

51340

N600-B1A-C

Contrat IFREMER n° 930096 93 2435 403

Juin 1994

**CONTRIBUTION À L'ETUDE DE LA QUALITE
BACTERIOLOGIQUE DE LA ZONE MYTILICOLE
DU LAZARET (La Seyne-sur-Mer)**

IFREMER Bibliotheque de BREST



0EL05054

Vincent TALBOT

Christine MOLINA

Direction scientifique : Micheline BIANCHI

.....
Laboratoire de Microbiologie Marine CNRS UPR 223
Case 907 Campus de Luminy 13288 MARSEILLE Cedex 9
.....

AVANT PROPOS

Les sites naturels côtiers constitués par des lagunes ou fjords, baies peu profondes et bien abritées sont propices aux activités aquacoles. En effet, ces dernières requièrent des aires marines faciles d'accès et présentant un abri fiable pour l'installation de divers systèmes productifs (tables, cages,...). Ces caractéristiques (mince lame d'eau et faible ouverture sur le large), qui permettent l'installation des fermes aquacoles, rendent ces sites particulièrement sensibles aux perturbations et pollutions les plus diverses.

Les micro-organismes représentent un facteur de risque à plusieurs niveaux, qui tous affectent la qualité de l'environnement et des produits d'élevage. Les études sur les risques d'origine microbienne ne sont pas abondantes et concernent essentiellement l'apport de bactéries pathogènes (et éventuellement leur survie), le risque d'anoxie dû à une prolifération excessive en réponse à un accroissement de la richesse trophique de l'environnement, et effleurent les risques liés aux apports massifs d'antibiotiques.

Seule l'approche écologique, qui tient compte de l'ensemble des sources de perturbations sur un environnement et la diversité des réponses de ce dernier, peut permettre la compréhension et la modélisation du fonctionnement d'un écosystème, et donc d'optimiser sa gestion. Malheureusement, la tradition de surveillance des produits de consommation est d'origine vétérinaire, d'où, même dans le milieu aquatique, des mesures focalisées sur l'état sanitaire des animaux et un désintéressement pour l'état du milieu environnemental.

Si la pression de sélection, résultant des modifications du milieu naturel induites par les systèmes d'aquaculture *sensu lato*, sur la composition des communautés bactériennes est souvent évoquée, les travaux y faisant réellement référence sont quasiment inexistantes. Or, l'évolution de la diversité spécifique des microflore et la mise en évidence des espèces bactériennes dominantes dans l'eau et le sédiment, constituent la base de l'estimation des dangers encourus à la fois par les élevages et le réceptacle environnemental. En effet, toute communauté paucispécifique, particulièrement si les espèces dominantes sont pathogènes (ou susceptibles de l'être), montre un état de déséquilibre dû aux conditions externes.

Par ailleurs, les méthodes d'identification des espèces soit pathogènes, soit indicatrices de pollution bactérienne, sont depuis peu en pleine évolution avec la relative simplification des techniques moléculaires (séquençages des ARN avec PCR préalable). L'avenir est à la construction et à l'utilisation en routine de sondes nucléiques ajustées à la reconnaissance et au dénombrement des bactéries jugées dangereuses pour l'environnement et/ou les consommateurs. Cependant, dans l'état actuel des techniques de biologie moléculaire, il est encore indispensable de passer par l'étape préalable de l'isolement et de

l'identification des bactéries. Cette phase préliminaire nécessite une meilleure appréciation de la diversité des espèces bactériennes effectivement présentes et donc une collaboration entre microbiologie conventionnelle et biomoléculaire.

La coopération initiée dans ce travail entre des chercheurs de l'IFREMER et des chercheurs du CNRS a pour but de développer l'emploi de ces techniques nouvelles dans une thématique regroupant des intérêts aquacoles et des préoccupations strictement écologiques.

La baie du Lazaret, située en rade de Toulon, accueille des activités d'aquaculture et de mytiliculture auxquelles viennent s'ajouter diverses industries cotières, une population élevée, des activités portuaires civiles et militaires qui tendent à fragiliser l'équilibre naturel du milieu.

De nombreuses études font état de la qualité chimique et biologique en baie du Lazaret. Ce présent rapport s'intéresse spécifiquement au niveau de la qualité bactériologique à travers une synthèse bibliographique et une étude de la composition des communautés bactériennes de l'eau et du sédiment. Ce rapport fait l'objet d'un contrat IFREMER n° 930096.

SOMMAIRE

AVANT PROPOS

I ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA FLORE BACTERIENNE DE LA ZONE MYTILICOLE DU LAZARET (La Seyne-sur-Mer)

PRESENTATION GENERALE DE LA BAIE DU LAZARET 1

Caractères généraux

Activités mytilicoles et aquacoles en baie du Lazaret

RECENSEMENT DES DIFFERENTES DONNEES
SUR LA FLORE BACTERIENNE EN BAIE DU LAZARET 4

Les suivis réguliers

Les études vis à vis de la qualité des eaux de baignade

Les études ponctuelles

LES BACTERIES DANS L'EAU DE MER ET LE SEDIMENT 8

Devenir physiologique

Dispersion physique

Importance de l'écosystème sédimentaire

INVENTAIRE DES SOURCES POSSIBLES DE CONTAMINANTS 11

Les cours d'eau

Les eaux pluviales

Les eaux usées

Autres sources

QUALITE BACTERIOLOGIQUE DANS LA BAIE DU LAZARET 13

Qualité bactériologique des moules

Qualité bactériologique de l'eau

Qualité bactériologique du sédiment

CONCLUSIONS ET PROSPECTIVES 20

II - REPONSES DES COMMUNAUTES BACTERIENNES DU SEDIMENT MARIN COTIER A LA PERTURBATION CREEE PAR LES SYSTEMES D'AQUACULTURE DU SITE DU LAZARET

INTRODUCTION GENERALE.....	24
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	25
1 - Etat d'organisation d'une communauté bactérienne naturelle	25
1.1 - Le milieu marin et les différents habitats	25
1.2 - La sélection naturelle.....	25
1.3 - Origine et diversité des populations bactériennes.....	26
2 - Réponse d'une communauté bactérienne à une perturbation: diminution de la diversité.....	26
2.1- Variation de la diversité: théorie.....	26
2.2 - Facteurs environnementaux affectant la présence des microorganismes.....	27
2.3- Exemples de variation de diversité.....	28
3 - Les moyens d'études.....	29
3.1 - Abondance des bactéries	29
3.2 - Isolement de souches et analyse phénotypique et génotypique	30
4 - Application à l'environnement et à l'aquaculture	31
4.1 - Les microorganismes comme indicateurs de perturbations environnementales.....	31
4.2 - Un exemple: l'aquaculture	31
MATERIELS ET METHODES.....	34
1 - Introduction: la baie du LAZARET, zone d'aquaculture.....	34
2 - Les campagnes et les stations de prélèvement.....	36
3 - Les échantillons.....	36
4.1 - Comptages directs en épifluorescence	36
4.2 - Mise en culture et comptages sur boîtes	39
5 - La collection bactérienne.....	40
6 - Analyse des caractères morphologiques et physiologiques.....	40
7 - Analyse des caractères biochimiques.....	41
8 - Résistances aux antibiotiques	41
8.1 - Les antibiotiques testés	41
8.2 - Mise en évidence des résistances.....	42
9 - L'analyse des données.....	42
10 - Séquençage et identification	43
RESULTATS	44
1 - Dénombrement des bactéries totales et des bactéries cultivables.....	44
2 - Les coliformes	45
3 - Les vibrios	47
4 - Les résultats taxonomiques.....	47
5 - Les résistances aux antibiotiques	50
6 - Une nouvelle espèce de Bacillus.....	50
DISCUSSION.....	51
CONCLUSION.....	55
ANNEXES	57
BIBLIOGRAPHIE	65

I

**ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE DE LA FLORE BACTERIENNE
DE LA ZONE MYTILICOLE DU LAZARET
(La Seyne-sur-Mer)**

PRESENTATION GENERALE DE LA BAIE DU LAZARET

CARACTERES GENERAUX

Présentation de la baie (fig.1)

La baie du Lazaret fait partie de la rade de Toulon, abri privilégié dans lequel cohabitent des activités multiples engendrant des conflits d'usage.

La Petite Rade de Toulon est ceinturée par 2 villes : Toulon (170.000 habitants) et la Seyne-sur-Mer (40.000 habitants).

La baie du Lazaret est délimitée :

- à l'Ouest : par la pointe de Balaguier et la corniche Tamaris où l'on trouve deux ports et des mouillages,

- au sud : par le cordon sableux de l'isthme des Sablettes où l'on note la présence de digues et du port de Saint-Elme,

- à l'Est : par la presqu'île de Saint-Mandrier, zone urbanisée comprenant des infrastructures portuaires civiles et militaires.

Sa superficie est d'environ 2 Km² et sa profondeur est dans l'ensemble faible (6 mètres). La baie du Lazaret apparait comme un site relativement cloisonné avec peu d'échange avec le large (simple communication par une passe au sud de la Grande Jetée). Cette particularité peut s'avérer jouer un rôle important lors d'une possible pollution.

La baie est située dans une région privilégiée vis à vis du vent. Elle est soumise au "Mistral", vent dominant de Ouest-Nord-Ouest légèrement atténué par la colline de Tamaris, soufflant 140 jours / an, ainsi qu'au "Marin", vent d'Est-Sud-Est soufflant en moyenne 45 jours / an .

Les courants en rade de Toulon présentent une grande complexité, ils ont fait l'objet de peu de mesures. On sait qu'il sont principalement liés aux vents et à la topographie du littoral. Par vent d'Ouest (mistral), l'eau de surface est entraînée vers l'extérieur de la baie puis de la rade. Cette sortie serait compensée par une rentrée d'eau en profondeur provenant de la partie Nord de la rade. Par vent d'Est, la houle du large pourrait rentrer dans la baie par la passe au sud de la grande jetée.

Les principales activités qui sont représentées dans la baie du Lazaret concernent la réparation navale, le dépôt de produits pétroliers, des ports de plaisance et l'aquaculture.

Activités mytilicoles et aquacoles en baie du Lazaret

Une activité aquacole de grossissement de loups s'est mise en place récemment et paraît donner des résultats satisfaisants en termes de croissance, une activité à prendre en compte pour son influence certaine sur la flore bactérienne notamment au niveau de la connaissance des apports en antibiotiques et de la qualité des apports nutritionnels destinés aux poissons.

La baie du Lazaret est aussi traditionnellement une zone de production mytilicole, la plus importante du Var, les moules y sont cultivées depuis la fin du 19^e siècle. Autrefois importante (1400 tonnes en 1962), la production a regressé de façon constante pour n'atteindre que 75 tonnes en 1982; elle s'est stabilisée ces dernières années à environ 100 tonnes / an.



Figure 1 : La rade de Toulon et la baie du Lazaret

RECENSEMENT DES DIFFERENTES DONNEES SUR LA FLORE BACTERIENNE EN BAIE DU LAZARET

Des problèmes de salubrité de coquillage se sont posés dès le début du siècle en baie du Lazaret. En 1927, la rade de Toulon est classée "zone insalubre" pour la production mytilicole exceptée la baie du Lazaret qui reste encore officiellement "salubre".

Les activités maritimes, portuaires et militaires allant croissantes, une épidémie de typhoïde s'étant déclarée, l'ensemble de la rade, y compris la baie du Lazaret, est déclaré "zone insalubre" en 1949. Cette décision oblige à soumettre les coquillages à une épuration avant leur commercialisation.

Depuis l'institution d'un contrôle sanitaire des coquillages en 1951, la baie du Lazaret a fait l'objet d'un suivi institutionnel et d'études conjoncturelles, menés par l'OSTPM, puis l'ISTPM et enfin l'IFREMER.

Différents rapports seront alors établis, traitant de la qualité bactériologique, phytoplanctonique et chimique (hydrocarbures, PCB, métaux lourds) en rade de Toulon. Seulement une partie de ces rapports est consacrée à la qualité bactériologique en baie du Lazaret reprenant pour la plupart des cas les résultats fournis par le REMI (le REseau Microbiologique).

Des études ponctuelles (le plus souvent des rapports de stage d'étudiants), indépendantes du REMI ont été menées mais leur interprétation peut apparaître parfois délicate au regard des normes (nombre de sorties réduit, non respect des fréquences définies par les textes).

90 % des rapports s'intéressent à la qualité bactériologique des eaux de la baie du Lazaret à travers un intégrateur, la moule, qui peut filtrer jusqu'à 30 litres d'eau par jour, les analyses bactériologiques des eaux et sédiments étant négligées.

LES SUIVIS REGULIERS

Les suivis réguliers sont actuellement assurés par l'IFREMER et reposent sur des réseaux de mesures inscrits dans des programmes nationaux :

- Le Réseau National d'Observations (RNO)

Le R.N.O. a été mis en place en 1974 dans le but d'évaluer les niveaux et les tendances des paramètres généraux de la qualité du milieu marin. Les mesures portent sur les eaux, les sédiments et les coquillages. Les fréquences de prélèvement sont en général de 4 par an ce qui peut s'avérer relativement faible pour la baie du Lazaret. Aucune mesure de la qualité bactériologique n'est faite en baie du Lazaret.

- Le REseau PHYtoplanctonique (REPHY)

Le REPHY se veut préventif, son objectif premier est la protection de la santé publique par le contrôle de la qualité phytoplanctonique des eaux, contrôle qui peut s'étendre sur les moules en cas de détection d'espèces toxiques dans l'eau.

- Le REseau MIcrobiologique (REMI)

L'objectif du REMI est de permettre une appréciation globale de la qualité microbiologique du milieu littoral, avec un renforcement de la surveillance dans les zones conchylicoles. Il a non seulement un rôle de surveillance mais aussi un rôle d'intervention avec comme objectif la protection de la santé publique en garantissant la salubrité des coquillages. Les mesures ne sont faites que sur les moules, organisme filtreur donc accumulateur de bactéries.

Les mesures sont faites sur des germes tests, rarement pathogènes mais constituant un révélateur d'une pollution d'origine fécale. Leur présence entraîne la présomption de contamination par des microbes ou des virus dangereux que l'on ne mesure pas directement.

Dans le cadre d'une surveillance, les germes étudiés sont les coliformes totaux et les coliformes fécaux à raison d'une fois par mois au niveaux de trois stations : Lazaret, Lazaret 43 et Balaguier.

Dans le cas de périodes très sensibles liées à des conditions météorologiques défavorables, à l'affluence touristique, ou aux pratiques agricoles, les prélèvements deviennent hebdomadaires et la détection bactériologique dans les moules s'étend aux salmonelles et vibrios.

LES ETUDES VIS A VIS DE LA QUALITE DES EAUX DE BAINNADE

Les études pour la qualité des eaux de baignade sont assurées par la D.D.A.S.S. et la D.D.E.. Les prélèvements sont analysés par le Laboratoire Municipal de Toulon pendant

seulement une partie de l'année : une fois par semaine en juillet et août et tous les 15 jours en juin et en septembre. La recherche des coliformes fécaux et streptocoques fécaux ne se fait qu'au niveau de la plage des Balaguier et de la corniche de Tamaris.

LES ETUDES PONCTUELLES

Les études ponctuelles sont peu nombreuses, le plus souvent elles portent sur un contrôle de la qualité chimique en baie du Lazaret (ex : étude par l'IFREMER en 1988 et 1990 de l'impact de polluants chimiques sur le poisson (loups)).

De "nombreux" rapports (Console et col., 1993; Ansart, 1989; Mistre, 1988; Wolff, 1991) traitant du problème bactériologique en baie du Lazaret sont disponibles, mais ils se limitent à une étude bibliographique en reprenant le plus souvent les résultats du REMI.

Les réelles études ponctuelles traitant de la qualité bactériologique sont rares, citons :

- le rapport IFREMER de Arnal et Romana, 1990, "Qualité du milieu marin et effet de la remise en suspension des sédiments sur un site conchylicole méditerranéen - Baie du Lazaret "

Rare rapport qui ne se consacre pas qu'à l'étude des moules mais aussi à celles de l'eau et du sédiment. L'étude bactériologique a été assurée par Y. Martin et J.L. Bonnefont (Fondation Océanographique Ricard).

Les études ont été menées sur une dizaine de points en baie du Lazaret avant et pendant un coup de vent d'Est pour définir l'influence de ce dernier sur une éventuelle augmentation de la pollution (remise en suspension du sédiment, apports extérieurs à la baie).

- le rapport de stage réalisé par M.J. Borelli "Approche spatiale de la contamination bactérienne de la rade de Toulon", 1991. L'étude porte sur 11 points de prélèvements dans la rade de Toulon dont 4 en baie du Lazaret, les recherches de coliformes totaux et fécaux ainsi que des streptocoques fécaux ne sont effectuées que sur les moules.

- le rapport de stage réalisé par T. Cuadrado "Etude de la contamination fécale dans la baie du Lazaret", 1993. 15 points de prélèvement sont effectués en baie du Lazaret avec recherche des coliformes fécaux dans les moules.

- le rapport IFREMER, R. Loarer et al., 1992, "Impact de l'émissaire de Toulon-Est sur les sédiments de la grande rade". L'étude ne porte pas directement sur la baie du Lazaret mais sur la qualité bactériologique des sédiments aux alentours de l'émissaire de

Toulon-Est qui pourrait être une possible source de pollution en baie du Lazaret lors de coup de vent d'Est.

- le rapport de Mr Durand sur la qualité bactériologique des eaux de la baie du Lazaret, rapport que nous n'avons pu nous procurer.

- le rapport de D.E.A. de C. Molina qui suit cette synthèse bibliographique réalisé au sein du Laboratoire de Microbiologie Marine (CNRS, UPR 223), "Réponses des communautés bactériennes du sédiment marin cotier à la perturbation créée par des systèmes d'aquaculture du site du Lazaret (La Seyne sur Mer)".

LES BACTERIES DANS L'EAU DE MER ET LE SEDIMENT

Ce chapitre ne prétend pas traiter du vaste domaine qu'occupe les bactéries en milieu océanique mais rappelle brièvement le **devenir des bactéries allochtones (entériques, pathogènes) dans l'eau de mer et le sédiment** afin de mieux connaître l'influence de celles-ci dans une possible pollution ou contamination marine.

Les bactéries allochtones à l'écosystème océanique sont d'origines diverses et variées (voir le chapitre "Inventaire des sources possibles de contaminants"). Elles sont soumises d'une part à des phénomènes de dispersion physique et de sédimentation et d'autre part au pouvoir auto-épurateur de l'eau et à de possibles évolutions biologiques (adaptation, mutation).

