

CONTRIBUTIONS
A L'ETUDE DES BACTERIES MARINES
DU LITTORAL BELGE

IV. Recherche quantitative de la richesse microbienne
de l'eau du bassin de chasse d'Ostende
par lecture directe sur membranes filtrantes

PAR

G. PERSOONE (Gent) et N. DE PAUW (Antwerpen)

1. INTRODUCTION.

Au cours des « Recherches sur l'Ostréiculture » dans le bassin de chasse d'Ostende (1960-1965), le problème de la nourriture des huîtres a maintes fois été soulevé.

En effet, les chercheurs ont bien souvent été étonnés de voir les huîtres s'engraisser quand l'eau était pauvre en phyto- et nannoplancton.

La question fut posée alors si, en l'absence d'autres micro-organismes, la biomasse bactérienne ne constituait pas un élément nutritif substantiel pour les huîtres.

Cependant, la littérature révèle que, si l'on admet depuis longtemps que les invertébrés filtreurs peuvent consommer des microbes, la biomasse bactérienne totale dans la plupart des biotopes examinés est trop insignifiante pour être prise en considération comme part importante de la nourriture.

Or, nos recherches antérieures ont révélé que l'eau du port d'Ostende, comme celle du canal Noord-Eede, est très riche en germes (G. PERSOONE, 1966; G. PERSOONE - N. DE PAUW, 1968). Comme le bassin contient de l'eau de mer provenant du port (par les écluses situées dans l'arrière-port) et que son niveau est ajusté régulièrement avec l'eau saumâtre du Noord-Eede (par les 3 éclusettes au Sud du bassin), il est évident que ce biotope doit contenir également une quantité importante de microbes.

Il n'est donc pas exclu a priori que, dans le cas particulier du bassin de chasse, la biomasse bactérienne soit significative en tant que potentiel alimentaire pour les Ostréidés.

C'est pourquoi nous avons effectué en 1966 une série de prélèvements d'eau de surface afin d'en faire l'analyse bactériologique quantitative.

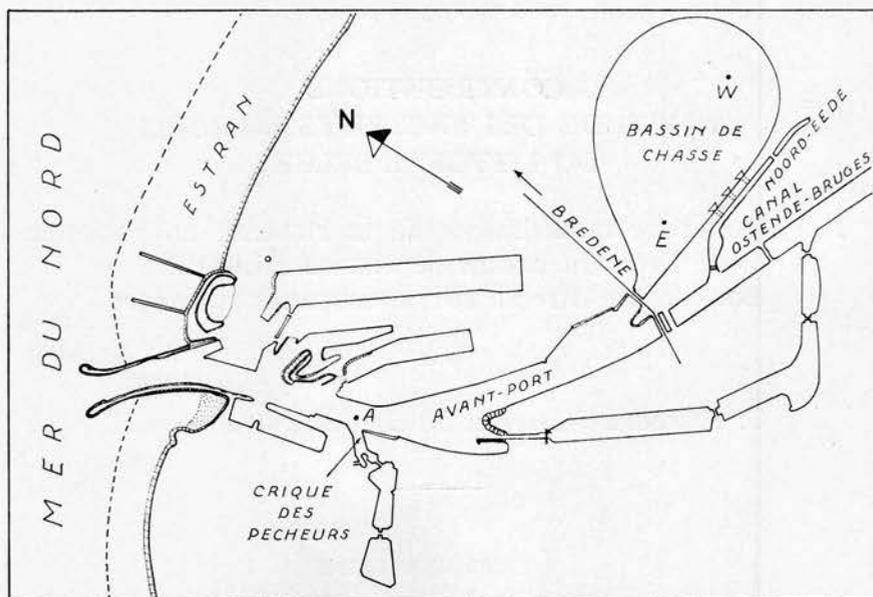


Fig. 1. — Topographie du port d'Ostende.

2. CHOIX D'UNE METHODE.

A) Au cours de nos analyses antérieures dans le port d'Ostende nous avons toujours employé la technique classique des cultures sur géloses.

Cependant, comme J. BRISOU (1963) le signale, cette méthode donne des chiffres très inférieurs à la réalité, puisque le milieu le plus universel ne permet le développement que d'un faible pourcentage des germes réellement présents. En outre, les bactéries marines adhèrent le plus souvent à plusieurs à des particules, si bien qu'une colonie sur une gélose provient non pas d'un germe mais d'un paquet de germes.

