT UTILISE

(Réf. : Union Carbide Wetting Test TAPPI, Juin 1970)

Un mélange de CELLOSOLVE et de FORMAMIDE doit être préparé dans les proportions décrites dans le tableau ci-joint.

Une petite quantité de "bleu Victoria Du Pont de Nemours" sera ajoutée pour augmenter la lisibilité.

La zone de 32 à 42 dyn/cm inclura la plupart des films traités commercialement. Cependant, la table est donnée jusqu'à 56 dyn/cm nécessaires pour des besoins particuliers (par exemple le collage).

Par précaution, il est nécessaire de renouveler les préparations tous les trois mois.

Comment préparer le test mouillant :

22 petits flacons d'environ 100 cm<sup>3</sup> sont à préparer pour le test complet, chacun contenant son mélange spécifique comme décrit dans le tableau.

TEST :

- imbiber un coton hydrophile de la solution 36 dyn/cm
- étaler la solution sur toute la largeur du film

La solution peut réagir de deux manières :

- elle reste établie ..... bonne adhérence
- elle se casse, se rétracte ..... mauvaise adhérence

Si le test est POSITIF, procéder de même avec un flacon de valeur supérieure et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il devienne négatif. Le dernier test positif sera la valeur d'adhérence du matériau.

Si le test est NEGATIF, procéder de même avec un flacon de valeur inférieure et ainsi de suite jusqu'à ce qu'il devienne positif. Le premier test positif sera la valeur d'adhérence du matériau.

ANNEXE VII (suite)

Note 1 - Le test est considéré comme positif lorsque la solution ne présente aucun retrait pendant plus de 2 secondes.

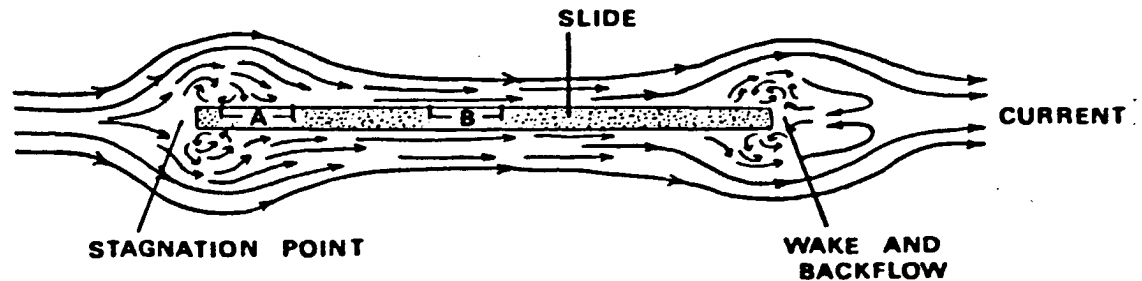
Note 2 - Il est très important de ne pas mélanger les solutions et de remplacer le coton hydrophile après chaque test dans chaque valeur.

FORMAMIDE	CELLOSOLVE	NIVEAU EN DYN/CM
0 %	100,0 %	30 DYN/cm
2,5 %	97,5 %	31 DYN/cm
10,5 %	89,5 %	32 DYN/cm
19,0 %	81,0 %	33 DYN/cm
26,5 %	73,5 %	34 DYN/cm
35,0 %	65,0 %	35 DYN/cm
42,5 %	57,5 %	36 DYN/cm
48,5 %	51,5 %	37 DYN/cm
54,0 %	46,0 %	38 DYN/cm
59,0 %	41,0 %	39 DYN/cm
63,5 %	36,5 %	40 DYN/cm
67,5 %	32,5 %	41 DYN/cm
71,5 %	28,5 %	42 DYN/cm
74,7 %	25,3 %	43 DYN/cm
78,0 %	22,0 %	44 DYN/cm
80,3 %	19,7 %	45 DYN/cm
83,0 %	17,0 %	46 DYN/cm
87,0 %	13,0 %	48 DYN/cm
90,7 %	9,3 %	50 DYN/cm
93,7 %	6,3 %	52 DYN/cm
96,5 %	3,5 %	54 DYN/cm
99,0 %	1,0 %	56 DYN/cm

FORMAMIDE : H - CO - NH<sub>2</sub>

CELLOSOLVE : C<sub>2</sub> H<sub>5</sub> O - CH<sub>2</sub> Ether monoéthylique de l'éthyléneglycol

ANNEXE VIII



Représentation schématique des mouvements d'un liquide visqueux autour d'une lame de verre orientée parallèlement au courant (MUNTEANU et MALY, 1981).

ANNEXE IX

Characteristic	Species	Note
1. Grow only at the first cultivation on the sterile water but cannot be recultivated.	Bacteria of unusual morphology.	Lapteva (40) from the Rybinsk reservoir.
2. At the first cultivation grow on poor media and do not grow on rich ones, but can be recultivated on the rich media.	Some species from <i>Pseudomonas</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Photobacterium</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Aeromonas</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus roseus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>M. varians</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Arthrobacter</i> .	Lapteva (40) from a number of freshwater lakes; Mallory et al (43) from the sea gulf Chezapek.
3. Bacteria isolated or cultivated on special poor media.	Species of <i>Hyphomicrobium</i> , <i>Caulobacter</i> , <i>Microcycclus</i> , <i>Leptothrix</i> , <i>Ochrobium</i> , <i>Metallogenium</i> , <i>Pasteuria</i> , etc.	Hirsch (27-29), Dubinina & Kuznetsov (16, 17), Hirsh & Pankratz (31), Belajev (6), Staley (63).
4. Detected in natural water reservoirs, only under electron microscope; could not be cultivated under laboratory conditions.	Prosthecate bacteria; a number of bacteria with gaseous vacuoles.	Several types of bacteria described by Caldwell & Tiedje (11) from hypolimnion of lake 224 in Canada; Dubinina (16) in Kareliya; Lapteva (40) in Rybinsk reservoir; Hirsch & Pankratz (31).

Caractéristiques générales des bactéries oligotrophes (KUZNETSOV et al., 1979).