DEVENIR PHYSIOLOGIQUE

En 1974, un congrès international : "Discharge of Sewage from Sea Outfall" (Gameson, 1974) faisait le point des connaissances dans ce domaine et mettait en évidence le rôle des différents paramètres sur la mortalité bactérienne : lumière, température, nutriments, salinité et prédation étaient les principaux facteurs invoqués. Le consensus général qui se dégageait alors était que la mer apparaissait comme un milieu défavorable, voir même hostile aux bactéries entériques et que, dans la majorité des cas, leur mortalité était très rapide.

Les travaux réalisés ces quinze dernières années ont changé ce concept et mis en évidence que le pouvoir auto-épurateur de la mer était souvent limité. L'apport de nouvelles méthodes d'études notamment sur la physiologie bactérienne ou sur l'utilisation d'outils performants (microscope à balayage, ...) a fait évoluer ces théories. On a mis en évidence que des bactéries entériques étaient capables de s'adapter à un milieu très différent de celui du tube digestif. Un des facteurs majeurs de stress et donc de mortalité des bactéries allochtones en milieu marin est le choc osmotique induit par la salinité. Il a été montré qu'une forte partie des bactéries entériques présentaient une halotolérance intrinsèque forte allant jusqu'à 20 g/l de NaCl (Chaussepied et Le Corre, 1991). Il persisterait ainsi dans l'eau de mer des formes viables dont on ignore encore le pouvoir pathogène (Roszak et Colwell, 1987).

Les méthodes classiques de détection des bactéries reposent sur leur capacité à se développer sur différents milieux de culture, cette flore cultivable ne représente que 1/100 à 1/10000 de la flore totale observée par microscopie à épifluorescence. Ces bactéries non détectables peuvent être dans un état de dormance et rentrer dans un état de reviviscence lorsque

l'environnement devient plus favorable (ex. : milieu riche en matière organique au niveau des parc d'aquaculture par le rejet de fécès, arrivée des bactéries dans le sédiment), la pathogénicité potentielle du milieu étant alors sous-estimée.

DISPERSION PHYSIQUE

Il est important de pouvoir quantifier les phénomènes de dispersion physique des bactéries dans la mer afin de mieux définir les sources de contaminations. Les bactéries entériques rejetées à la mer ont comme principale origine les rejets urbains au niveau des stations d'épuration.

La ville de Toulon voit ces eaux usées rejetées au niveau de la station d'épuration de Sainte Marguerite à l'Est de la rade de Toulon, son éloignement de la Baie du Lazaret en fait une source de contamination qui est négligée, sa possible contribution à une pollution est parfaitement inconnu.

Les bactéries rejetées sont plutôt sous forme libre ou au moins en amas inférieurs à 3 μm (50 % dans les eaux brutes, 70 à 80 % dans les eaux traitées) ce qui suggère une vitesse de sédimentation relativement lente et une dissémination lointaine possible.

IMPORTANCE DE L'ECOSYSTEME SEDIMENTAIRE

La baie du Lazaret étant peu profonde (3 à 6 mètres), la sédimentation peut y être rapide et importante et la remise en suspension peut avoir un rôle direct dans la contamination bactérienne de l'eau surnageante.

Les concentrations bactériennes les plus élevées sont mesurées dans le sédiment superficiel, néanmoins on observe la persistance de bactéries fécales en milieu anoxique jusqu'à 10 cm de profondeur.

Dans les sédiments, la flore contaminante va subir des évolutions et des remaniements dus aux conditions d'environnement et aux compétitions de flore. Il faut insister sur le fait que les entérobactéries et certaines bactéries pathogènes peuvent trouver dans cet environnement des éléments favorables à leur survie : richesse en matière organique et éléments nutritifs assimilables, présence d'osmoprotecteurs qui permettent à la bactérie de s'adapter aux conditions marines (Gauthier et le Rudulier, 1990).

Le sédiment peut alors être considéré comme un réservoir de bactéries; les temps de survie y sont très élevés et les T90 (temps nécessaire pour que 90 % des bactéries meurent) peuvent atteindre 40 jours (Le Guyader et col., 1990). De plus, durant leur séjour dans le sédiment, les bactéries peuvent acquérir des caractères qu'elles n'avaient pas auparavant. Ces

modifications concernent par exemple le renforcement de l'halotolérance, la sélection d'espèces résistantes aux métaux lourds, aux antibiotiques, aux contaminants organiques...

Il est donc important de pouvoir faire une étude quantitative et qualitative des bactéries sédimentaires qui jouent un rôle fondamentale dans les contaminations lors de la remise en suspension du sédiment.

INVENTAIRE DES SOURCES POSSIBLES DE CONTAMINANTS

Il apparaît important de définir l'origine possible d'un contaminant afin de pouvoir éventuellement pallier à une pollution.

Sont recensées dans ce chapitre les différentes sources de contaminants, malheureusement sans pouvoir exactement définir leur contribution quantitative et qualitative à l'insalubrité de la baie du Lazaret.

Les cours d'eau

Le seul écoulement naturel connu est la petite rivière du Lazaret, longue de 15 km, qui débouche au Sud-Ouest de la baie. Deux autres rivières se jetant dans la petite rade au nord peuvent être citées : le Las-Rivière Neuve et l'Eygoutier.

Les eaux pluviales

Les rejets d'eaux pluviales, dont la charge revient aux services municipaux de la Seyne sur Mer, sont à considérer avec attention. Le problème est posé de façon épisodique mais régulière. En effet, en période d'orages, après lessivage des chaussées ou des vallons, des écoulements d'eaux polluées se déversent directement dans la baie. Quatre collecteurs recueillent les eaux de voiries des lotissements drainés et débouchent dans la baie du Lazaret. Aucune étude ne permet d'évaluer l'impact de ces rejets dont la contribution à l'insalubrité de la zone n'est pas négligeable.

Les eaux usées

Deux collecteurs recueillent les eaux usées de la région toulonnaise, l'un débouche au niveau du Cap Sicié, l'autre au large de la pointe Sainte Marguerite (station d'épuration du Pouverel). Le rejet par l'émissaire de Sainte Marguerite d'eaux usées épurées peut être considéré comme une source possible de contaminants lors d'un coup de vent d'Est. Cette station d'épuration est de type physico-chimique et avoue un rendement relativement faible pour les germes-tests de l'ordre de 20 à 50 %. Des flux importants de bactéries d'origine fécale sont alors rejetés, les salmonelles sont fréquemment décelées dans les effluents bruts mais aussi après épuration (Dupray et col.). Les concentrations peuvent paraître faibles en comparaison de celles des coliformes et streptocoques fécaux, mais on ne peut négliger cette fraction de la flore, compte tenu de son importance pour la santé publique (via la consommation de coquillages pour les problèmes de rejets en mer).

Il est à noter que quatre stations de refoulement du réseau d'assainissement sont situées dans un environnement proche des parcs à moules : un aux Sablottes, deux sur la corniche Georges Pompidou et un à Balaguier. Malgré des systèmes de sécurité, des risques de surverse sont à craindre. Ces opérations de "by-passage", bien qu'occasionnelles, représentent des bouffées de contaminations très importantes vis-à-vis du milieu récepteur.

Des rejets chroniques d'origine industrielle sont aussi à déplorer, citons en exemple :

- les rejets diffus de produits non identifiés issus du démantèlement des chantiers navals de la Normed à la Seyne.
- les rejets sans traitement en rade de Brégaillon des eaux de lavage des bennes de transport des ordures ménagères de Toulon.

Il existe aussi le problème des rejets des bâtiments de guerre ancrés dans le port de Toulon qui sont difficilement canalisables et dont le devenir est couvert par le secret militaire.

Une pollution maritime civile est aussi à déplorer. La Petite Rade accueille en effet plusieurs ports de plaisance. Les bateaux demeurent en concentration importante et le dépotage à quai dans les installations appropriées n'est souvent pas respecté. C'est la politique du "tout à la mer par dessus bord" qui prédomine. Ces déversements (peu importants mais multiples), représentent un risque sanitaire difficilement évaluable et contrôlable.

Autres sources

Comme sources internes, la remise en suspension éventuelle des sédiments contaminés et le relargage dans la masse d'eau des polluants associés constituent une origine potentielle non négligeable. Deux principales causes peuvent être évoquées dans la mobilisation des sédiments superficiels : les travaux d'aménagement du littoral et des conditions météorologiques particulières dues aux vents.

Il est à noter la coexistence d'élevage de poissons (Loups, *Dicentrarchus labrax*) et de parc à moules dans la baie du Lazaret. Les techniques d'élevage sont différentes entre l'aquaculture et la mytiliculture, l'apport nutritif est endogène pour la moule, exogène pour le loup. Les différents apports (antibiotiques, granules alimentaires,...), rejetés aux niveaux des cages à poissons, peuvent avoir un effet direct ou indirect sur la flore bactérienne ou sur les moules.

QUALITE BACTERIOLOGIQUE DANS LA BAIE DU LAZARET

Nous discuterons dans ce chapitre de la qualité bactériologique en baie du Lazaret au niveau de l'eau, du sédiment et des moules. Les principales données recueillies concernent les moules qui sont considérées comme un intégrateur.

Qualité bactériologique des moules

Suivis réguliers

La qualité sanitaire du milieu marin en baie du Lazaret est assurée par l'Ifremer dans le cadre du REMI. Les concentrations en germes bactériens témoins de contamination fécale sont systématiquement recherchées dans les moules sur parc. Les points de prélèvement faits au niveau de la baie sont observés de façon très régulière et permettent de disposer d'une masse importante de résultats.

* Les coliformes fécaux

Il existe des normes de référence définies par l'Arrêté du 12/10/1976 : pour qu'il y ait salubrité, il convient que sur 26 prélèvements de coquillages, réalisés sur 12 mois consécutifs, il soit obtenu :

	en %
- 21 mesures < 300 coliformes fécaux / 100 ml de chair de moule.....	80,7 %
- 3 mesures comprises entre 301 et 1000 CF / 100 ml.....	11,5 %
- 2 mesures comprises entre 1001 et 3000 CF / 100 ml.....	7,7 %
- aucune mesure supérieure à 3000 CF / 100 ml.....	0,0 %

Les différentes teneurs en coliformes fécaux rencontrées dans les moules de la baie du Lazaret entre 1979 et 1992 sont résumées dans le tableau 1 et la figure 2.

	< 300	>300 < 1000	> 1000 < 3000	> 3000
Arrêté du 12.10.1976	80,77 %	11,54 %	7,69 %	0 %
1979	31,25	31,25	6,25	31,25
1980	76,47	11,76	5,88	5,88
1981	78,57	14,28	0	7,14
1982	60	30	10	0
1983	66,66	16,66	0	16,66
1984	57,14	14,28	28,57	0
1985	72,22	16,66	5,55	5,55
1986	37,03	25,92	14,81	22,22
1987	63,88	16,66	11,11	8,33
1988	64,70	11,76	23,52	0
1989	58,06	16,1	12,5	12,9
1990	57,1	17,8	17,8	7,1
1991	68	12	8	12
1992	60	14,3	14,3	11,4

Tableau 1 : Teneurs en coliformes fécaux rencontrées dans les moules de la baie du Lazaret (en % du total des résultats obtenus par an, de 1979 à 1992, et par classe de concentration exprimée en nombre de germes CF par 100 ml de chair) (source IFREMER)

Sur l'ensemble des résultats, on constate :

* trop de teneurs élevées :

plus de 10 % des échantillons présentent plus de 3000 CF / 100 ml au lieu de la valeur 0 fixée.

* pas assez de teneurs faibles

moins de 60 % sont inférieurs à la limite officielle de salubrité fixée à 300 CF / 100 ml au lieu de 80,77 %.

Quelque soit la classe de concentration exprimée, les résultats obtenus en pourcentage de germes CF par 100 ml de chair sont toujours supérieurs à l'arrêté fixé le 12.10.1976 (fig.2).

Le niveau de contamination par les coliformes fécaux, devrait classer la baie du Lazaret, pour ce qui concerne la salubrité des moules, comme produits insalubre.

Dans le courant de l'année, les teneurs sont plus élevées en hiver et supérieures aux normes de novembre à février. Elles sont plus faibles au printemps (mars, avril) et en automne (septembre et octobre).

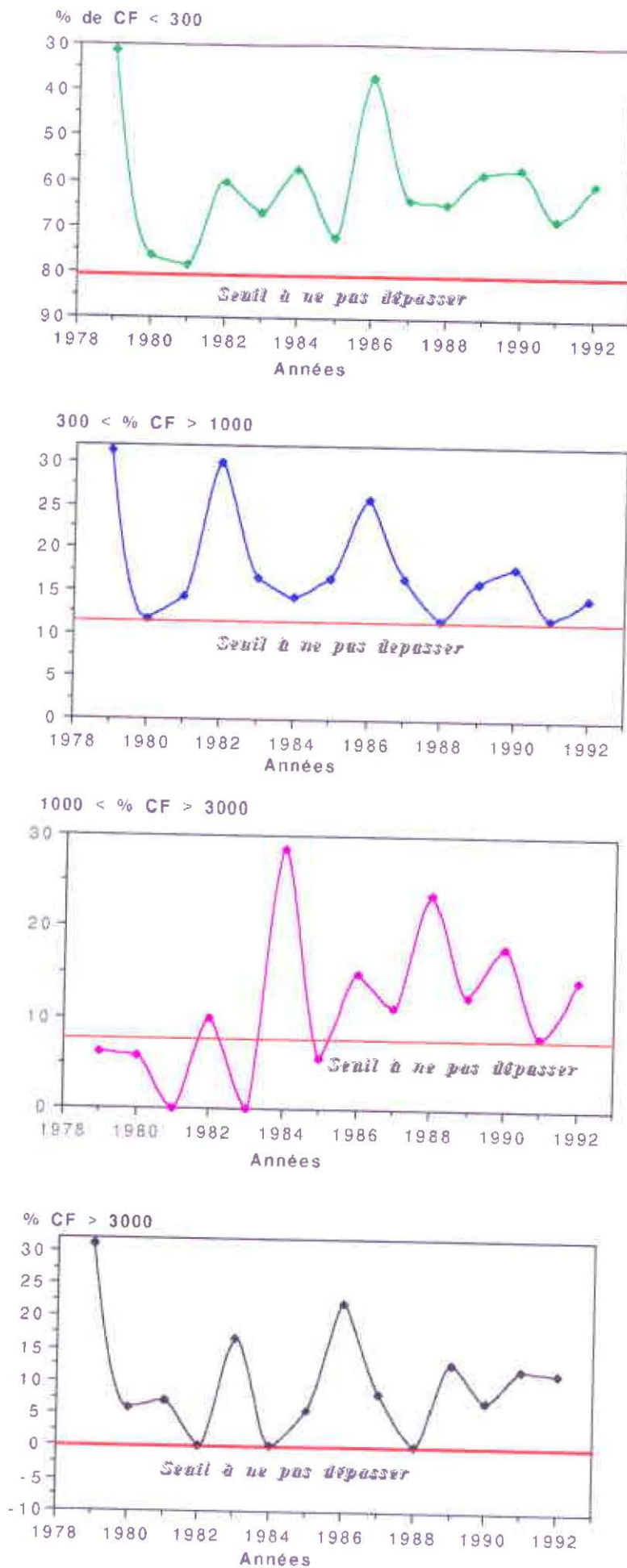


Figure 1 : Teneurs en coliformes fécaux rencontrées dans les moules de la baie du Lazaret (en % du total des résultats obtenus par an et par classe de concentration exprimée en nombre de germes CF par 100 ml de chair)

Le profil de la station Lazaret apparait régulier et aux regards des résultats permet de considérer l'insalubrité comme affirmée et chronique.

Les résultats obtenus sur les coliformes fécaux se réfèrent à l'Arrêté du 12 Octobre 1976, d'autres réglementations ont été établies mais quelque soit le critère d'appréciation pris en compte (Arrêté du 12/10/76; Directive CEE du 30/10/79; Directive CEE du 15/7/91; symbiose de différents règlements proposée par Console et col., 1993) il apparait dans tout les cas un problème de qualité microbiologique en baie du Lazaret.

***Les streptocoques fécaux**

Les concentrations en streptocoques fécaux dans les moules de la baie du Lazaret, selon les critères de l'arrêté du 20 Octobre 1976 puis de l'arrêté du 21 Décembre 1979, sont résumées dans le tableau 2.

Année :	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984
Nombre de SF/100 ml							
Parc Aponte	13976 à 34200	4292 à 30918	8058 à 33966	8577 à 37060	9138 à 19820	11358 à 53099	36426 à 4678
Moyenne annuelle	21320	16864	21203	16988	15355	25071	41604
Pourcentage d'échantillons non conformes (> 7500 SF/100 ml)	72,5 %	53 %	89,4 %	81 %	85,5 %	73 %	84,6 %
Pourcentage à ne pas dépasser d'après les arrêtés	7,7 %						

Tableau 2 : concentrations en Streptocoques Fécaux (SF) dans les moules de la baie du Lazaret. (données Laboratoire Municipal de Toulon)

Le nombre de streptocoques fécaux pour 100 ml de chair de moules apparait très élevé, et le pourcentage non conforme : 53 % à 89,4 % au lieu de 7,7 %.

De nouveau, la baie présente une contamination microbienne chronique et apparait insalubre.

****Les salmonelles***

Compte tenu de la forte pathogénéicité des salmonelles, leur simple présence dans les moules induit un produit impropre à la consommation.

Les résultats des recherches systématiques effectuées par l'Ifremer et la DDASS sont négatifs sur la période de 1979 à 1990. La présence de salmonelles a été détectée pour la dernière fois par l'IFREMER en Avril 1993.

Selon le laboratoire municipal de Toulon, sur une étude de 1978 à 1984, la présence de salmonelles aurait été signalée d'avril 1980 à 1984 à sept reprises sur un total de 298 résultats. Par contre, aucun résultat positif n'a été signalés entre 1985 et 1990.

Il est à noter que suivant l'organisme contrôleur, la présence de salmonelles est détectée ou non. Il convient ici de faire une remarque concernant les techniques de mises en évidence et de numération des bactéries. Les techniques de culture ne permettent pas, en général, le recouvrement total des bactéries d'origine entérique, stressées par un passage dans l'environnement : il y a alors sous estimation de leur nombre réel.

A la vue des différents résultats, la baie du Lazaret présente une forte contamination bactérienne, les moules devant quant à elles subir un passage obligatoire par la station d'épuration.

Les études ponctuelles

Les études ponctuelles nous apportent peu de nouveaux renseignements sur la qualité bactériologique des moules en baie du Lazaret .

Citons l'analyse faite par M.J. Borelli (1991), où les coliformes et streptocoques fécaux sont recherchés sur 11 prélèvements couvrant la rade de Toulon.

Les résultats obtenus montrent une contamination chronique, la pollution semble diffuse et toucher toute la rade de Toulon mais il est à noter que c'est le secteur nord qui apparait le plus touché (en moyenne on trouve dans 100 g de chair de moules 1742 coliformes fécaux et 2697 streptocoques fécaux).