H. W. JANNASCH et G. E. JONES (1959) ont comparé 7 méthodes d'analyse quantitative de microbes marins. Ils affirment que les dénombrements directs après coloration des bactéries sur membranes filtrantes donnent des chiffres environ 150 fois supérieurs à ceux obtenus par la méthode des ensemencements sur agars.

J. BRISOU, Y. DE RAUTLIN DE LA ROY, R. CURCIER et F. CAMPELLO (1963) estiment que les méthodes directes donnent des résultats 100

à 5.000 fois plus élevés que les cultures, quel que soit le milieu nutritif utilisé.

Selon J. OVERBECK et H. D. BABENZIEN (1964), l'auteur russe RAZUMOV aurait trouvé des différences de 1/10 à 1/30.000 entre les géloses et les membranes filtrantes.

La méthode directe a cependant de nombreux inconvénients :

- 1) il y a toujours un certain nombre de germes inclus dans, ou présents sur, les membranes avant la filtration (A. E. KRISS, 1961);
- 2) quand la quantité de particules détritiques en suspension dans l'eau est trop grande, elles masquent en partie les microbes sur les filtres et le dénombrement n'est plus possible (G. REINHEIMER, 1965);
- 3) il est souvent difficile de distinguer les bactéries de certaines micro-particules qui y ressemblent (H. W. JANNASCH et G. E. JONES, 1959);
- 4) à moins d'employer des techniques de coloration vitale, on ne peut faire aucune différence entre les germes vivants et les morts (J. OVERBECK et H. D. BABENZIEN, 1964).

Comme notre but premier était d'obtenir une idée de la masse totale des bactéries (vivantes et mortes), la méthode des membranes filtrantes, nous sembla préférable aux cultures sur géloses puisqu'elle donne des résultats plus proches de la réalité.

B) Toutefois, afin d'établir le rapport entre la méthode directe et indirecte, nous avons, lors d'un échantillonnage « hors-série », procédé à un ensemencement sur un milieu nutritif solide, parallèlement au dénombrement sur filtres.

3. MATERIEL ET METHODES.

A) Lecture directe.

La méthode adoptée est la modification préconisée par H. W. JANNASCH (1958), où les bactéries sont colorées par l'érythrosine phénolée.

Au lieu de procéder à des dilutions comme le conseillent A. BELING (1950), N. M. ALFIMOV (1954) et H. W. JANNASCH (1958), nous avons préféré filtrer chaque fois des quantités croissantes d'eau.

Après chaque prélèvement, 1, 2, 5, 10, 20, 50 et 100 ml d'eau furent filtrés sur des membranes filtrantes (type Millipore HA). Après coloration, lavage et séchage, les filtres sont découpés et la partie centrale (2 cm²) déposée entre deux gouttes d'huile à immersion sur une lame porte-objet.

Un examen rapide au microscope à un agrandissement 8 × 100 (Obj. à immersion) révèle immédiatement quels filtres (généralement 3 ou 4) sont susceptibles d'être analysés. Les autres (colonisation trop petite ou trop grande) sont écartés.

Vingt champs furent comptés par membrane.

A chaque échantillonnage, un filtre vierge (contrôle) a été coloré et analysé, afin d'estimer le nombre de germes « inhérents » (indigènes) au filtre (*).

La moyenne arithmétique des 20 champs (moins la moyenne des contrôles) est ensuite multipliée par le rapport :

$$\frac{\text{surface totale utile de la membrane}}{\text{surface du champ microscopique à l'agrandissement } 8 \times 100}$$

afin d'obtenir le nombre de micro-organismes présents sur chaque membrane, donc dans le volume d'eau filtrée.

En dénombant pour chaque prélèvement 3 ou 4 filtres porteurs de quantités différentes de microbes, nous avons toujours réussi, en comparant les moyennes ramenées à 1 ml d'eau, à éliminer les valeurs improbables dues, soit à une répartition inégale des bactéries sur la surface, soit à la présence de particules, que l'on a de temps à autre comptées comme germes.

B) Culture sur gélose.

Lors de l'analyse bactériologique de l'eau du port d'Ostende, l'un de nous avait trouvé qu'une modification du milieu 2216E de Cl. E. ZOBELL donnait le nombre le plus élevé de colonies (G. PERSOONE, 1966).

Comme l'eau du bassin de chasse provient du port, nous avons réutilisé cette gélose nutritive dont voici la composition : peptone, 5 g; glucose, 1 g; extrait de levure, 0,1 g; FePO_4 , 0,1 g; agar-agar, 15 g; eau distillée, 250 ml; eau de mer stabilisée, 750 ml; $\text{pH} = 7,6$ (ajusté au moyen de NaOH 1N).

Afin de détacher le plus possible les germes des particules détritiques, nous avons « homogénéisé » l'eau, un moment, au moyen d'un Ultra-Turrax (W. GUNKEL, 1964). Les colonies furent comptées après 12 jours d'incubation à 20 °C.

4. PRELEVEMENTS.

De mars à octobre 1966, des échantillons d'eau de surface ont été prélevés dans des bouteilles stériles d'un litre, 2 fois par mois, dans le bassin de chasse aux points E et W et dans l'avant-port d'Ostende à hauteur de la Crique des Pêcheurs (point A) (fig. 1). Les échantillons furent filtrés à Ostende même, à l'Institut d'Etudes Maritimes, au plus tard 1 heure après le prélèvement.

(*) La plupart du temps, nous avons trouvé une moyenne de 2 à 3 germes par champ.

Le 12 octobre 1967, nous avons fait un prélèvement aux mêmes endroits. Une partie de l'eau fut filtrée sur les membranes, l'autre a servi à ensemencer les géloses.

5. RESULTATS.

A) Lecture directe (fig. 2).

- 1) Pendant toute la durée de l'expérience, le nombre de germes était très élevé. Il n'y avait que deux résultats inférieurs à 200.000 germes/ml (points E et W du bassin : 26-V-1966 et 19-VII-1966). Les maxima s'élevaient à plus de 2 millions/ml pour le bassin (18-VIII-1966) et plus de 9 millions/ml dans le port (18-VIII-1966).
- 2) L'eau du port était toujours beaucoup plus riche en germes que celle du bassin, en moyenne 2 à 4 fois, avec des extrêmes pouvant aller jusqu'à 10-13 fois. Sur 17 prélèvements dans le port, il n'y avait que 2 résultats inférieurs à 1 million de germes/ml et la médiane (2.700.000/ml) est supérieure au nombre maximum de microbes dans le bassin (2.200.000/ml). Les médianes dans ce dernier biotope sont respectivement 600.000/ml (point W) et 660.000/ml (point E).

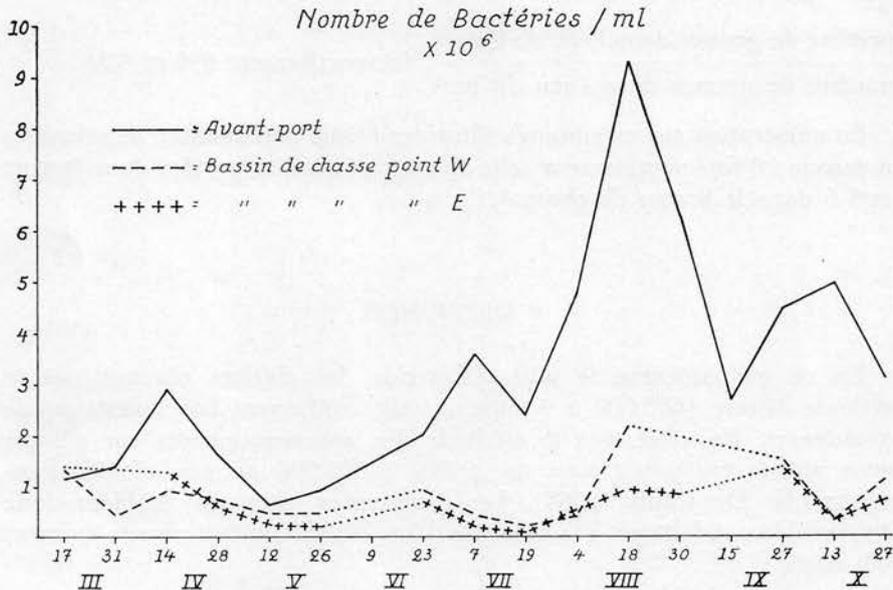


Fig. 2. — Résultats de l'analyse microbienne quantitative par lecture directe sur membranes filtrantes (période mars-octobre 1966).

- 3) Les résultats obtenus pour les points W et E du bassin démontrent qu'il n'y a pas de gradient du nombre de germes dans l'axe : W-E du bassin. Les valeurs des deux points étaient en général assez proches l'une de l'autre.

B) Comparaison méthode directe-méthode indirecte.

TABLEAU.