Dans la recherche des origines de contaminations, ces résultats apportent une nouvelle hypothèse : le fort degré de pollution rencontré dans la rade nord pourrait être à l'origine d'une contamination en baie du Lazaret. Au sein de cett baie, c'est dans la zone centrale, au niveau des parc à moules et des cages à poissons, que les germes tests sont les plus nombreux (Borelli, 1991;Cuadrado, 1993; Arnal et Romana, 1990). La richesse trohique au niveau de ces parcs

d'aquaculture et mytiliculture (rejet de fécès, forte concentration en matière organique) constitue un milieu propice pour la prolifération bactérienne.

Qualité bactériologique de l'eau

Peu de suivis bactériologiques réguliers traitent de l'état de l'eau de mer en baie du Lazaret. Les notions de qualité d'eau de baignade (bonne, moyenne,...) sont établies à partir de mesures bactériologiques (coliformes et streptocoques fécaux) par la DDASS et la DDE. Il s'agit de conditions nécessaires mais non suffisantes pour une caractérisation officielle d'une eau de baignade (directive du 8 décembre 1975). Ces différents paramètres servent tout au plus à donner une idée générale de l'état de l'eau au sein de la rade de Toulon.

Les différents résultats recensés ces 10 dernières années n'ont présenté en général aucune activité bactériologique anormale. L'eau était souvent classée de "qualité moyenne" au milieu des années 80, elle est maintenant classée de "bonne qualité".

En raison du peu de prélèvements effectués pendant l'année et d'une recherche localisée au seul endroit de baignade, il est difficile d'en tirer des conclusions précises.

Qualité bactériologique du sédiment

A notre connaissance, les seules analyses portant sur la qualité bactériologique des sédiments de la baie du Lazaret ont été effectuées par Y. Martin et J.L. Bonnefont (Rapport de Arnal et Romana, 1991). Le but de l'étude était de quantifier l'influence d'une remise en suspension du sédiment lors d'un coup de vent d'est.

En plus du sédiment, les recherches de coliformes fécaux, streptocoques fécaux, *Clostridium* sulfito-réducteurs et *Pseudomonas aeruginosa* ont été faites dans l'eau et les moules sur une dizaine de points de prélèvements en baie du Lazaret.

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs détectés dans le sédiment superficiel reflètent une contamination certaine (3 à 4 LUCF pour 100 g de sédiment en moyenne), elle n'a toutefois pas de véritable signification sanitaire, la présence de spores pouvant être relativement ancienne.

Les germes de contamination fécale (coliformes et streptocoques fécaux) ne sont détectés qu'en milieu de baie sous les parcs à moules. Nous ne pouvons conclure que la non détection de ces germes tests dans le reste de la baie implique leur absence, il aurait en effet été souhaitable, vu l'hétérogénéité du sédiment, d'échantillonner plus qu'un gramme de sédiment par site.

La présence de *Pseudomonas aeruginosa* n'a pas été détectée dans les sédiments de la baie du Lazaret.

Les analyses faites dans l'eau ne présentent pas une contamination élevée en coliformes et streptocoques fécaux. Comme pour le sédiment c'est dans la zone centrale de la baie que les concentrations maximum ont été trouvées. Il n'est donc pas à exclure une contamination des moules par la remise en suspension des sédiments situés sous les parcs.

Pendant le coup de vent d'Est (forte augmentation de la teneur en MES, "matière en suspension"), les concentrations en germes tests fécaux augmentent considérablement:

- pour les coliformes fécaux, on passe de 13 à 2140 bactéries pour 100 ml d'eau et de 166 à 10230 pour 100 g dans les moules.
- pour les streptocoques fécaux, on passe de 16 à 1000 bactéries pour 100 ml d'eau et de 831 à 33000 pour 100 g dans les moules.

La majorité des échantillons de moules analysés pendant cette campagne présente des concentrations en coliformes fécaux supérieures aux valeurs de référence imposées par l'arrêté du 12/10/76, rejoignant ainsi les conclusions trouvées avec le REMI.

Le taux de contamination du sédiment relativement faible ne présageait pas une aussi forte concentration en germes bactériens dans l'eau de mer après un coup de vent d'Est. Trois hypothèses peuvent être retenues pour expliquer ce phénomène :

- une trop faible quantité de sédiment analysé (1 gramme par site)
- l'existence d'une couche néphéloïde sédimentaire riche en bactéries et non prise en compte dans l'analyse des sédiments.
- une contamination de l'eau d'origine non sédimentaire pouvant provenir d'un apport externe lointain favorisé par un vent d'Est.

CONCLUSIONS et PROSPECTIVES

La baie du Lazaret est classée zone insalubre vis à vis de la consommation des moules, la contamination bactérienne y étant chronique. Cette partie de la rade de Toulon est contaminée par de multiples polluants, les apports sont divers, constants et nombreux. Cette baie isolée, peu ouverte sur la mer extérieure a du mal à revenir à un état d'équilibre des populations naturelles par le phénomène d'homéostasie. La question qui se pose est de savoir quel est l'intérêt réel de ce site de mytiliculture : l'exploitation des moules elles-mêmes ?, ou l'étude de l'impact de différents polluants sur ces bivalves, cette baie du Lazaret pouvant jouer le rôle de "macrocosme" naturel, constituant un site d'étude idéal pour les scientifiques.

A l'heure qu'il est (juin 1994), l'exploitation de la moule est interdite, le laboratoire de l'Ifremer ayant détecté la production d'une toxine dont l'organisme producteur n'est pas encore identifié. Il pourrait s'agir d'une bactérie du genre *Bacillus* dont l'origine pourrait être les granulés servant de nourriture aux lousps.

Comme dans bien des cas où l'usage d'un site naturelle à des fins d'aquaculture (les moules dans la baie du Lazaret) est relativement ancienne, d'une part les études préliminaires d'implantation sont inexistantes, d'autre part les conditions environnementales (pollution) se sont dégradées sérieusement. Il en résulte une gestion empirique qui a pu conduire à l'installation d'une insalubrité qu'il faut maintenant gérer ou faire disparaître.

Trois concepts principaux sont à mettre en application, particulièrement dans la baie du Lazaret, pour i) une meilleure définition de la nature et de l'intensité de la pollution microbienne, ii) une meilleure compréhension des origines de la pollution et donc une possibilité accrue de gérer et/ou réduire l'insalubrité du site. Ce sont :

- une parfaite connaissance des sources polluantes et des vecteurs physiques de propagation des contaminants
- une recherche la plus exhaustive possible des germes contaminants dans le milieu naturel, sans restriction aux seuls animaux filtreurs
- des techniques de mises en évidence des bactéries contaminantes qui soient rapides et fiables.

Recherche de l'origine et du degré d'extension d'une pollution microbienne

Il serait intéressant d'approfondir l'étude sur les origines d'une pollution microbienne en ne négligeant pas les rejets qui peuvent apparaître lointain de la baie du Lazaret.

Par exemple, la station d'épuration de Toulon (rejet au niveau de l'émissaire de Sainte Marguerite), même si elle relativement distante de la petite rade de Toulon devrait être mieux

prise en compte. Avec son traitement physico-chimique à faible rendement (de 20 à 50% pour les germes tests, rejet de salmonelles), elle reste tout de même une des plus importantes sources de bactéries.

Pour mieux comprendre la dispersion de ces bactéries, il est également indispensable de prendre en compte les conditions météorologiques et la courantologie du site. Des efforts doivent être faits dans la modélisation des courants, ces derniers pouvant jouer un rôle fondamental dans la contamination microbienne en baie du Lazaret à travers le transport des bactéries entériques. Arnal et Romana (1990) ont montré une forte contamination de l'eau après un coup de vent qui ne peut être expliquée par la faible concentration rencontrée dans les sédiments. Une source de contamination plus lointaine serait alors envisageable, soit en provenance de la station d'épuration par le biais de courants dus au vent d'Est, et/ou soit en provenance de la rade nord qui apparaît extrêmement riche en germes fécaux (Borelli, 1991). En effet lors des nombreux coups de mistral, l'eau de surface sortirait de la baie, cette sortie serait alors compensée par une entrée d'eau en profondeur provenant de la rade nord.

Un des facteurs clefs de la réduction de l'impact au niveau de la colonne d'eau et du fond marin est le renouvellement des masses d'eau par un échange entre les eaux côtières et celles de la mer ouverte. C'est cette capacité d'échange qui, à long terme, prévient les risques d'eutrophisation. Le temps de résidence de la masse d'eau de la baie du Lazaret reste à définir. Le courant circulaire qui parcourt la baie fermée n'est pas vraiment propice aux échanges d'eaux. Ceci montre à nouveau l'importance de la connaissance de l'hydrologie de la baie.

Indicateur d'une pollution microbienne : moule, eau, sédiment ?

Le seul suivi régulier, le REMI, ne s'intéresse à la qualité bactériologique en baie du Lazaret qu'à travers un intégrateur : la moule; il en est de même pour la majorité des différents rapports traitants du contrôle de la pollution en baie du Lazaret. Ce bivalve représente un matériel de choix : son pouvoir de filtration de l'eau environnante en fait un accumulateur de bactéries (concentration jusqu'à un facteur 30), la détection et la numération des germes fécaux en devenant alors aisée permet la mise en oeuvre de techniques peu sensibles favorisant un travail de routine. Il a été montré qu'il existe une relation linéaire hautement significative entre la concentration en bactéries mesurée dans les moules et celle trouvée dans l'eau (Arnal et Romana, 1990) permettant de considérer les moules comme représentatives du milieu environnant. Mais son facteur de concentration est variable suivant l'environnement, le type de moules, la concentration en bactéries dans l'eau et ne permet alors pas de définir les conditions

exactes rencontrées en eau de mer. Pratiquement rien n'est connu sur une possible sélection qualitative des espèces bactériennes par les filtreurs.

Aucune prédiction ne peut être envisagée à partir des comptages obtenus dans les moules, les facteurs influençant le nombre de microorganismes dans ce filtreur restant encore à préciser, si ce n'est à définir. Les analyses bactériologiques ne doivent pas se focaliser sur ce type d'indicateur et délaissier l'eau et le sédiment qui constituent l'environnement des animaux.

Ces deux écosystèmes présentent l'avantage de fournir des renseignements sur une pollution située en amont par rapport à celle détectée dans la moule. Le sédiment représente une source potentielle indéniable de contamination microbienne à long terme. Les conditions rencontrées dans le sédiment sont favorables à la survie des microorganismes lui conférant alors la propriété de réservoir à bactéries, le suivi de la qualité microbienne rencontrée dans ce milieu apparait alors incontournable. Les échanges de bactéries entre le sédiment et l'eau dépendent, pour ce qui est des effectifs, des conditions physiques de sédimentation et de remise en suspension. Par contre, la nature qualitative des bactéries subsistant dans le sédiment ou capables de se redévelopper dans la phase aqueuse dépendent des caractéristiques physiologiques et nutritionnelles des bactéries concernées.

Techniques mises en oeuvre et indicateurs de pollution microbienne

Dans les comptages destinés aux études de pollution, la détermination quantitative et qualitative des différentes populations bactériennes repose sur la possibilité des souches de se développer sur les milieux de culture traditionnellement utilisés. Les bactéries qui ne sont pas cultivables à partir de ces milieux sont considérées comme n'étant pas pathogènes.

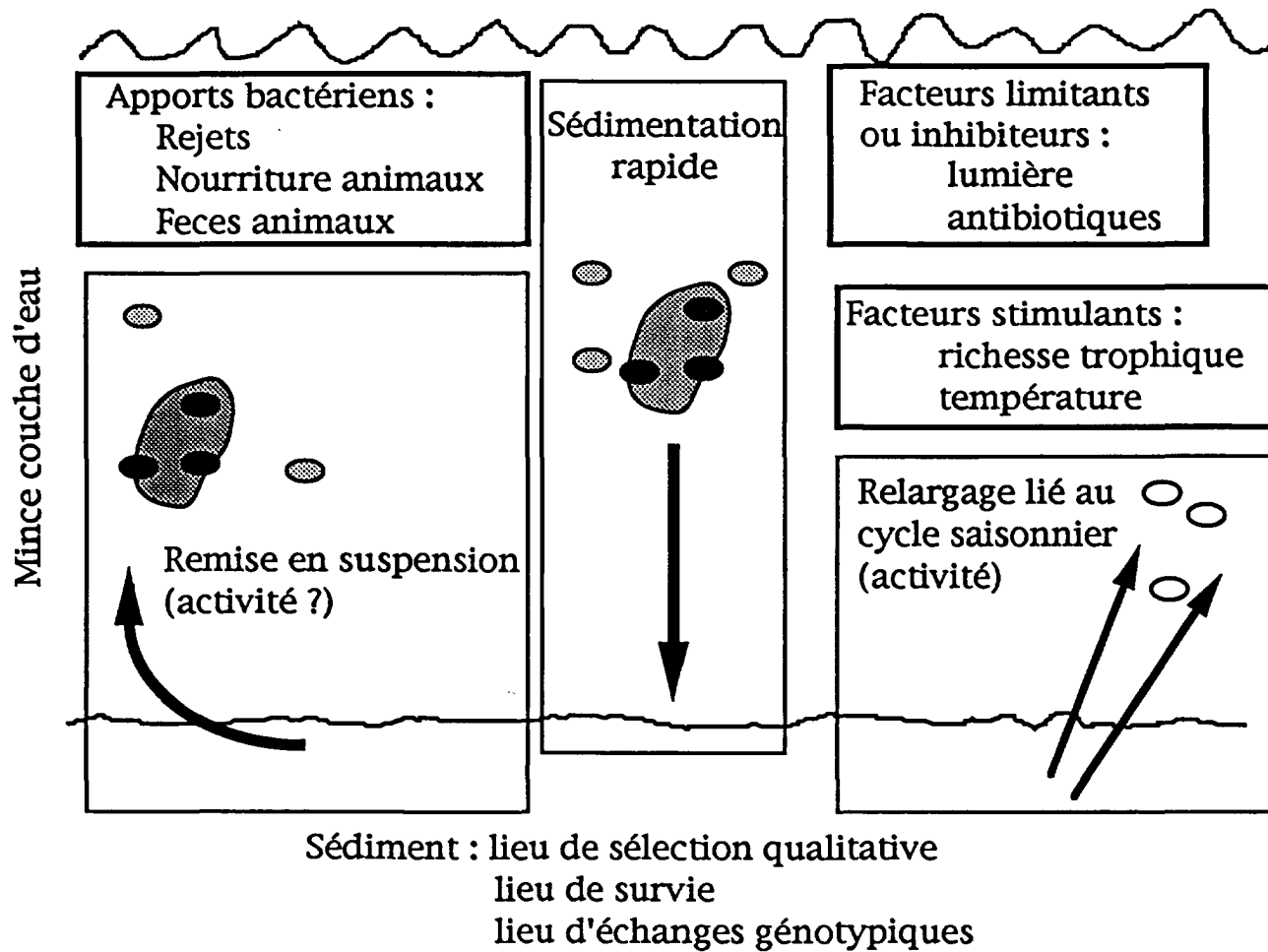
Une sous estimation est inévitable, i) du fait du choc que subissent ces bactéries lors de leur rejet dans le milieu marin et qui ne permet plus leur culture dans les conditions conventionnelles, ii) du fait que certaines bactéries pathogènes présentes en faible quantité ne peuvent être mises en évidence par des techniques aux limites rapidement atteintes (ex. : NPP, nombre le plus probable; identification en milieu sélectif sur boîte de Pétri, ...).

Aucune étude qualitative des différentes souches présentes en baie du Lazaret n'a été entreprise, un effort doit pourtant absolument être fait dans ce sens. Une pollution entraîne irrémédiablement une perturbation du milieu avec une modification de la communauté bactérienne : la diversité bactérienne tend à se réduire avec une sélection de certaines souches prédominantes. L'étude qualitative de la communauté bactérienne peut être un bon indicateur du type de pollution présent et du taux de contamination microbiologique.

Cette étude qualitative fine ne peut être envisagée qu'avec l'emploi de techniques beaucoup plus sensibles faisant appel à l'immunologie et à la biologie moléculaire : test ELISA

(utilisation d'anticorps spécifiques), séquençage d'ARN 16 S, sondes nucléiques spécifiques révélatrices d'une espèce bactérienne (méthode rendu très sensible par amplification d'une cible nucléique : "technique PCR", Polymerase Chain Reaction).

La recherche des germes pathogènes pourrait alors s'étendre à d'autres espèces (salmonelles, vibrios,...) et permettre de mieux définir l'ensemble de la communauté bactérienne présente. A partir de ce stade de connaissance, les facteurs environnementaux qui régulent et/ou qui stimulent la présence ou la dominance de certaines espèces pourront être déterminés. Ce contrôle en aval de l'évolution qualitative des populations bactériennes permettra une prédiction de cette évolution.



Processus régulant le présence et la composition des communautés bactériennes

II

**REPONSES DES COMMUNAUTES BACTERIENNES
DU SEDIMENT MARIN COTIER
A LA PERTURBATION CREEE
PAR DES SYSTEMES D'AQUACULTURE DU
SITE DU LAZARET**

INTRODUCTION GENERALE

La baie du Lazaret, près de Toulon, est le site d'une aquaculture (loups, daurades et moules) basée sur une technique semi-naturelle, les poissons étant contenus dans des cages au-dessus du sédiment dans des zones peu profondes.

Les principales sources de perturbations des communautés bactériennes de l'eau et du sédiment dues à l'activité aquacoles sont les suivantes:

- apports de matière organique par la nourriture non consommée et par l'abondance des fécès due à la concentration des poissons et des moules.
- apports de bactéries allochtones par les microflores des tractus digestifs des animaux.
- modification de la composition qualitative des communautés par les antibiotiques apportés par le traitement des poissons et l'acquisition de caractères de résistance à ces antibiotiques par les souches du milieu naturel.

Par ailleurs, le rejet de coliformes par des effluents peut conduire à leur stockage dans le sédiment. La profondeur de la baie étant faible, les bactéries étant adsorbées sur les particules de sédiment peuvent être remises en suspension dans la colonne d'eau lors de période de vent. Les échanges de bactéries entre la phase sédimentaire et la phase aqueuse sont donc nombreux et réciproques.

Il se crée ainsi des communautés bactériennes dont la composition taxonomique, l'état d'organisation et les activités de production et de résistance aux conditions hostiles doivent différer de celles des populations du milieu environnemental non perturbé.

Le but de ce travail est d'évaluer l'impact des parcs d'aquaculture et des filières à moules et l'état actuel de pollution de la baie en analysant les communautés bactériennes du sédiment et de l'eau.

Les populations bactériennes associées à l'aquaculture seront recherchées (*Vibrios*) et la teneur en coliformes, critères de pollution, mesurée. Des comptages de bactéries totales et de bactéries viables seront effectués et des souches isolées des prélèvements analysées phénotypiquement pour avoir une image de la diversité microbienne.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

1 - Etat d'organisation d'une communauté bactérienne naturelle

1.1 - Le milieu marin et les différents habitats

Le milieu marin présente des environnements variés pouvant constituer des écosystèmes pour des microorganismes. On peut définir comme écosystème, la colonne d'eau, le sédiment ainsi que les organismes planctoniques et benthiques.

Selon les écosystèmes, les bactéries vont être libres ou fixées. Par exemple, dans la colonne d'eau la plupart des bactéries sont libres et sont inféodées à la masse d'eau qui se déplace suivant les turbulences et les courants. A l'inverse, dans l'environnement benthique, elles vont être attachées à des particules et confinées à l'eau interstitielle ou incluses dans des biofilms.

Pour pouvoir étudier une communauté, il convient de définir un certain nombre de termes. Tout d'abord, on appelle population bactérienne, l'ensemble des microorganismes de même espèce. La totalité des populations d'un habitat est rassemblée en communauté. Enfin, la communauté et l'environnement abiotique représentent l'écosystème. Pour Odum, l'écosystème est défini comme " une communauté interagissant avec les caractères abiotiques de manière à ce qu'il en résulte un flux d'énergie, une structure trophique et un cycle de matière".

1.2 - La sélection naturelle

En milieu naturel, un microorganisme qui acquiert des caractères lui permettant de survivre dans un environnement particulier va devenir le plus fort dans cet environnement. Il va y avoir apparition et évolution de nouvelles populations. Seuls les organismes avec des caractères adaptatifs seront sélectionnés. En fait, ces caractères vont contribuer à la stabilité d'une communauté biologique.

Les caractères adaptatifs correspondent à des changements dans le génôme des bactéries. C'est le résultat de mutations et de recombinaisons.

La variabilité génétique est le facteur le plus important pour la stabilité d'une bactérie dans un habitat qui n'est pas statique.

Le taux de reproduction d'un microorganisme étant élevé, les nouveaux caractères acquis sont rapidement disséminés dans une population. On peut donc dire que la diversité, la variabilité et la stabilité des populations bactériennes d'un écosystème dépendent des mécanismes d'échanges comme la transformation, la conjugaison et la

transduction. Les souches antibiorésistantes et celles capables de dégrader les pesticides sont deux exemples de sélection de microorganismes génétiquement variables.

L'acquisition de nouveaux caractères physiologiques et structuraux peut aussi permettre l'adaptation et la survie des microorganismes. Il peut y avoir une adaptation structurale ou bien une adaptation physiologique par exemple pour les bactéries des eaux froides (modifications des enzymes) ou pour les bactéries halophiles extrêmes. L'adaptation peut aussi se faire par le choix d'une stratégie de survie (stratégies "r" et "K").

La pression de sélection peut intervenir sur des activités comportementales comme le chimiotactisme, le phototactisme ou bien encore les cycles circadiens et annuels. Par exemple, *Vibrio parahaemolyticus* a un cycle annuel en deux temps. Il se retrouve dans la colonne d'eau au printemps et en été et dans le sédiment à l'automne et en hiver quand la température de l'eau diminue (Colwell *et al.*, 1984).

1.3 - Origine et diversité des populations bactériennes

Les bactéries du milieu marin peuvent avoir deux origines. Tout d'abord, il y a les populations naturelles du milieu marin et on trouve dans ces populations tous les types de bactéries. Ces populations sont dites populations autochtones. Mais, dans le milieu marin, des microorganismes provenant des sols et des déversements d'eaux douces ou usées, peuvent survivre un certain temps et perturber l'équilibre des communautés existantes. Ces populations sont dites allochtones.

Ainsi, les rejets urbains sont la source d'un apport important en coliformes et autres bactéries comme les *Vibrios* (Shiaris *et al.*, 1987). Ils sont aussi responsables de l'apport de salmonelles. Ainsi pour les effluents des stations d'épuration de Toulon, 100% des échantillons testés pour les salmonelles sont positifs que ce soit dans les effluents bruts ou dans les effluents traités (Dupray *et al.*, 1990).

2 - Réponse d'une communauté bactérienne à une perturbation: diminution de la diversité

2.1- Variation de la diversité: théorie

La diversité d'une communauté bactérienne est directement reliée à sa stabilité, c'est-à-dire à l'équilibre des populations bactériennes la composant. Une communauté bactérienne naturelle est composée en principe de quelques espèces avec beaucoup d'individus et d'un grand nombre d'espèces avec peu d'individus. Quand une population atteint de fortes densités, il va y avoir compétition et diminution du nombre d'espèces jusqu'à la dominance d'une population unique. En fait, la diversité d'espèces d'une communauté reflète la diversité génétique d'une population. La maturité d'une

communauté s'exprime par l'augmentation de la diversité spécifique des individus qui la composent.

De nombreux microbiologistes évaluent la diversité d'une communauté par l'observation qualitative (morphologie des colonies, morphologie des bactéries) (Atlas & Bartha, 1981).

En écologie la diversité spécifique peut être évaluée par des indices mathématiques variés. L'indice de diversité le plus couramment utilisé dans les études dévolues au milieu marin est l'indice de Shannon (Bianchi & Bianchi, 1982; Griffiths & Lovitt, 1980; Mills & Wassel, 1980). Ces indices sont établis à partir de la comparaison des souches bactériennes selon le principe de la taxonomie numérique (Benzecri, 1973).

Les indices de diversité expriment pour une communauté, le degré de stress auquel elle est soumise. Quand une population est stressée, l'indice de diversité est souvent faible car il se produit une sélection au profit d'une ou de quelques espèces les mieux adaptées aux conditions environnementales particulières. Ainsi ces indices de diversité peuvent être utilisés comme des indicateurs de pollution (Bianchi & Colwell, 1985).

En théorie, une telle communauté présentant un indice de diversité faible sera moins capable de s'adapter aux variations de l'environnement que les communautés très diversifiées. En effet, si les individus sont très compétitifs au regard d'un ou deux critères, ils ne le sont plus pour les autres conditions environnementales. Les communautés sont d'autant plus instables que la caractéristique principale des communautés bactériennes naturelles est l'homéostasie, c'est-à-dire la faculté de retour à l'état diversifié originel dès que la perturbation induisant une diminution de la diversité disparaît.

2.2 - Facteurs environnementaux affectant la présence des microorganismes

La nature unicellulaire des microorganismes les rend particulièrement et rapidement sensibles aux paramètres physico-chimiques et biologiques du milieu extérieur.

Dans le milieu marin, la lumière est un facteur important. Elle permet la photosynthèse chez les microorganismes photosynthétiques et inhibe un grand nombre de bactéries par les rayonnements ultraviolets (Olson, 1981b; Ward, 1986). De plus, elle agit sur la température du milieu et dans l'océan, l'épaisseur de la couche réchauffée est délimitée par la thermocline.

La concentration en gaz dissous est également un paramètre important. Par exemple, l'oxygène va varier en fonction de la température, de la pression partielle du gaz dans l'atmosphère, de la salinité et de l'activité biologique. Dans le sédiment, la présence d'oxygène joue un rôle très important, des couches anoxiques se forment rapidement

dans l'épaisseur sédimentaire permettant le développement de bactéries anaérobies strictes et/ou facultatives.

La concentration en matière organique joue aussi un rôle de premier plan car c'est la source de carbone et d'énergie d'un grand nombre de bactéries. Elle se trouve sous deux formes: particulaire et dissoute. La matière organique en milieu marin côtier a deux sources: les apports allochtones par les eaux de rivières, les rejets et les apports éoliens et une source autochtone par la photosynthèse induisant des réseaux trophiques complexes eux-mêmes source de matière organique pour les bactéries (décomposition et excréments).

2.3- Exemples de variation de diversité

- Perturbation expérimentale par apport de matière organique

Une eau eutrophe et une eau oligotrophe sont soumises à un enrichissement en azote minéral ou organique. Avant l'enrichissement, les deux types d'eaux présentent des communautés bactériennes en état d'équilibre caractérisées par une biomasse et une productivité faibles et une diversité forte. L'apport en matière organique azotée provoque un changement dans la structure des deux communautés. Dans les deux cas, on constate une identité du mécanisme de réponse, le rapport de la biomasse sur la productivité est élevé et la diversité devient faible (Bianchi & Van Wambeke, 1984)

- Ajout d'espèces nouvelles

L'enrichissement en matière organique peut provoquer une diminution de la diversité mais aussi la dominance d'une espèce opportuniste, à développement rapide dans les conditions nouvelles. L'ajout en grande quantité dans un mésocosme d'eau douce de deux souches *Escherichia coli* et *Pseudomonas putida* n'entraîne pas de modification significative sur la structure et la dynamique de la communauté présente dans le mésocosme. Par contre, si l'on rajoute avec les deux souches leur milieu de culture riche, on constate alors une diminution de la diversité et la dominance des souches allochtones (Hoffle, 1988).

-Perturbation due à l'aquaculture

Un autre exemple peut être illustré par l'impact des fermes d'aquaculture sur les métabolismes de réduction du sulfate (Holmer & Kristensen, 1992), nitrifiant et dénitrifiant (Kaspar *et al.*, 1988). La réduction des sulfates et les phénomènes de nitrification diminuent fortement sous les cages (jusqu'à 70 % de moins pour la nitrification). Quant à la dénitrification, elle est complètement inhibée.

3 - Les moyens d'études

3.1 - Abondance des bactéries

Les premiers comptages de bactéries en milieu aquatique ont été effectués par la technique de comptage après mise en culture des échantillons sur boîte de gélose nutritive. Les résultats obtenues donnaient 10^1 à 10^3 bactéries par ml d'échantillon. Au cours de la dernière décennie le développement de la microscopie à épifluorescence et l'utilisation de filtres en polycarbonate (Hobbie & Daley, 1977) ont permis de dénombrer des effectifs bactériens de plusieurs puissances supérieures aux chiffres obtenues par la technique précédente.

Dans les eaux côtières, l'abondance des bactéries est estimée à $1-5 \cdot 10^6$ bactéries par ml, et dans les sédiments marins côtiers à $4-17 \cdot 10^9$ bactéries par gramme poids sec (Hobbie & Flechter, 1984).

	Séparation particules et bactéries	fluorochrome	Conservation des échantillons	Comptage
Références	Montana, 1982 Doria & Bianchi, 1982 Velji & Albright, 1986	Porter & Feig, 1980 Schallenberg <i>et</i> <i>al.</i> , 1989	Schallenberg, <i>et</i> <i>al.</i> , 1989	Estep <i>et al.</i> , 1986 Van Wambeke, 1988
Choix	ultrasons + agitation mécanique (+ pyrophosphate de sodium pour les sédiments)	DAPI 4',6-diamidino-2- phénylindol dihydrochloryde	pas de conservation après coloration comptage immédiat	caméra ultrasensible + programme d'analyse d'image

Tableau 1: Choix des techniques pour le comptage des bactéries en épifluorescence

Les effectifs dénombrés au microscope ne permettent pas de définir la proportion de la communauté bactérienne qui est en activité, en opposition à la fraction en état de latence. En effet, le principe de la diversité spécifique permettant à quelques espèces de se développer rapidement dans des conditions restrictives pour les autres espèces, permet de supposer qu'à tout instant, seule une partie des individus constituant la communauté est sous forme d'état actif (se divisant). Il est important de déterminer, dans les échantillons étudiés, le pourcentage de bactéries métaboliquement en activité.

Le moyen le plus répandu (à défaut de marquage cellulaire visible en microscopie) est la mise en culture des bactéries d'un échantillon. Ces comptages ont pour but d'évaluer le nombre de bactéries cultivables ou dites "viables". Ils s'effectuent par la mise en culture d'échantillons sur milieu gélosé type 2216 ou milieu de ZoBell pour les bactéries marines.

La recherche de certaines bactéries connues, présentant des caractéristiques d'indicateurs de contamination est parfois nécessaire. Ainsi, la recherche de coliformes fécaux se fait sur gélose EMB (Eosin Methylene Blue) et les vibrios sur TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt).

3.2 - Isolement de souches et analyse phénotypique et génotypique

La comparaison phénotypique de souches permet de déterminer des profils écologiques. La précision de cette comparaison dépend de quelques facteurs. Il faut tout d'abord un nombre de souches à comparer suffisant si l'on veut que l'image de la diversité d'une communauté représente bien la réalité (Bianchi & Bianchi, 1982). Le choix des caractères de comparaison est lui aussi très important. Ils doivent être variés et sans équivoques quant à leur lecture lors des tests.

Cette comparaison phénotypique s'effectue par la méthode de classification hiérarchique ascendante, basée sur la description des souches à l'aide de liste de caractères, et non pas par la dichotomie à partir d'un caractère.

L'étude de la diversité d'une communauté se fait aussi par comparaison génotypique. Cette étude peut être abordée sous différents aspects:

- aspect global et comparaison de communautés bactériennes

L'analyse des ARN de faibles poids moléculaires (ARN 5S et ARNt) peut permettre de mettre en évidence la diminution de diversité d'une communauté bactérienne soumise à un apport de matière organique (Hoffle, 1990).

- approche taxonomique

Une autre approche de la diversité d'une communauté se fait par l'analyse des gènes des ARN 16S. Cette méthode présente des avantages par rapport à l'utilisation des ARN 5S. L'ARN 16S, de plus grande taille que l'ARN 5S, apporte plus de précision pour l'affiliation des bactéries. De plus, il est possible d'utiliser l'ADN qui est beaucoup plus stable que l'ARN, plus facile à marquer et à séquencer (Pace *et al.*, 1986). L'approche taxonomique permet de mesurer des indices de biodiversité et de déterminer des espèces.

4 - Application à l'environnement et à l'aquaculture

4.1 - Les microorganismes comme indicateurs de perturbations environnementales

Les microorganismes, par leur sensibilité vis à vis des perturbations de l'environnement, sont de bons indicateurs de perturbations. D'une part, les communautés bactériennes seront les premières à montrer des signes de perturbation en réponse à un stress:

- leur contact étant direct avec l'environnement.
- les temps de génération étant notablement plus courts que pour les organismes pluricellulaires.

L'impact d'un polluant peut être abordé par différents facteurs propres aux bactéries: état physiologique (variation du taux de croissance, de la production), composition taxonomique et diversité, ainsi que par la densité bactérienne (Martinez *et al.*, 1991).

Par ailleurs, certains microorganismes sont traditionnellement utilisés comme signal de pollution. Pour les eaux de baignades, les eaux de zones aquacoles ou conchylicoles ou bien encore pour les eaux potables, des barèmes pour les concentrations en coliformes sont établis. Les coliformes sont, en effet, le groupe bactérien le plus souvent utilisés pour évaluer la qualité de l'eau (Lynch & Poole, 1979), en réponse à des apports anthropiques comme les eaux usées. Les entérocoques sont aussi utilisés comme indicateurs car leur temps de survie dans le milieu marin est plus long mais ils n'indiquent pas sûrement la présence de virus et de vibrios (Shiaris, *et al.*, 1987).

4.2 - Un exemple: l'aquaculture

Depuis les années 1990, le développement important de l'aquaculture en zone côtière pose un problème au niveau de l'impact sur le milieu marin naturel.

Les animaux ont une activité biologique (respiration, alimentation et excrétion) qui influe sur la qualité du milieu, influence d'autant plus importante que la densité en animaux dans les parcs est très forte. Leur respiration va provoquer une diminution de l'oxygène dans la colonne d'eau. La quantité de produits azotés dans l'eau et le sédiment est augmentée par les produits d'excrétion. Les fécès vont contribuer à l'enrichissement des sédiments. D'autre part, la lutte contre les maladies nécessite des apports en antibiotiques et en produits antiparasitaires (Figure 1, Videau & Merceron, 1992).

Les modifications physico-chimiques de la colonne d'eau et du sédiment vont avoir un impact sur les populations bactériennes naturelles.

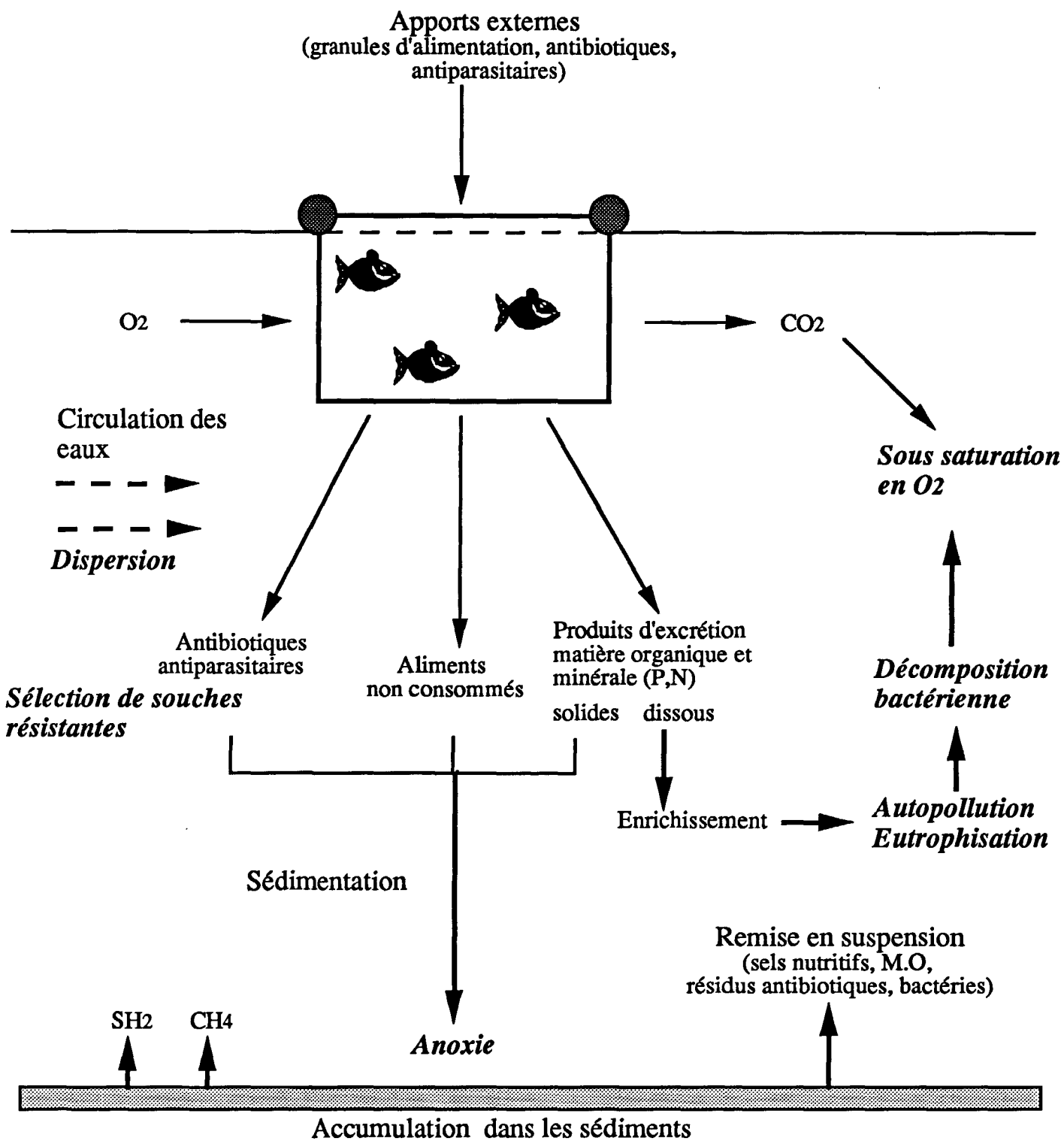


Figure 1: Effets et interactions des rejets trophiques d'un élevage de poissons dans le milieu aquatique et les sédiments

De plus, il peut y avoir apport, par les poissons en élevage, de bactéries pathogènes. Des études peu nombreuses, ont mis en évidence l'augmentation de *Vibrios* à proximité des cages d'élevages (Prieur, 1985).