	Géloses	Membranes filtrantes	Rapport entre les 2 méthodes
Port	290.000	2.450.000	8,4
Bassin de chasse	30.700	295.000	9,6
Rapport du nombre de germes dans les deux biotopes	9,4	8,3	—

Les résultats de l'échantillonnage du 12-X-1967 démontrent que les deux méthodes donnent à près le même rapport :

$$\frac{\text{nombre de germes dans l'eau du bassin}}{\text{nombre de germes dans l'eau du port}}$$
 (respectivement 9,4 et 8,3).

La numération sur membranes filtrantes révèle une quantité de microbes presqu'10 fois supérieure à celle obtenue sur les agars (8,4 dans le port et 9,6 dans le bassin de chasse).

6. DISCUSSION.

En ce qui concerne le port d'Ostende, les chiffres obtenus par la méthode directe (600.000 à 9 millions/ml), confirment nos investigations antérieures. En effet, par la méthode des ensemencements sur géloses nous avons toujours trouvé de 30.000 à 800.000 germes/ml (G. PERSOONE - N. DE PAUW, 1968). Les membranes filtrantes semblent donc donner dans ce biotope, des résultats 10 à 20 fois supérieurs aux cultures sur agars.

Comparée aux données de la littérature, l'eau du port et du bassin de chasse est extrêmement riche en bactéries.

Pour le port, il faut chercher la cause de cette richesse microbienne dans le déversement des eaux d'égoût (deux fois par jour), ce qui provoque un énorme enrichissement du milieu en matières organiques, d'où une multiplication bactérienne intense et un déficit très prononcé en saturation d'oxygène.

La grande quantité de germes que nous avons continuellement constatée dans le bassin est le résultat de plusieurs facteurs :

- 1) Comme le biotope est peu profond, la turbulence de l'eau sous l'effet des vents remet régulièrement en suspension la couche supérieure des sédiments, riche en microbes (*).
- 2) A chaque remplissage, le bassin reçoit l'eau du port, donc une grande quantité de matières organiques.
- 3) Un certain volume d'eau saumâtre coule dans le bassin par les 3 éclusettes le long du Noord-Eede. Comme ce canal draine une partie des eaux d'égoût de plusieurs agglomérations situées à l'Est d'Ostende, ses eaux contiennent également une grande quantité de matières organiques.

Cette richesse des 2 biotopes en éléments nutritifs semble d'ailleurs expliquer la différence assez petite (10 à 20 fois) entre les résultats de la méthode directe (membranes filtrantes) et indirecte (ensemencement sur gélose), comparée aux facteurs, allant jusqu'à 30.000, cités par certains auteurs (cfr introduction). En effet, les conditions écologiques du port et du bassin favorisent surtout la multiplication intense des germes hétérotrophes saprophytes et la plupart de ceux-ci semblent se développer assez facilement sur le milieu nutritif utilisé.

7. CONCLUSIONS.

Si nous admettons, comme Cl. E. ZOBELL et C. B. FELTHAM (1942) un volume bactérien moyen de $1 \mu^3$, il y aurait dans le bassin de chasse une biomasse bactérienne de 0,2 à 2 mm^3 par litre d'eau. La densité des germes marins étant voisine de celle de l'eau de mer (Cl. E. ZOBELL, 1946), cela représenterait à peu près 0,2 à 2 mg de substance solide par litre.

Si nous adoptons une profondeur moyenne de 1 m pour le bassin de chasse, il y aurait donc continuellement dans ce biotope, de 200 à 2.000 kg de microbes.

Compte tenu de l'apport régulier de matières organiques et de la multiplication très rapide des micro-organismes, les germes présents dans l'eau constituent donc indubitablement un potentiel alimentaire non négligeable pour les ostréides.

Nous remercions les Professeurs Dr. J. HUBLE et Dr. F. EVENS ainsi que le Dr. E. LELOUP pour leurs conseils et critiques au cours de ces investigations.

(*) Les premiers résultats d'expériences en cours ont montré que la surface de la vase contient de 12 millions à 15 millions de germes au cm^3 (ensemencements sur géloses).

RESUME.

Dans une série d'analyses bi-mensuelles en 1966, la méthode de numération directe sur membranes filtrantes a été utilisée pour déterminer la teneur en bactéries de l'eau du bassin de chasse d'Ostende, en tant que nourriture potentielle des Ostréidés qu'on y cultive.

SAMENVATTING.