Les systèmes d'aquaculture induisent deux effets antagonistes sur les communautés bactériennes:

- l'apport en matière organique par les aliments non consommés et par les fécès peut provoquer une augmentation de la densité bactérienne dans l'eau et le sédiment par enrichissement en matière organique.

- par contre, les apports en antibiotiques vont provoquer une baisse dans la densité bactérienne et une modification de la composition de la communauté par la persistance de bactéries antibiorésistantes. En effet, Jacobsen (1988) et Bjorklund (1990) ont montré que l'utilisation d'oxytétracycline ou d'autres antibiotiques comme l'acide oxolinique, la furazolidone ou la fluméquine, augmentait la proportion de bactéries résistantes et le risque de transfert de plasmides.

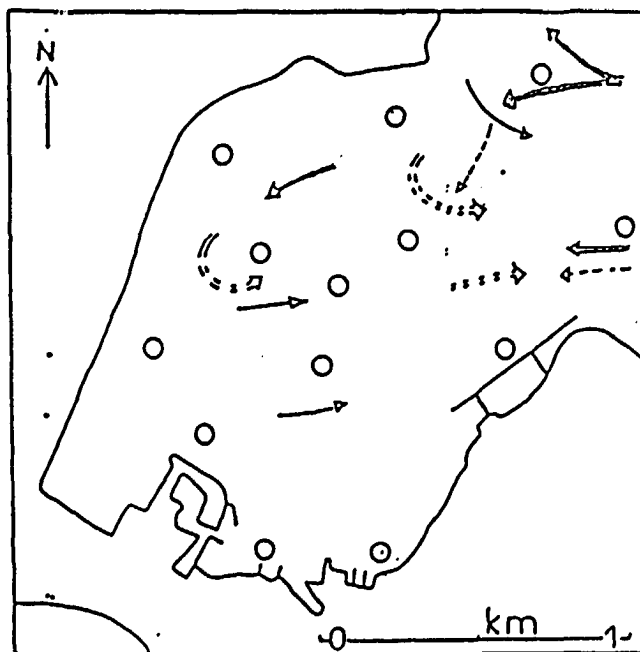
Les zones d'aquaculture sont souvent situées dans des baies et lagunes dont les échanges avec la pleine mer sont restreints et dans des zones peu profondes. L'intensité de l'impact des cages aquacoles sur l'environnement et la qualité de l'élevage vont dépendre du renouvellement des eaux. Les modifications des paramètres physico-chimiques vont entraîner des perturbations dans les communautés bactériennes naturelles. Le faible renouvellement des eaux empêchera un retour de la communauté à l'état originel par le phénomène d'homéostasie. Par contre, les perturbations persistant au niveau des communautés bactériennes peuvent provoquer l'apparition de maladies et une diminution de la qualité de l'élevage.

MATERIELS ET METHODES

1 - Introduction: la baie du LAZARET, zone d'aquaculture

La baie du Lazaret, choisie pour cette étude, est un site de conchyliculture depuis 1903 et d'aquaculture (loups et daurades) depuis les années 80. Elle se situe au sud de la petite rade de Toulon, région à activité militaire et portuaire importante (figure 2 et photographie 1). Sa superficie est d'environ 2 Km². La faible profondeur de la baie et sa situation géographique abritée en font une zone modèle pour l'étude de l'impact de l'aquaculture sur les communautés bactériennes du milieu environnant.

Des études de courantologies ont mis en évidence trois situations. Par temps calme, les courants sont faibles voire nuls. Ces conditions vont favoriser la sédimentation et l'accumulation des polluants dans les sédiments. Par vent d'ouest (figure 3), l'eau de surface est entraînée vers l'extérieur de la baie alors qu'une entrée d'eau en profondeur se produit, ceci pouvant apporter des contaminants de la rade toulonnaise. Enfin, par vent d'est (figure 3), les eaux de surfaces entrent vers le fond de la baie provoquant une augmentation de la turbidité dans la zone nord de la baie



Circulation de surface (——>), et de fond (===>), par vents d'Est,
Circulation de surface (—>), et de fond (- - ->), par vents d'Ouest.

Figure 3: Schéma simplifié de la circulation des masses d'eau en baie du Lazaret (Amal & Romana, 1990 d'après Jeudy de Grissac, 1980).



Figure 2: Situation géographique de la rade de Toulon et de la baie du Lazaret

L'étude d'impact se fera pour deux cas de figure, par temps calme et par temps venté c'est-à-dire avec une eau claire et sédimentation des particules ou une eau turbide et remise en suspension de particules. L'impact sera évalué par l'analyse de la biodiversité des communautés bactériennes par comparaison phénotypique de souches isolées de l'eau et du sédiment ainsi que par l'étude des résistances à certains antibiotiques.

2 - Les campagnes et les stations de prélèvement

Deux campagnes de prélèvement ont eu lieu dans la baie avec des conditions météorologiques différentes.

La première campagne s'est déroulée le 16 novembre 1993 dans la matinée (série 1 d'échantillons). Elle a fait suite à une journée de très fort mistral. L'eau de la baie était très chargée en particules et la visibilité dans l'eau limitée. La température de l'eau était de 17°C. La deuxième campagne a eu lieu le 7 décembre 1993 dans la matinée (série 2 d'échantillons). Les prélèvements se sont cette fois faits après une période de temps calme, sans vent. L'eau était très claire, sans remise en suspension de particule. La température de l'eau était de 15° C.

Le jour de la deuxième série de prélèvements, les moules des tables de la baie étaient interdites à la vente à cause de la présence de Dinoflagellés et d'une toxine inconnue.

Six stations de prélèvement ont été choisies dans la baie du Lazaret (figure 4). La station 1 se situe à l'entrée de la baie; elle constitue le point de référence et est considérée comme étant hors de l'influence de la zone aquacole. Les stations 2,3 et 6 sont soit directement sous les parcs à moules (stations 3 et 6) soit entre deux parcs à moules (station 2). La station 4 correspond à une cage à poissons contenant des loups (*Dicentrarchus labrax*). Enfin la station 5 est située en fond de baie, dans une zone où il n'y a plus de parcs aquacoles.

3 - Les échantillons

A chaque station, un échantillon d'eau et un échantillon de sédiment sont prélevés par des plongeurs. L'eau est prélevée en bouteilles de 0,5 litre et les échantillons de sédiment sont prélevés à l'aide d'un carottier en plexiglas de 9 cm de diamètre (photos 2 et 3). Des sous-carottages sont ensuite faits au laboratoire avec une seringue de 5 ml à embout sectionné. Tous les prélèvements sont conservés dans une glacière lors de la campagne de prélèvement puis en chambre froide à 4°C au laboratoire.

4 - Les comptages

4.1 - Comptages directs en épifluorescence

Deux protocoles de préparation et de coloration des échantillons sont utilisés selon la provenance des échantillons (eau ou sédiment). Le détail des opérations est exposé en

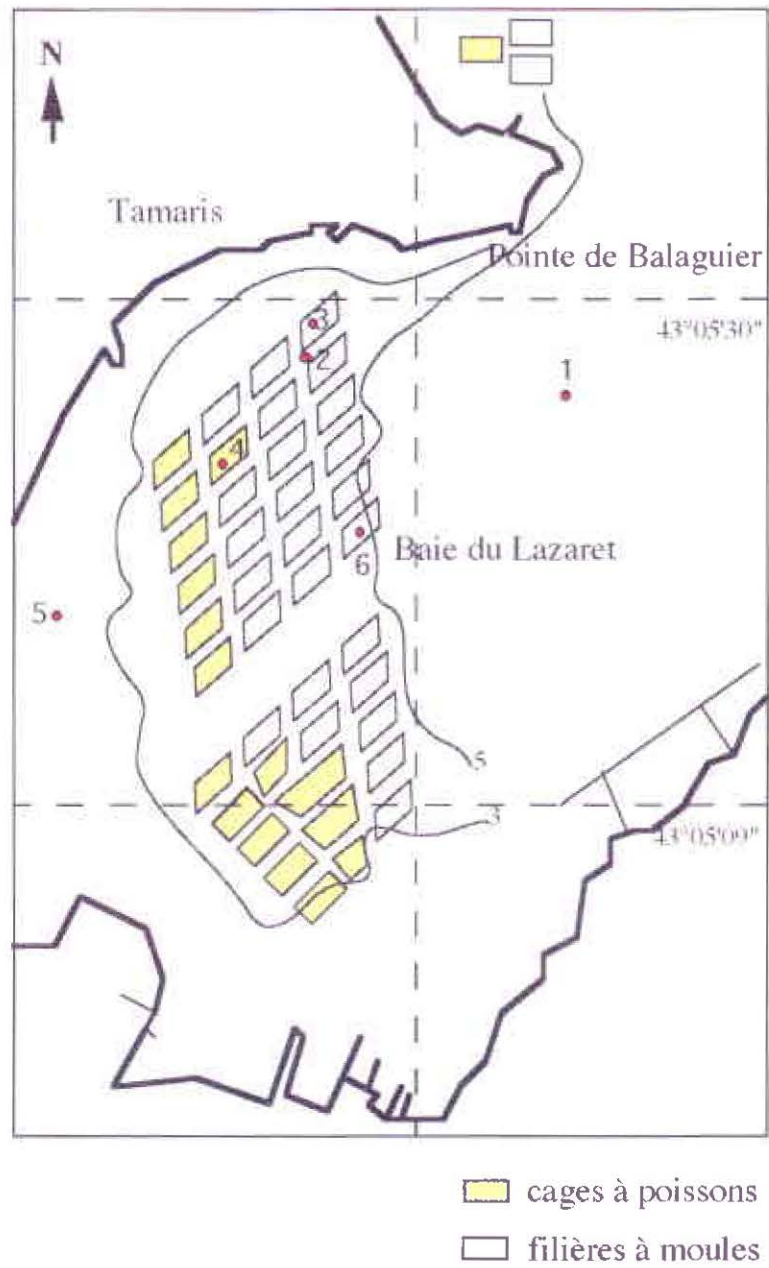


Figure 4: Cultures marines en baie du Lazaret et stations de prélèvement (●)



Photographie 2: Prélèvement des échantillons d'eau



Photographie 3: Prélèvement des échantillons de sédiment

annexe 1 pour l'eau et en annexe 2 pour les sédiments.

En bref, les échantillons d'eau sont formolés, passés aux ultrasons avant d'être incubés avec le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol dihydrochloride) puis filtrés (annexe 1). La préparation des échantillons de sédiment est plus longue et nécessite plus d'étapes pour séparer les bactéries des particules. Les échantillons sont formolés puis incubés avec du tetrasodium de pyrophosphate, agent de dispersion des colloïdes (Velji & Albright, 1986). Après le passage aux ultrasons, ils sont dilués dans de l'eau de mer distillée contenant du formaldéhyde et du sodium azide qui est un anti-oxydant (Reimers & Smith, 1986). L'incubation avec le DAPI se fait pendant au minimum 1 heure (annexe 2). La précision des comptages fait intervenir la concentration en fluorochrome, le temps d'incubation et le type de sédiment étudié (Schallenberg, *et al.*, 1989).

Les comptages sur les échantillons d'eau se font par l'intermédiaire d'une caméra, Lhesa électronique, couplée à un programme d'analyse d'image (Estep, *et al.*, 1986; Van Wambeke, 1988). Le programme a été élaboré spécifiquement pour le laboratoire. Pour le sédiment, les comptages se font manuellement à cause de la fluorescence des particules non bactériennes présentes en grande quantité et qui nécessitent un choix visuel par l'opérateur.

4.2 - Mise en culture et comptages sur boîtes

Pour les échantillons d'eau, une seule dilution au dixième est faite. Pour ceux du sédiment, des dilutions en série sont préparées jusqu'à 10^{-4} , à partir d'un millilitre de sédiment. Toutes les dilutions se font avec une solution de NaCl à 20 ‰ stérile. Sur les boîtes, 0,2 ml d'échantillon pur ou dilué sont étalés. et chaque étalement est fait en double.

Deux types de comptage sur boîte sont réalisés:

- des comptages non sélectifs permettant d'évaluer la proportion de bactéries cultivables.
- des comptages sélectifs visant à dénombrer certains groupes taxonomiques.

Pour les comptages non sélectifs, les échantillons sont étalés sur gélose marine (Difco 2216). Les boîtes sont incubées à la température du laboratoire et les colonies comptées 72 heures plus tard.

Pour les comptages sélectifs, différents milieux ont été utilisés pour évaluer la quantité de certaines populations. Pour compter les coliformes, les échantillons sont étalés sur milieu EMB (Eosin Methylen Blue) (Difco). Les boîtes incubées à 37°C vont permettre de compter les coliformes totaux, alors qu'à 44°C, seuls les coliformes fécaux pousseront. Les vibrions sont sélectionnés sur milieu TCBS (Thiosulfate Citrate Bile Salt) (Difco) et les boîtes sont mises à incuber à 37°C pendant 48 heures.

5 - La collection bactérienne

Les souches sont isolées à partir des boîtes de comptages sur TCBS et sur agar marin. Cinq souches par boîtes d'agar marin sont prélevées au hasard à l'aide d'une grille. Pour les boîtes de TCBS, toutes les colonies se différenciant des autres sont isolées. Les souches isolées sont repiquées au minimum 2 fois pour obtenir des cultures pures. Une colonie par boîte est ensuite transférée dans un pilulier pour constituer la collection. Un état frais permet de vérifier la pureté de la souche.

Au total, 176 souches ont été isolées (tableaux 2 et 3). Au cours des repiquages, 23 souches ont été perdues.

STATION	SERIE 1		SERIE 2	
	milieu 2216	milieu TCBS	milieu 2216	milieu TCBS
1	0	2	5	4
2	5	1	5	4
3	5	3	5	6
4	0	3	5	7
5	0	0	5	5
6	0	1	5	10

Tableau 2: Nombres de souches isolées à partir des échantillons de sédiment

STATION	SERIE 1		SERIE 2	
	milieu 2216	milieu TCBS	milieu 2216	milieu TCBS
1	5	3	5	1
2	5	2	5	3
3	5	4	5	2
4	5	2	5	4
5	5	2	5	4
6	5	0	5	3

Tableau 3: Nombre de souches isolées à partir des échantillons d'eau

6 - Analyse des caractères morphologiques et physiologiques

Pour chaque souche, 37 caractères morphologiques et physiologiques (annexe 3) ont été étudiés:

- aspect des colonies sur boîte (forme, consistance, couleur, luminescence...).
- morphologie des bactéries au microscope optique (bâtonnet, coque, cellule en paire, chaîne, mobilité...).
- coloration de Gram.

Les souches luminescentes sont repérées à l'obscurité, après culture sur gélose marine complémentée par du carbonate de calcium à raison de 1 g/l de milieu. Les souches produisant un pigment fluorescent sont mises en évidence avec un éclairage à la lampe de Wood, après culture sur agar marin.

7 - Analyse des caractères biochimiques

Au total, 15 caractères biochimiques ont été étudiés. L'oxydation et la fermentation du glucose, la production d'exoenzymes et la croissance dans différentes conditions ont été testées (annexe 3).

Pour chaque caractère biochimique étudié, un milieu spécifique est nécessaire (annexe 4). L'uréase est mise en évidence par la couleur rose du milieu, résultat d'une alcalinisation. La présence d'amylase est recherchée sur le milieu 2216 (Difco) complémenté avec 10 g/l d'amidon et révélée par du lugol. La DNase est testée sur le milieu 5174 (Mérieux) et la réaction est révélée avec une solution à 1 % de bleu de toluidine. La phosphatase libère du paranitrophénol (couleur jaune) dans un milieu contenant du PNPP-Na (para nitrophényl phosphate de sodium). La catalase et l'oxydase sont recherchées sur le milieu 2216 Difco. La catalase est révélée par l'eau oxygénée et l'oxydase par du diméthyl-p-phénylène diamine en solution.

Chaque souche a été testée pour ses capacités à croître à trois températures, 4°C, 37°C et à 44°C (sur agar marin) ainsi qu'à 2 salinités, 0 ‰ et 100 ‰ (Nutrient agar, Difco, complémenté en NaCl ou pas).

L'étude biochimique nécessite l'utilisation de cultures jeunes (48 heures). Avant chaque manipulation, des ensemencements sur boîtes ou directement en tubes dans un milieu liquide sont préparés et c'est à partir de ces cultures que les prélèvements pour les tests sont effectués. Les cultures sur boîtes sont d'abord mises en solution dans de l'eau de mer stérile (annexe 5). Pour les antibiotiques, le protocole d'obtention des cultures jeunes sera le même.

8 - Résistances aux antibiotiques

8.1 - Les antibiotiques testés

La résistance à 9 antibiotiques a été recherchée chez toutes les souches de la collection. Le choix des antibiotiques a été guidé par la fréquence d'utilisation de certains antibiotiques par les aquaculteurs.

La fluméquine (BioMérieux), le chloramphénicol (BioMérieux), la furazolidone (Sigma), l'acide oxolinique (Sigma) et l'oxytetracycline commandée chez Sigma ou provenant du stock d'un aquaculteur ont donc été testés. Trois autres antibiotiques classiques ont été utilisés: la pénicilline, la kanamycine et l'érythromycine.

- Quelques antibiotiques commercialisés pour l'aquaculture

La fluméquine est vendue sous 2 formes: le fluméquil et la fluméquine 50%. Pour 100 g de fluméquil, on trouve 3 g de fluméquine, 1,8 g de carbonate de sodium et 95,2 g de lactose. La fluméquine 50% est composée de 50 g de fluméquine et de 100 g d'excipient lactose. La fluméquine est utilisée en traitement contre toutes les bactérioses (Furonculose, Yersiniose, Vibriose, Myxobactériose). Elle est conditionnée sous forme de poudre blanche et administrée par voie orale dans les aliments à raison de 12 mg de fluméquine pure par kilogramme de poids vif.. Il est recommandé d'attendre une semaine avant de livrer les poissons traités à la consommation humaine.

Le chloramphénicol se présente sous la forme d'une poudre blanche. Il est administré par voie orale à raison de 80 mg par kilogramme de poids vif ou par balnéation à raison de 20 mg par litre. Le chloramphénicol traite les mêmes maladies que la fluméquine ainsi que les septicémies bactériennes. Après traitement au chloramphénicol, il est recommandé d'attendre 3 semaines avant de livrer les poissons à la consommation humaine.

L'oxytétracycline se présente sous la forme d'une poudre jaune. Elle est administrée aux mêmes doses que le chloramphénicol et traite les mêmes maladies. Il est aussi recommandé d'attendre 3 semaines avant de commercialiser le poisson.

8.2 - Mise en évidence des résistances

Pour tous les antibiotiques testés, le niveau de résistance n'a pas été recherché mais seule la présence ou l'absence de résistance a été notée.

Les cultures jeunes sont étalées sur agar marin et les antibiotiques sont déposés soit sous forme de pastilles (pénicilline, kanamycine, fluméquine, chloramphénicol et érythromycine) ou sous forme de poudre (furazolidone, acide oxolinique et oxytétracycline). Après 24 heures d'incubation à la température du laboratoire, l'absence ou la présence d'un halo d'inhibition autour des antibiotiques est noté.

9 - L'analyse des données

Tous les résultats des tests morphologiques, physiologiques et biochimiques sont codés pour le programme informatique, en mode binaire, 1 pour la présence et 0 pour l'absence. Pour les antibiotiques, la résistance est notée 0 et la sensibilité 1.

Sur une première carte, sont notés les résultats des études morphologiques, physiologiques et biochimiques et sur la deuxième les résultats des tests de résistance aux antibiotiques (annexe 3).

La comparaison des souches est effectuée selon le principe adansonien, tous les caractères ayant un poids égal.

L'analyse comparative s'effectue selon la métrique du KHI^2 et l'agglomération des souches suivant le principe de la variance.

La distance du KHI² (Benzecri, 1973) entre deux souches se calcule suivant la formule suivante:

$$D^2 (J_1, J_2) = \sum_{i=1}^{i=n} 1 / F_i [f_i J_1 / F_{J_1} - f_i J_2 / F_{J_2}]^2$$

D (J1, J2): distance taxonomique entre 2 souches J1 et J2

F_i: somme des réponses positives de l'ensemble des souches pour le test i

f_i J₁: réponse de la souche J_i pour le caractère i considéré

F J₁: ensemble des réponses positives de la souche J₁ à tous les tests

N: nombre de tests

L'agrégation des souches se fait suivant la variance et la distance entre les groupes est calculée de la manière suivante:

$$D (a, b) = (A \cdot B) / (A + B) [a - b]^2$$

[a - b]²: somme des carrés des distances taxonomiques entre les différents éléments des groupes a et b

A et B: effectifs des groupes a et b

L'ensemble des résultats est donné sur un dendrogramme.

10 - Séquençage et identification

Deux souches (numéros 44 et 129) ont été choisies parmi les 153 souches de la collection pour être séquencées et identifier. Ces deux souches ont été envoyées au laboratoire du Dr. R. Christen pour être séquencées et identifiées.

RESULTATS

1 - Dénombrement des bactéries totales et des bactéries cultivables

Les résultats des comptages pour l'eau et le sédiment ne varient pas beaucoup entre la situation de mer calme et la situation de mer agitée. Dans tous les cas, épifluorescence, milieu sélectif et non sélectif, il y a entre 100 et 1000 fois plus de bactéries dans le sédiment que dans l'eau.

Dans le sédiment (tableau 4) pour les stations 2, 3 et 4, le maximum de bactéries a été trouvé pour les échantillons de la première série, c'est à dire pour la situation de mer agitée. Aux stations 1, 5 et 6 c'est pendant la période de temps calme que la plus grande quantité de bactéries a été comptée. Les stations 3 et 6 se situent sous les filières à moules et la station 2 entre deux zones de filières. La station 4 se situe, elle, sous les parcs à poissons. Les stations 1 et 5 sont à l'entrée de la baie pour la 1 et en fond de baie pour la 5.

Dans l'eau (tableau 4), par temps venté, les bactéries sont en plus grand nombre aux stations 2 et 4, et par temps calme, c'est aux stations 3 et 6 que le maximum est trouvé. Pour la station 5, le nombre de bactéries totales par mer agitée n'a pas été déterminé et le nombre de bactéries n'a pas varié à la station 1 entre les deux prélèvements.

STATION	SEDIMENT 1	SEDIMENT 2	EAU 1	EAU 2
1	2 ± 0,4	2,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,2 ± 0,3
2	2,4 ± 0,5	2,3 ± 0,3	1,5 ± 0,2	1,3 ± 0,3
3	3 ± 0,6	2,9 ± 0,5	1,8 ± 0,4	3,4 ± 0,7
4	2,4 ± 0,4	2 ± 0,3	1,9 ± 0,3	1,5 ± 0,4
5	1,2 ± 0,4	2,1 ± 0,4	-	2,4 ± 0,4
6	1,7 ± 0,5	2,9 ± 0,5	1,4 ± 0,3	2,6 ± 0,5

Tableau 4: Nombres totaux de bactéries et écart-types exprimés en 10^9 ml⁻¹ pour le sédiment et 10^6 ml⁻¹ pour l'eau

Au niveau du sédiment, les comptages de bactéries viables diffèrent nettement entre la période de temps calme (série 2) et celle de vent (série 1). Par temps calme, la quantité de bactéries viables est plus importante que lorsqu'il y a du vent (tableau 5). Par contre, dans l'eau, les bactéries viables sont plus nombreuses quand l'eau est agitée (exception faite des stations 4 et 5).

STATION	SEDIMENT 1	SEDIMENT 2	EAU 1	EAU 2
1	0,052 ± 0,064	3,5 ± 0,03	1,3 ± 0,03	0,56 ± 0,03
2	2 ± 0,8	1,9 ± 0,08	1,5 ± 0,3	0,43 ± 0,17
3	12 ± 5,9	35 ± 6,2	3,4 ± 0,3	3,1 ± 2,1
4	9 ± 3,1	12 ± 0,003	0,42 ± 0,1	1,7 ± 0,8
5	0,3 ± 0,1	5,6 ± 0,2	1,3 ± 0,2	1,6 ± 0,07
6	4 ± 1,7	44 ± 1,5	0,6 ± 0,01	0,43 ± 0,07

Tableau 5: Nombre de bactéries et écart-types se développant sur gélose marine (2216) en 10^5 ml⁻¹ pour le sédiment et 10^3 ml⁻¹ pour l'eau

2 - Les coliformes

La quantité de coliformes comptés sur milieu EMB est beaucoup plus importante dans les échantillons de la première série de prélèvement, c'est à dire en période de mer agitée (tableau 6). Mais il y a 1000 fois plus de coliformes dans le sédiment que dans l'eau.

STATION	SEDIMENT 1	SEDIMENT 2	EAU 1	EAU 2
1	10,7 ± 11,2 (10 ± 14,1)	8,2 ± 2,4 (4,2 ± 3,8)	7 ± 5 (1 ± 1,8)	21 ± 5,3 (4 ± 2,7)
2	3,3 ± 2,8 (3,1 ± 2,7)	5,1 ± 3,3 (0,91 ± 1,5)	60 ± 21,2 (26 ± 3,9)	3 ± 3,5 (3 ± 3,6)
3	19,6 ± 7,6 (18 ± 9,7)	12 ± 10,7 (9,6 ± 8,8)	70 ± 4,6 (54 ± 6,3)	10 ± 14 (5,5 ± 5)
4	5 ± 4,4 (2,9 ± 4,1)	1,5 ± 0,8 (1,3 ± 1,2)	128 ± 102 (1 ± 0,2)	16 ± 12 (4 ± 5,4)
5	3,2 ± 3,8 (1,2 ± 1,7)	2,6 ± 4,6 (1,6 ± 2,8)	131 ± 8,83 (1 ± 0,8)	3 ± 4,4 (1 ± 1,7)
6	6,4 ± 9,6 (6,2 ± 9,3)	5,3 ± 4 (2,1 ± 6,3)	-	30 ± 10 (3 ± 3,1)

Tableau 6: Nombre de coliformes totaux et (coliformes fécaux) et écart-types en 10^3 ml⁻¹ pour le sédiment et bactéries ml⁻¹ pour l'eau

Les pourcentages de coliformes fécaux par rapport aux coliformes totaux ont été calculés et sont donnés sur la figure 5. Pour la majorité des stations, les coliformes fécaux sont trouvés en plus grande quantité dans le sédiment. Mais aux stations 2 et 3, c'est dans l'eau que l'on trouve le plus de coliformes fécaux. Ces deux stations se situent soit à proximité d'une exploitation de moules, soit directement sous les filières à moules.

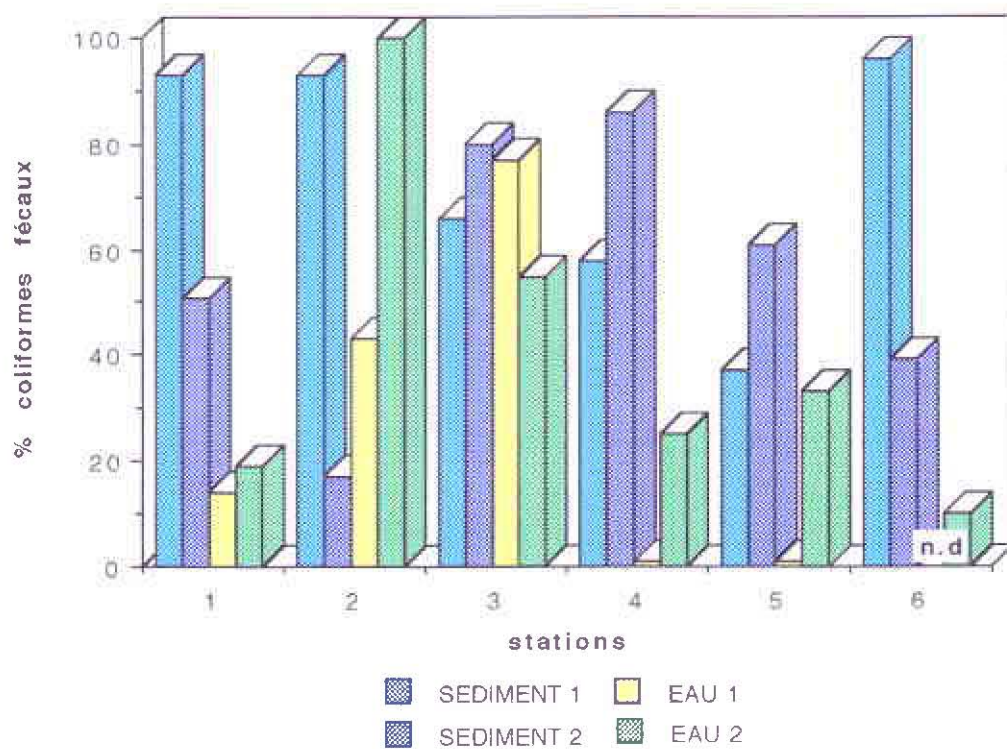


Figure 5: Pourcentages de coliformes fécaux par rapport aux nombres de coliformes totaux dans l'eau et le sédiment

3 - Les vibrios

Pour tous les échantillons d'eau de la série 1 et de la série 2, très peu de vibrios ont été dénombrés. Par contre de fortes concentrations ont été trouvées dans le sédiment par temps calme, avec des maxima aux stations 4 et 6 (tableau 7).

STATION	SEDIMENT 1	SEDIMENT 2	EAU 1	EAU 2
1	1,66 ± 2,8	26 ± 26	1 ± 1,2	1 ± 0,7
2	0,83 ± 1,4	84 ± 145	3 ± 2,3	2 ± 1,7
3	10 ± 17,3	77 ± 92	4 ± 4,3	3 ± 2,2
4	4,16 ± 5,2	230 ± 3,79	1 ± 0,6	3 ± 1,7
5	0	46 ± 59	2 ± 1,2	4 ± 4,4
6	0,83 ± 1,4	590 ± 488	-	3 ± 3,3

Tableau 7: Nombre de bactéries et écart-types se développant sur milieu TCBS en 10^2 ml⁻¹ pour le sédiment et bactéries ml⁻¹ pour l'eau

4 - Les résultats taxonomiques

La méthode d'analyse des souches par classification hiérarchique ascendante a permis de construire le dendrogramme de la figure 6. Le dendrogramme laisse apparaître deux grands groupes, un rassemblant les souches fermentatives et un rassemblant les souches non fermentatives, et un petit groupe excentré qui sera le phénon 1. Au total, 19 phénons constituent le dendrogramme. Pour chaque phénon, la forme, le Gram, la présence ou l'absence de spore et l'activité catalase ou oxydase sont précisés; les résultats de l'analyse des autres caractères sont donnés en annexe 4. En général, les souches sont rassemblées suivant leur origine, eau ou sédiment. Dans le groupe des souches non fermentatives, on trouve une majorité de souches provenant d'échantillons d'eau, et dans celui des fermentatives, des souches provenant d'échantillons de sédiment.

Le phénon 1 est constitué par des coques, Gram positif, non fermentatives. Ces souches alcalinisent le milieu glucose et ne sont pas sporulées. Elles sont toutes catalase positive.

Le groupe des souches non fermentatives rassemble 6 phénons (n° 2 à 7) contenant presque exclusivement des souches provenant de l'eau; sur 48 souches du groupe, seules 8 sont issues du sédiment.

Phénon 2: coques en tetrades, Gram négatif.

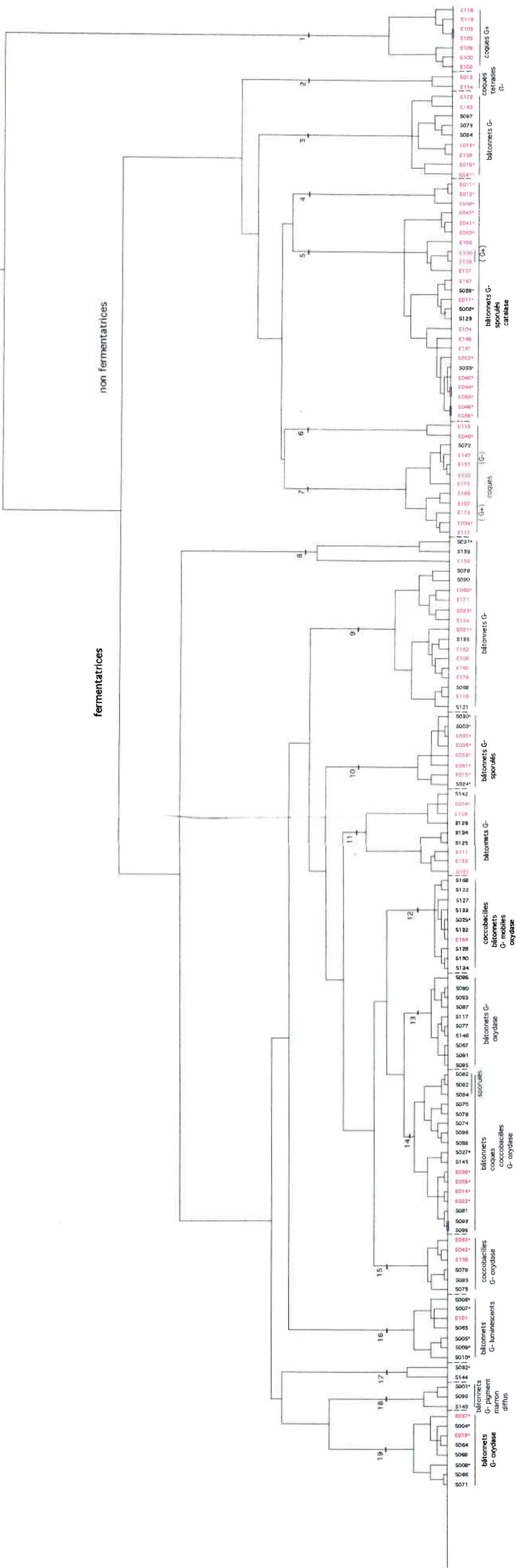


Figure 6: Classification hiérarchique des 153 souches (* souches de la première série d'échantillons, E= eau et S= sédiment)

Phénon 3: bâtonnets, Gram négatif, catalase positive et pour certains oxydase positive, présence ou absence de spore suivant les souches.

Phénon 4: bâtonnets en chaîne, Gram négatif, catalase positive, présence de spores.

Phénon 5: ce phénon a été divisé en 4 sous phénons.

- sous-phénon 5.1: bâtonnets, Gram négatif, non oxydatifs sur glucose, catalase positive, présence de spores.

- sous-phénon 5.2: bâtonnets, Gram positive, catalase positive, présence de spores.

- sous-phénon 5.3: bâtonnets, Gram négatif, catalase positive et pour certains oxydase positive, présence de spores.

- sous-phénon 5.4: bâtonnets, Gram négatif, présence de spore.

Phénon 6: coques, bâtonnets, Gram variable, présence de spores.

Phénon 7:

- sous-phénon 7.1: coques, Gram négatif, absence de spore.

- sous-phénon 7.2: coques, Gram positif, absence de spore.

Le groupe des souches fermentatives rassemble 12 phénons (n° 8 à 19). Les phénons 8,9,10 et 11 sont des phénons où l'on trouve des souches issues de l'eau et des souches issues du sédiment. Les phénons 12 à 19 regroupent des souches du sédiment (sur 51 souches, 40 sont issues du sédiment).

Phénon 8: bâtonnets, Gram négatif, catalase active, présence ou absence de spore selon la souche

Phénon 9: cocobacilles, Gram négatif, catalase et oxydase actives, absence de spore.

Phénon 10: bâtonnets, Gram négatif, polymorphisme, présence ou absence de spores selon la souche.

Phénon 11: bâtonnets, Gram négatif, groupement de cellules en amas, absence de spore.

Phénon 12: bâtonnets, Gram négatif, catalase et oxydase actives, absence de spore.

Phénon 13: bâtonnets, Gram négatif, catalase et oxydase actives, absence de spore.

Phénon 14:

- sous-phénon 14.1: bâtonnets, Gram négatif, Présence ou absence de spore selon les souches.