Met behulp van de methode der rechtstreekse tellingen op membraanfilters werd in een reeks monsternamen, in 1966, tweemaal per maand, de hoeveelheid bacteriën bepaald in het water van de Spuikom te Oostende, als mogelijke belangrijke voedingsbron voor de oesters die men er kweekt.

SUMMARY.

In a series of bi-mensual samplings in 1966, the method of direct counting on membrane filters has been used to determine the quantity of bacteria present in the water of the Sluice-dock in Ostend (Belgium) as a possible important food-stock for oysters which are reared there.

ZUSAMMENFASSUNG.

In einer Reihe von Probe-entnahmen in 1966, zwei mal im Monat, ist, mit Hilfe der direkten mikroskopischen Zahlung auf Membranfiltern, die Quantität Bakterien im Wasser von « Spuikom » in Oostende (Belgien) bestimmt worden als mögliche wichtige Nahrungsquelle für die Auster die dort gezüchtet werden.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

ALFIMOV, N. M.

1954. *Comparative evaluation of methods for the determination of bacterial counts in sea water.* ((Microbiology-Moscow), 23, p. 693 (En Russe).)

BELING, A.

1950. *Bacteriologische Untersuchungen während der Fulda-Expedition 1948.* (Ber. Limnol. Flusst.-. Freudenthal, 2, p. 4-10.)

BRISOU, J.

1963. *Numération directe des bactéries sur membranes filtrantes.* (Feuillets de Biologie, IV, p. 17.)

BRISOU, J., DE RAUTLIN DE LA ROY, Y., CURCIER, R. et CAMPELLO, F.

1963. *Numération comparative des Bactéries marines par cultures et lecture directe sur membranes.* (Comptes rendus séanc. Soc. Biol., CLVII, 3, p. 635.)

GUNKEL, W.

1964. *Die Verwendung des Ultra-Turrax zur Aufteilung von Bakterienaggregaten in marinen Proben.* (Helgol. Wiss. Meeresunters., II, 3-4, p. 287-295.)

JANNASCH, H. W.

1958. *Studies on planktonic bacteria by means of a direct membrane filter method.* (J. Gen. Microbiol. 18, p. 609-620.)

JANNASCH, H. W. et JONES, G. E.

1959. *Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration.* (Limnol. and Oceanogr., 4, 2, p. 128-139.)

KRISS, A. E.

1961. *Meeresmikrobiologie. Tiefseeforschungen.* (Verb. Gustav Fischer Verlag, Jena.)

MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE. Commission T. W. O. Z. Groupe de Travail « Ostréiculture ».

1960-1965. *Recherches sur l'Ostréiculture dans le bassin de chasse d'Ostende en 1960, 1961, 1962, 1963, 1964, 1965.* (Rapport rédigé par E. LELOUP avec la collaboration de L. VAN MEEL, Ph. POLK, R. HALEWYCK, A. GRYSOON.)

OVERBECK, J. et BABENZIEN, H. D.

1964. *Bakterien und Phytoplankton eines Kleingewassers im Jahreszyklus.* (Zeitschrift f. Allg. Mikrobiol., 4, 1, p. 59-76.)

PERSOONE, G.

1966. *Contributions à l'étude des bactéries marines du littoral belge. III. Milieux de culture et ensemencements.* (Bull. Inst. r. Sci. nat. Belg. 42, 6, p. 1-14.)

PERSOONE, G. et DE PAUW, N.

1968. *Pollution in the harbour of Ostend (Belgium) Biological and Hydrographical consequences.* (Helgol. Wiss. Meeresunters 17, p. 302-320.)

RHEINHEIMER, G.

1965. *Mikrobiologische Untersuchungen in der Elbe zwischen Schnackenburg und Cuxhaven.* (Archiv. Hydrobiol. Suppl. XXIX, 3-4, p. 181-254.)

ZOBELL, Cl. E.

1946. *Marine Microbiology.* (Chronica Botanica Cy., Waltham Mass. U. S. A.)

ZOBELL, Cl. E. et FELTHAM, C. B.

1942. *The bacterial flora of a marine mud flat as an ecological factor.* (Ecology 23, 1, p. 69-78.)

RIJKSUNIVERSITEIT GENT
LABORATORIUM VOOR OECOLOGIE,
BIOGEOGRAFIE EN ALGEMENE BIOLOGIE.

RIJKSUNIVERSITAIR CENTRUM ANTWERPEN
LABORATORIUM VOOR OECOLOGIE.