- sous-phénon 14.2: coques, Gram négatif, catalase et oxydase active, absence de spore.

- sous-phénon 14.3: cocobacilles, Gram négatif, catalase et oxydase actives, absence de spore.

Phénon 15: cocobacilles, Gram négatif, catalase et oxydase actives, absence de spore.

Phénon 16: bâtonnets, Gram négatif, luminescence, catalase et oxydase actives, absence de spore. Ce phénon doit représenter le groupe des *Vibrios*.

Phénon 17: bâtonnets, Gram négatif, catalase active.

Phénon 18: bâtonnets, Gram négatif, présence d'un pigment marron diffusible dans la gélose. Ce phénon doit représenter le groupe des *Aéromonas*..

Phénon 19: bâtonnets, Gram négatif, catalase et oxydase actives, absence de spore.

5 - Les résistances aux antibiotiques

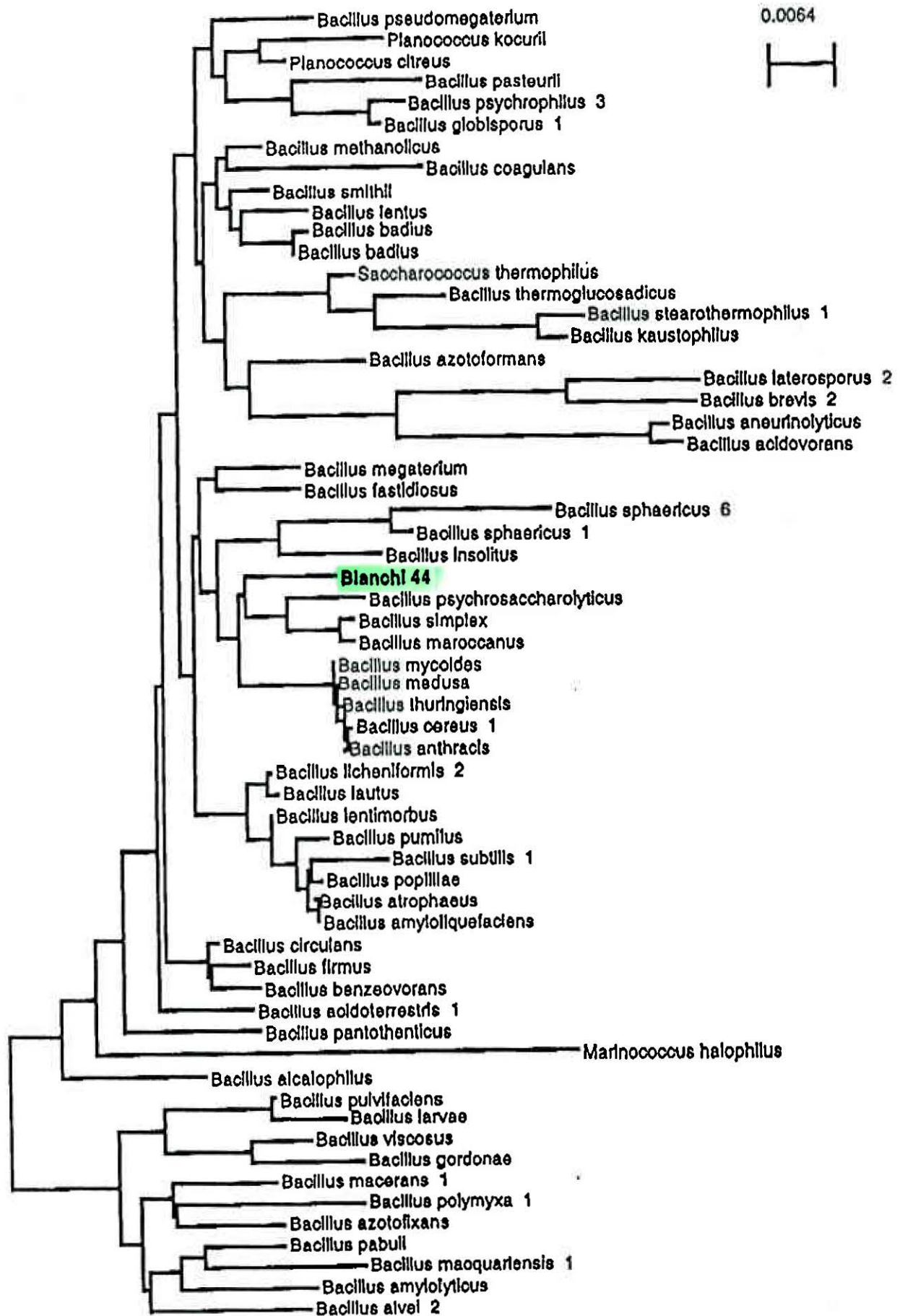
Pour tous les antibiotiques testés, des pourcentages de souches résistantes ont été notés (tableau 8). La résistance la plus répandue est la résistance à la pénicilline; plus d'une souche sur deux y est résistante. La kanamycine provoque elle aussi, un taux important de résistance. La fluméquine est l'antibiotique qui a le moins d'action sur les souches de la baie du Lazaret. L'antibiotique le plus efficace actuellement est l'oxytétracycline. On peut noter une légère différence d'efficacité entre l'oxytétracycline pure et celle des aquaculteurs, peut-être due au degré de pureté et aux conditions de stockage. Le pourcentage de souches résistantes au chloramphénicol, à la furazolidone et à l'acide oxolinique est plus faible que pour la fluméquine mais tout de même non négligeable.

ANTIBIOTIQUES	% DE RESISTANCE
PENICILLINE	54,25
KANAMYCINE	46,41
FLUMEQUINE	33,99
ERYTHROMYCINE	24,84
AC. OXOLINIQUE	20,26
FURAZOLIDONE	17,65
CHLORAMPHENICOL	13,07
OXYTETRACYCLINE aquaculteurs	4,58
OXYTETRACYCLINE	1,96

Tableau 8: Pourcentages de résistance des souches aux 9 antibiotiques testés

6 - Une nouvelle espèce de *Bacillus*

Les deux souches données à séquencer sont deux espèces de *Bacillus*. L'une des deux est une nouvelle espèce. Il s'agit de la souche 44 (voir situation phylogénique sur l'arbre). La deuxième n'est pas encore située par rapport aux autres *Bacillus* (résultats à venir).



Situation phylogénétique de la souche 44. Résultats communiqués par le Laboratoire du Dr. R. Christen.

DISCUSSION

Plusieurs points ont été étudiés: l'effet de la remise en suspension des particules du sédiment et des souches s'y trouvant ainsi que le rôle possible du sédiment dans la survie de certaines bactéries provenant directement de l'aquaculture. L'impact de cette aquaculture sur la diversité des communautés bactérienne du sédiment et de l'eau a aussi été abordé.

Les deux campagnes de prélèvement se sont déroulées avec des conditions météorologiques bien différentes. Pourtant, lors des comptages directs en épifluorescence permettant d'évaluer la microflore totale, aucune différence notable n'a été mise en évidence entre la situation de vent donc de remise en suspension et la situation en absence de vent. Mais les prélèvements en période de vent se sont effectués 24 heures après un coup de mistral. Une étude faite par Ifremer (Arnal & Romana, 1990) a montré que le maximum de remise en suspension des particules sédimentaires et des bactéries (Coliformes) pendant un coup de vent apparaissait au bout de 48 heures. On peut donc supposer que la remise en suspension lors de nos prélèvements n'avait pas encore eu lieu. Ce temps de latence avant la remise en suspension pourrait aussi s'expliquer par la présence des parcs à poissons et des filières qui sont des obstacles à la circulation des courants marins (Videau & Merceron, 1992).

Cependant, la remise en suspension des sédiments devait avoir commencé car au niveau des comptages des bactéries viables il y a une différence entre les deux situations de prélèvement. En effet, le nombre de bactéries viables en période de vent, diminue dans le sédiment pour augmenter dans l'eau, ce qui impliquerait que le sédiment joue le rôle de réservoir de bactéries viables; ces bactéries pouvant être inoffensives ou pathogènes pour les animaux. Ce résultat peut laisser supposer que lors de la coloration des bactéries avec le DAPI pour les comptages en épifluorescence, des bactéries non viables peuvent être marquées et provoquer une surestimation du nombre de bactéries viables (Kogure *et al.*, 1979).

Pour notre collection de bactéries, presque 90 % des souches étudiées sont Gram négatif (annexe 6). Ce pourcentage élevé reflète bien la tendance en milieu marin à la prédominance des bactéries Gram négatif (Bensoussan & Bianchi, 1983). Un tiers des souches sporulent, ce qui est une proportion importante. Le plus surprenant est la localisation de ces souches sporulantes; en effet, la plupart du temps, on les trouve dans la colonne d'eau (Bensoussan & Bianchi, 1983). Un autre point intéressant est le pourcentage de bactéries luminescentes, plus de 4 % ce qui est important car ces souches représentent le groupe des Vibrionacés. Parmi toutes les bactéries étudiées nous arrivons à un pourcentage important de bactéries fermentatrices du glucose (65 %). De plus les

souches sont très bien équipées en exoenzymes (forts pourcentages de réponses positives pour la phosphatase, la gélatinase, l'amylase et la DNase). L'activité fermentatrice et la présence des exoenzymes sont le reflet d'une bonne adaptation à des milieux naturels riches en matière organique peu ou pas dégradé. La présence de grande quantité de matière organique dans le milieu entraîne une diminution de l'oxygène à cause de l'activité bactérienne qui le consomme et par l'accumulation de cette matière organique sur le sédiment. Ainsi, la plus grande partie de nos souches fermentatrices ont été isolées des échantillons de sédiment.

Le rôle de conservation des bactéries par le sédiment apparait bien pour les coliformes. La quantité de coliformes augmente dans l'eau lors de la remise en suspension des particules sédimentaires. Dans l'étude faite par Ifremer (Arnal & Romana, 1990), il a été mis en évidence l'augmentation de coliformes fécaux dans les coquillages 48 heures après un coup de vent d'est.

Au niveau des coliformes fécaux, leur présence est toujours plus importante dans les sédiments que dans l'eau, sauf aux stations 2 et 3. Ces stations se situent sous des filières à moules ou à proximité immédiate. Les moules produisant une grande quantité de pelotes fécales (Shcherbakov, 1988), il y a toujours des biodépôts sous ces filières ce qui expliquerait la présence continue de coliformes dans l'eau.

L'étude phénotypique des souches isolées a permis de mettre en évidence un phénon regroupant des bactéries luminescentes correspondant certainement à des vibrions. Mais ces vibrions n'ont été dénombrés que dans le sédiment, en absence de vent et de remise en suspension. Ceci s'explique par le cycle annuel des vibrions. En effet, les vibrions ont deux localisations suivant la période de l'année. En automne et en hiver, lorsque la température de l'eau diminue, les vibrions survivent dans le sédiment. Au printemps et en été, ils repassent dans l'eau avec la remontée des températures (Colwell, et al., 1984; Kaper *et al.*, 1979; O'Neil *et al.*, 1992). La présence des vibrions est très souvent associée à des zones d'aquaculture (Prieur, 1985).

L'existence des parcs à poissons et des filières à moules agit sur les communautés bactériennes de deux façons. L'activité aquacole entraîne une augmentation de la quantité de matière organique disponible dans le milieu. Une étude a montré que 75 à 78 % du carbone fourni dans la nourriture des animaux sont perdus dans l'environnement (Hall *et al.*, 1990). Elle augmente aussi la disponibilité en azote, phosphore. 67 à 71 % de l'azote apporté dans la nourriture et 78 à 82 % du phosphore sont perdus dans l'environnement (Holby & Hall, 1991); (Hall *et al.*, 1992). D'autre part, elle apporte dans le milieu naturel des quantités d'antibiotiques telles que cela provoque des résistances et donc des sélections. Tous ces facteurs agissent au niveau de la diversité microbienne en la diminuant et peuvent entraîner le déséquilibre de la flore bactérienne. Ainsi, sous les

cages d'élevage, suite à l'enrichissement en matière organique, le sédiment a perdu tout potentiel de nitrification, ce qui témoigne de l'absence de bactéries nitrifiantes aérobies (Kaspar, et al., 1988). De même, l'érythromycine, à raison de 50 mg/l inhibe la nitrification pendant 14 jours alors que le chloramphénicol et l'oxytétracycline n'ont pas d'action. Or, dans notre cas, les communautés apparaissent comme diversifiées bien que les souches du sédiment soient relativement séparées des souches de l'eau. Cet état est peut être dû au fait que la remise en suspension n'était pas encore à son maximum lors de la première campagne. On note tout de même sur le dendrogramme des phénons dans lesquels se trouvent des souches de l'eau et du sédiment. Ces souches représentent certainement des souches capables de passer d'un compartiment à l'autre tout en survivant. Elles mettent en évidence le rôle de réservoir du sédiment et les échanges eau-sédiment.

Les stations de prélèvement ne peuvent pas être représentées par des phénons précis. Les souches de toutes les stations sont complètement mélangées. Mêmes les vibrions ne sont pas spécifiques à la station 4 qui se situe pourtant sous un parc à poissons. Les souches qui sporulent sont bien regroupées sur le dendrogramme et sont localisées à majorité parmi les souches issues de l'eau.

Les résultats des résistances aux différents antibiotiques étudiés sont difficilement explicables. En effet, il est difficile de savoir à quelle fréquence les aquaculteurs soignent leurs cheptels. Sur toutes les souches testées, 83,66 % sont résistantes à au moins un antibiotique. Les résistances à la pénicilline, kanamycine sont surprenantes car ces antibiotiques ne sont pas utilisés en aquaculture. Mais, l'apparition de souches résistantes se fait par l'acquisition de plasmides ou de facteurs de résistance. Les souches peuvent ainsi acquérir des gènes de résistance ou bien elles peuvent résister en altérant les mécanismes de perméation pour une drogue. Ce dernier point, peut expliquer les souches multirésistantes et l'apparition de résistance à des drogues autres que celles administrées (Nygaard *et al.*, 1992). Parmi tous les antibiotiques utilisés en aquaculture, la fluméquine semble provoquer le plus de résistance. Pourtant, d'autres études ont montré des taux de résistance faibles pour cette même fluméquine ou du moins une diminution rapide du nombre de souches résistantes (Hansen & Lunestad, 1993). On peut supposer que nos campagnes de prélèvement ont suivi une période de traitement par la fluméquine.

L'acide oxolinique et la furazolidone provoquent des taux de résistance proches. Cela peut être dû au fait que le traitement par l'acide oxolinique entraîne des phénomènes de résistance croisés pour l'acide oxolinique et la furazolidone (Nygaard, et al., 1992). Enfin, l'oxytétracycline couramment utilisée en aquaculture est un antibiotique à large spectre avec une activité considérable contre les bactéries Gram négatif. La résistance à l'oxytétracycline se rencontre chez les bactéries Gram négatif ainsi que chez les bactéries Gram positif (Jacobsen & Berglind, 1988). Cet antibiotique a un temps de résidence dans les sédiments variable suivant les conditions du milieu; il peut persister de 9 jours à plus

d'un an. Pourtant, pour les souches de la baie, c'est pour l'oxytétracycline que le plus faible taux de résistance a été obtenu.

Pour tous les antibiotiques, il est difficile de vraiment évaluer leur impact à cause du manque d'information sur la fréquence d'utilisation et les quantités déversées dans la baie ainsi que sur la liste exacte des antibiotiques réellement utilisés.

CONCLUSION

Ce travail est une approche préliminaire de l'impact des activités aquacoles sur les communautés bactériennes naturelles de l'eau et du sédiment. Il a permis de mettre en avant plusieurs points.

Les effectifs totaux de bactéries ont peu varié lors des deux situations météorologiques très différentes (mer calme et mer agitée). Par contre, en termes de microorganismes viables, le nombre augmente dans l'eau en situation de mer agitée. Ce résultat montre bien la difficulté des comptages bactériens en milieu naturel lorsqu'on cherche à définir la fraction métaboliquement active des communautés. Les deux types de comptages (microflore totale et microflore cultivable) sont donc souhaitables.

La présence des poissons et des moules et responsable en partie de la teneur en coliformes et coliformes fécaux et surtout de la présence de vibrios. Plusieurs genres et espèces ont été isolés, y compris des souches luminescentes. Ces vibrios, au moment de l'étude, se situaient dans le sédiment à cause de la saison mais au printemps avec la remontée des températures ils sont susceptibles de repasser dans l'eau et provoquer des épidémies dans les élevages. En effet, 99% des vibrios se trouvaient dans les échantillons de sédiment. Le même pourcentage de 99 % de coliformes sont aussi localisés dans le sédiment. Curieusement, c'est dans l'eau qu'un grand nombre de bactéries sporulées a été mis en évidence.

Nous avons aussi montré le rôle de réservoir potentiel de bactéries joué par le sédiment. Mais cette étude a également montré quelques phénomènes rassemblant des souches de l'eau et du sédiment. Par contre, l'analyse de la diversité des communautés bactérienne, ne semble pas avoir mis en évidence de diminution de la diversité entre les stations directement soumises à l'impact des cages d'aquaculture. Mais des études dans des situations climatiques variées sont nécessaire pour pouvoir confirmer ce point.

Cette étude a aussi mis en évidence l'impact des antibiotiques sur les communautés bactériennes. En effet, nous avons pu noter que environ 84 % des souches sont résistantes pour au moins un antibiotiques et que de nombreuses souches sont multirésistantes. Des résistances pour la pénicilline et la kanamycine ont même été observé bien que ces antibiotiques ne soient pas utilisés en aquaculture.

Ce travail a représenté une première étape dans l'étude d'impact des fermes aquacoles. Par la suite il sera nécessaire d'aborder la diversité taxonomique bactérienne non seulement par l'étude phénotypique mais aussi par le biais de séquençage d'ARN 16S. Une autre méthode qui pourra apporter de nouvelles informations sera la technique

globalisante de l'analyse des ARNs de faible poids moléculaire (ARN 5S, ARNr et ARNt).

L'étape supplémentaire sera d'utiliser des sondes moléculaires, une sonde universelle permettant d'évaluer les effectifs d'une communauté et des sondes spécifiques à certaines espèces présentant un intérêt dans la détérioration de la qualité du milieu naturel.

L'aquaculture prenant de l'essor, il est nécessaire dans l'avenir de suivre l'évolution du milieu naturel et de mesurer et prévoir les perturbations entraînées.

Annexe 1

COMPTAGE DIRECT SUR L'EAU

9 ml échantillon EAU + 1 ml formol 20 %



ULTRASONS 2 mn puissance 3
60 % efficacité



préparation **FILTRATION**
2 ml échantillon formolé



6 gouttes DAPI (conc. finale 10 µg/ml)
INCUBATION 10 mn (obscurité)



FILTRATION sur filtre noir



dépôt du filtre sur lame pour **COMPTAGE**
par Analyse d'images

FILTRATION: - support de filtre Whatman GFF (uniformisation de la filtration)
- filtre noir 0,2 µm Nuclepore

LAME -huile à immersion Olympus pour microscope à fluorescence nd=1,404

COMPTAGE DIRECT SUR LE SEDIMENT

DILUTION sédiment (1ml + 9ml de NaCl à 20 ‰)

9 ml + 1ml de **FORMOL** 20 %, Agitation

1ml + 9 ml $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ C° finale 3 mM

REPOS 20 mn

ULTRASONS 2*1 mn puissance 3, 60 % efficacité

Aliquot de 100 μl + 10 ml eau de mer distillée
contenant 0,25 % de formaldéhyde et 0,05 % de sodium azide

3 ml + 8 gouttes de **DAPI** (conc. finale: 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)
Agitation et **STOCKAGE** à 4°C à l'obscurité de 1 à 12 heures

Agitation

FILTRATION sur filtre Nuclepore noir 0,2 μm

dépôt du filtre sur lame pour **COMPTAGE MANUEL**
(40 champs et 30 à 50 bactéries par champs comptés)

Annexe 3

CARTE 1

<u>Caractères</u>	<u>Colonnes</u>
col. lisse	1
rueuse	2
muqueuse	3
opaque	4
translucide	5
bord régulier	6
dentelé	7
rhizoïde	8
col. envahissante	9
microcolonie	10
col. incrustante	11
filante	12
beige	13
rose	14
blanche	15
jaune orange	16
rouge	17
violette	18
pigment diffus	19
luminescence	20
fluorescence	21
coque	22
cocobacille	23
batônnet	24
filament	25
polymorphisme	26
cellules en paire	27
chaînette	28
chaîne	29
tetrade	30
amas	31
palissade	32
spore	33
mobilité	34
gram +	35
gram-	36
gram variable	37
oydase	38
catalase	39
oxyd. glucose	40
ferm. glucose	41
uréase	42
phosphatase	43
amylase	44
gélatinase	45
DNAse	46
agarolyse	47
croissance 4°C	48
37°C	49
44°C	50
S ‰ = 0	51
S ‰ = 100	52

CARTE 2

<u>Caractères</u>	<u>Colonne</u>
penicilline	1
kanamycine	2
fluméquine	3
chloramphénicol	4
érythromycine	5
furazolidone	6
oxytetracycline	7
ac. oxolinique	8
oxytetracyline aquac.	9

Annexe 4

MILIEUX

OXYDATION DU GLUCOSE:

-milieu de Hugh et Leifson	9,8 g	
-NaCl	15 g	
-glucose	10 g	
-agar	12,5 g	
-H ₂ O q.s.p	1000 ml	pH= 7,1

Réaction positive: couleur jaune

Lecture: 24 h-48 h

2 boîtes par série de 20 souches

FERMENTATION GLUCOSE:

Même milieu que pour l'oxydation du glucose sauf l'agar qui est à 2,5 g.

Faire fondre le milieu puis répartir dans des tubes à hémolyse (3ml/tube). Cotonner les tubes puis autoclaver à 120°C pendant 20 mn. Conserver les tubes au froid. Sortir 2 tubes par souche, les mettre au bain marie bouillant pendant 2 à 3 mn puis les plonger dans la glace fondante pour évacuer les éventuelles bulles d'air.

Ensemencer au fond du tube puis mettre un peu de parafine dans chaque tube.

Réaction positive: couleur jaune

Lecture: 48 h-72 h

UREASE

-urée	20 g	
-KH ₂ PO ₄	1 g	
-NaCl	1 g	
-rouge de phénol	0,025 g	
-alcool 95%	10 ml	
-H ₂ O q.s.p.	1000 ml	pH= 6,4

Stériliser par filtration uniquement. Garder en flacon stérile au froid. Répartir en tube à hémolyse au dernier moment (2ml).

Réaction positive: couleur rose

Lecture: 48 h- 72 h

2 tubes par souche.

PHOSPHATASE

Préparer une solution mère.

-P.N.P.P. Na	2 g	
-Tris-HCl	50 ml	
-H ₂ O	100 ml	pH= 7,1

(P.N.P.P. Na: di sodium nitro-4-phényl -phosphate, Na₂ C₆H₄NO₆P, 6H₂O)

Solution Tris-HCl:

-Tris	1 M
-HCl	1 N

50 ml Tris + 40 ml HCl pH= 7

Stériliser la solution mère par filtration et rajouter à de la gélose marine (2216) prêt à couler à raison de 10 ml par litre d'agar.

Réaction positive: auréole jaune autour des colonies

Lecture: 24 h

2 boîtes par série de 20 souches

AMYLASE

-amidon soluble	1,5 g	
-gélose marine (2216)	1000 ml	pH= 6,8

Stériliser à 110°C

Réactif: lugol

Réaction positive: auréole jaune translucide sur fond noir

Lecture: 24 h-48 h-72 h

3 boîtes par série

GELATINASE

-gélatine	11 g	
-gélose marine	1000 ml	pH= 7,5

Stériliser à 110°C.

Réactif:	HgCl ₂	15 g
	HCl 37 %	20 ml
	H ₂ O	100 ml

Réaction positive: auréole blanche opaque

Lecture: 24 h-48 h-72 h

3 boîtes par série

DNase

-milieu DNase (Mérieux)	42 g
-NaCl	20 g
-H ₂ O	1000 ml

Stériliser .

Réactif: bleu de toluéidine à 0,1 %

Réaction positive: auréole rose sur fond bleu

Lecture : 24 h-48 h-72 h

3 boîtes par série

TESTS BIOCHIMIQUES

**Ensemencement sur gélose marine
(ou en milieu nutritif sans agar)
48 heures**



**Suspension concentrée de chaque souche
dans de l'eau de mer stérile**



**Ensemencement par distributeur automatique
20 souches par boîte
(sauf pour l'uréase et la fermentation, voir annexe 4)**



**Lecture à 24, 48 et 72 heures
(pour certains tests, 24 heures uniquement)**

Annexe 6

**POURCENTAGES DE REponses POSITIVES POUR LES
CARACTERES MORPHOLOGIQUES, PHYSIOLOGIQUES ET
BIOCHIMIQUES ETUDIES**

CARACTERES	%
col. lisse	94,12
rugueuse	5,88
muqueuse	1,96
opaque	90,85
translucide	8,50
bord régulier	89,54
dentelé	10,46
rhizoïde	0
col. envahissante	0
microcolonie	9,15
col. incrustante	6,54
filante	0
beige	11,76
rose	5,88
blanche	65,36
jaune orange	16,99
rouge	0
violette	0
pigment diffus	2,61
luminescence	4,58
fluorescence	0
coque	21,57
cocobacille	23,53
bâtonnet	52,94
filament	0,65
polymorphisme	7,19

CARACTERES	%
cellules en paire	12,42
chaînette	6,54
chaîne	1,96
tetrade	1,31
amas	5,23
palissade	0
spore	29,41
mobilité	30,72
gram+	9,80
gram-	88,89
gram variable	1,31
oxydase	63,40
catalase	83,01
oxyd. glucose	66,01
ferm. glucose	65,36
yréase	16,99
phosphatase	50,98
amylase	60,13
gélatinase	52,94
DNase	48,37
agarolyse	1,31
croiss. 4°C	19,61
croiss. 37°C	78,43
croiss. 44°C	30,07
S‰	47,06
S‰	33,33

BIBLIOGRAPHIE

Ansart C. 1989. *Contribution à l'étude de la qualité des eaux ainsi que des moules et des lours qui sont élevés en baie du Lazaret..* Rapp. de stage/Direction Départementale des Affaires Maritimes. 56 pp.

Arnal O. & Romana L.A. 1990. *Qualité du milieu marin et effets de la remise en suspension des sédiments sur un site conchylicole méditerranéen..* Rapp. IFREMER, DRO/EM. 120 pp.

Atlas R.M. & Bartha R. 1981. *Microbial ecology: fundamentals and applications..*Addison-Wesley publishing company, Reading Ms. 560. pp.

Austin B. 1988. *Marine Microbiology.* Cambridge University Press, Cambridge, New York, 222 pp.

Bensoussan M. & Bianchi A. 1983. Distribution et activité catabolique potentielle des communautés bactériennes des eaux et sédiments profonds prélevés sur diverses marges continentales. In: *Géochimie organique des sédiments marins.* C.N.R.S. (Ed.), Paris. pp. 39-72.

Benzecri J.P. 1973. *L'analyse des données. I. La taxonomie.* .Paris. 615 pp.

Bianchi A. & Bianchi M. 1982. Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurement. *Microbial Ecol.*, 8: 61-69.

Bianchi M. & Colwell R. 1985. Microbial indicators of environmental water quality: the role of microorganisms in the assessment and prediction of changes in the marine environment induced by human activities. *Symp. Biomonitoring State Environ.*, 13-21.

Bianchi M. & Van Wambeke F. 1984. Dynamique des communautés bactériennes des eaux marines enrichies en azote minéral ou organique: expériences à court terme. In: *Bactériologie marine.* CNRS (Ed.), Paris. pp. 61-69.

Borelli M.J. 1991. *Approche spatiale de la contamination bactérienne de la rade de Toulon .* Rapp. de stage/IFREMER-Marseille.

Chaussepied M. & Le Corre P. 1991. Rejets urbains et enrichissement du milieu en matière organique et sels nutritifs. In: *La mer et les rejets urbains*. J.F. Guillaud & L.A. Romana (Eds.) Actes des colloques 11. Ifremer, pp. 81-88.

Colwell R.R., West P.A., Maneval D., Remmers E.F., Elliot E.L. & Carlson N.E. 1984. Ecology of pathogenic vibrios in Chesapeake bay. In: *Vibrios in the environment*. R. Colwell (Ed.), pp. 368-387.

Console J.J., Zeitoun C., Arnal O. & Arnoux P.R. 1993. Qualité des eaux de la Baie du Lazaret (rade de Toulon). Rapp. IFREMER.

Cuadrado T. 1993. *Etude de la contamination fécale dans la baie du Lazaret..* Rapp. de stage/IFREMER Toulon-La Seyne.

Doria E.V. & Bianchi A. 1982. Comparaison de deux méthodes d'extraction des bactéries des sédiments marins. *C.R. Acad. Sci. (Paris)*, 294: 467-470.

Dupray E., Baleux B., Bonnefont J.L., Guichaoua C., Pommepey M. & Derrien A. 1990. Apports en bactéries par les stations d'épuration. In: *La mer et les rejets urbains*. J.F. Guillaud & L.A. Romana (Eds.) Actes des colloques 11. Ifremer, pp. 81-88.

Estep K.W., McIntyre F., Hjørleifsson E. & Sieburth J. McN. 1986. MacImage: a user-friendly image-analysis system for the accurate mensuration of marine organisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 33: 243-253.

Gameson A.L.H. 1974. *Discharge of Sewage from sea outfall..* 27 août-2 septembre. Londres. Pergamon Press, New York. 455 pp.

Gauthier M. & Le Rudelier D. 1990. Survival in seawater of *Escherichia coli* cells grown in marine sediments containing glycine-betaine. *Appl. Env. Microbiol.*, 56(9): 2915-2918.

Griffiths A.J. & Lovitt R. 1980. Use of numerical profiles for studying bacterial diversity. *Microbial Ecol.*, 6: 35-43.

Grigorova R. & Norris J.R. (Eds.) 1990. *Methods in Microbiology. Techniques in Microbial Ecology*. Academic Press, London, San Diego, New York, (22), 627 pp.

Hall P.O.J., Anderson L.G., Holby O., Kollberg S. & Samuelsson M.O. 1990. Chemical fluxes and mass balances in a marine fish cage farm. I. Carbon. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **61**: 61-73.

Hansen P.K. & Lunestad B.T. 1993. Effects of tetracycline, oxolinic acid, and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Can. J. Microbiol.*, **39**: 1307-1312.

Hobbie J.E. & Daley R.J. 1977. Use nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**: 1225-1228.

Hobbie J.E. & Flechter M.M. 1984. The aquatic environment. In: *Micro-organisms in action: concepts and applications in microbial ecology*. J.M. Lynch & J.E. Hobbie (Eds.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 132-162.

Hoffle M.G. 1988. Bacterioplankton community structure and dynamics after large scale release of non indigenous bacteria as revealed by low-molecular-weight-RNA analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3387-3394.

Hoffle M.G. 1990. RNA chemotaxonomy of bacterial isolates and natural microbial communities. In: *Aquatic microbial ecology*. J. Overbeck & R.J. Chrost (Eds.) pp. 129-153.

Holby O. & Hall P. 1991. Chemical fluxes and mass balances in a marine fish cage farm. II. Phosphorus. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **70**: 263-272.

Holmer M. & Kristensen E. 1992. Impact of marine fish cage farming on metabolism and sulfate reduction of underlying sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **80**: 191-201.

Jacobsen P. & Berglind L. 1988. Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farm. *Aquaculture*, **70**: 365-370.

Kaper J., Lockman H., Colwell R.R. & Joseph S.W. 1979. Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**: 91-103.

Kemp P.F., Sherr B.F., E.B. Sherr & J.J. Cole (Eds.) 1993. *Handbook of methods in Aquatic Microbial Ecology*. Lewis Publishers, Boca Raton, Ann Arbor, London, 776 pp.

Kaspar H.F., Hall G.H. & Holland A.J. 1988. Effects of sea cage salmon farming on sediment nitrification and dissimilatory nitrate reductions. *Aquaculture*, **70**: 333-344.

Kogure K., Simidu U. & Taga N. 1979. A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, **25**: 415-420.

Le Guyader F., Pommepey M. & Cormier M. 1990. Implantation d'*Escherchia Coli* en pilote expérimental et influence des compétition de flore. *Can. J. Microbiol.*, **36**

Loarer R., Arnoux A., Bodennec G., Martin Y. & Pagano G. 1992. *Impact de l'émissaire de Toulon-Est sur les sédiments de la grande rade. Aspects granulométriques, chimiques, bactériologiques et toxicologique*. Rapp. IFREMER, DRO/EM/90-02. 41 pp.

Lynch J.M. & Poole N.J. 1979. The aquatic environment. In: *Microbial Ecology, a conceptual approach*. J.M. LYNCH & N.J. POOLE (Eds.) Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 92-113.

Martinez J., Soto Y., Vives-Rego J. & Bianchi M. 1991. Natural bacterial communities as indicators of pollutants in aquatic environments. In: *Bioindicators and environment management*. Academic press, New York. pp. 273-278.

Mills A.L. & Wassel R.A. 1980. Aspects of diversity measurement for microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**: 578-586.

Mistre M. 1988. *Contribution à l'étude de la qualité chimique et bactériologique des moules de la baie du Lazaret et de l'anse de Balaguier*. Thèse Université d'Aix-Marseille II, Faculté de Pharmacie de Marseille.

Mitchell R. (Ed.) 1992. *Environmental Microbiology*. Series Editors: Mitchell R., Wiley-Liss - A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New york, Chichester, Brisbane, Wiley Series in Ecological and applied microbiology, 411 pp.

Mitchell R. (Ed.) 1978. *Water Pollution Microbiology*. Series Editors: Mitchell R., Wiley-Liss - A John Wiley & Sons, Inc., Publication, New york, Chichester, Brisbane, (2), 442 pp.

Molina C. 1994. *Réponses des communautés bactériennes du sédiment marin côtier à la perturbation créée par des système d'aquaculture du site du Lazaret (La Seyne sur Mer)*. Rapport de stage/Microbiologie Marine CNRS UPR 223. 45 pp.

Montana P.A. 1982. Sampling design and enumeration statistics for bacteria from marine sediments 1366-1372. *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**: 1366-1372.

Nygaard K., Lunestad B.T., Hektoen H., Berge J.A. & V. H. 1992. Resistance to oxytetracycline, oxolinic acid and furazolidone in bacteria from marine sediments. *Aquaculture*, **104**: 31-36.

O'Neil K.R., Stephen H.J. & Grimes D.J. 1992. Seasonal incidence of *Vibrio vulnificus* in the great bay estuary of New Hampshire and Maine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 3257-3262.

Olson R.J. 1981b. Differential photoinhibition of marine nitrifying bacteria: a possible mechanism for the formation of the primary nitrite maximum. *J. Mar. Res.*, **39**: 227-238.

Pace N.R., Stalh D.A., Lane D.J. & Olsen G.J. 1986. The analysis of natural microbial populations by ribosomal RNA sequences. In: *Advances in microbial ecology*. K.C. Marshall (Ed.), Plenum press, New York. pp. 20-27.

Porter K.G. & Feig Y.S. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. *Limnol. Oceanogr.*, **25**: 943-948.

Prieur D. 1985. *Etude bactériologique des sites de salmoniculture en Bretagne..* Rapp. CNEXO, 82/2784. 53 pp.

Reimers E. & Smith K.L. 1986. Reconciling measured and predicted fluxes of oxygen across the deep sea sediment-water surface. *Limnol. Oceanogr.*, **31**: 305-378.

Rozzak D.B. & Colwell R.R. 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Reviews.*, **51**(3): 365-379.

Schallenberg M., Jacob K. & Rasmussen J.B. 1989. Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct counts. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1214-1219.

Shcherbakov F.A. 1988. On the role of organisms in mobilization of sedimentary material in the White Sea littoral. *Okeanologiya Oceanology Mosc.*, **28**: 810-813.

Shiaris M.P., Rex A.C., Pettibone G.W., Keay K., McManus P., Rex M.A., Ebersole J. & Gallagher E. 1987. Distribution of indicators bacteria and *Vibrio parahaemolyticus* in sewage-polluted intertidal sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**: 1756-1761.

Van Wambeke F. 1988. Numération et taille des bactéries planctoniques au moyen de l'analyse d'image couplée à l'épifluorescence. *Ann. Inst. Pasteur / Microbiol.*, **139**: 261-272.

Velji M.I. & Albright L.J. 1986. Microscopic enumeration of attached marine bacteria of seawater, marine sediment, fecal matter and kelp blade samples following pyrophosphate and ultrasound treatments. *Can. J. Microbiol.*, **32**: 121-126.

Videau C. & Merceron M. 1992. *Impact de la pisciculture marine intensive sur l'environnement*. . Rapp. IFREMER, DEL. Brest-92.13. 105 pp.

Ward B.B. 1986. Light and substrate concentration relationships with marine ammonium assimilation and oxydation rates. *Mar. Chem.*, **16**: 301-316.

Wolff R. 1991. *Mytiliculture en rade de Toulon - La baie du Lazaret- Risques épidémiologiques*. . Mémoire pour l'obtention du Diplôme de Médecine Agricole/Institut National de Médecine Agricole. 137 pp.