

UNIVERSITE DE PROVENCE  
(AIX-MARSEILLE I)

THESE

présentée par Alain LANUSSE

pour l'obtention du grade de DOCTEUR -mention Sciences-  
de l'Université de Provence.

====ooOoo====

LA CONTAMINATION MICROBIENNE D'UNE LAGUNE TROPICALE.  
( Lagune Ebrié, Côte d'Ivoire )

- INFLUENCES DE L'HYDROCLIMAT -

====ooOoo====

Soutenue le 05 juin 1987 devant la commission d'examen ;

MM. A. BIANCHI  
P. CAUMETTE  
A. CHAMPEAU  
P. DUFOUR  
M. GAUTHIER  
R. LESEL



F 23825

- AVANT-PROPOS -  
-----

Réalisée au Centre de Recherches Océanographiques de Côte d'Ivoire, cette étude s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche entrepris par l'ORSTOM (Institut français de recherche pour le développement en coopération) visant à évaluer l'impact du développement démographique et industriel de la ville d'Abidjan sur l'écosystème lagunaire Ebrié.

En premier lieu, je tiens à remercier le Ministère ivoirien de la Recherche Scientifique et les deux équipes franco-ivoiriennes qui se sont succédées à la direction du C.R.O de m'avoir permis d'effectuer ce travail.

Cette étude a reçu le soutien financier du département "Connaissance et mise en valeur des écosystèmes aquatiques" de l'ORSTOM dirigé par Monsieur DURAND J.R. à qui j'adresse mes remerciements les plus sincères pour la confiance qu'il m'a accordée.

Je remercie très sincèrement et très chaleureusement Monsieur BIANCHI A., directeur de recherche au C.N.R.S (ER 223 "Ecologie et biochimie microbienne du milieu marin) qui a fait preuve à mon égard de compréhension et de confiance. J'ai beaucoup apprécié nos discussions sur ce manuscrit et j'ai l'honneur de lui exprimer aujourd'hui toute ma respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur CHAMPEAU A. m'a permis de m'inscrire à sa formation doctorale d'Ecologie à l'Université de Provence (Aix-Marseille I). Je lui en suis très reconnaissant et je suis honoré de sa participation au jury de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur CAUMETTE P., Maître de conférence à l'Université Aix-Marseille III, pour n'avoir considéré ni sa peine ni son temps pour me conseiller et me soutenir tout au long de la réalisation de cette thèse. C'est avec beaucoup de plaisir que je le remercie de m'avoir fait partager son enthousiasme et son expérience.

C'est très vivement que je remercie Monsieur GAUTHIER M., directeur de recherche à l'I.N.S.E.R.M (U303 "Mer et Santé") qui m'a fait l'honneur de juger ce travail. Qu'il soit assuré de mes remerciements les plus sincères.

Monsieur DUFOUR Ph., maître de recherche à l'ORSTOM, a accepté de se replonger dans les eaux de la lagune Ebrié. C'est un plaisir pour moi de pouvoir l'en remercier.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Monsieur LESEL R., directeur de recherche à l'I.N.R.A. (Département d'hydrobiologie). Il y a quelques années, en m'accueillant dans son laboratoire pour préparer un D.E.A., il m'a initié à l'écologie microbienne en milieu aquatique. Aujourd'hui, il accepte de faire partie du jury de cette thèse et j'ai le plaisir de l'en remercier. Qu'il trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens également à exprimer toute ma reconnaissance à Monsieur GUIRAL D., chargé de recherche à l'ORSTOM, qui tout au long de mon séjour en Côte d'Ivoire n'a cessé de me prodiguer conseil et encouragement. Je suis particulièrement heureux de pouvoir l'en remercier.

Toute ma sympathie et ma gratitude s'adressent également à mes collègues du Centre de Recherches Océanographiques, MM. LEGENDRE M., PAGANO M., TORRETON J.P. et SAINT-JEAN L. pour m'avoir si amicalement soutenu au cours de la préparation de cette thèse.

Je n'oublie pas non plus la disponibilité et la contribution de MM. DJEDJE R. et RIGOBERT B. . Qu'ils reçoivent ainsi que l'ensemble du personnel administratif, technique et navigant du C.R.O., mes remerciements les plus sincères.

Ce travail a reçu le soutien financier du Ministère français chargé de l'Environnement ( Service de la Recherche des Etudes et du traitement de l'Information sur l'Environnement - Contrat N°84323 ) que j'ai l'honneur de remercier.

A mes parents et à mon frère,

A Martine et à Samantha,

pour leur patience, leur reconfort et leur affection.

"Un seul brin de paille ne balaie pas la cour".  
proverbe Wobé, Côte d'Ivoire.

"L'aiguille habille les autres et demeure nue".  
proverbe basque, OIHENART A. (1657).

SOMMAIRE  
-----

	page
INTRODUCTION.	
CHAPITRE I - LE MILIEU LAGUNAIRE IVOIRIEN.	5
I.1. Situation géographique.	5
I.2. Hydroclimat de la zone estuarienne.	7
I.3. La lagune, cible des pressions anthropiques.	9
CHAPITRE II - LES PRINCIPALES BACTERIES PATHOGENES.	
II.1. <u>Enterobacteriaceae</u> .	12
II.1.1. <u>Salmonella</u> .	
II.1.2. <u>Shigella</u> .	
II.1.3. <u>Escherichia coli</u> entérotoxinogènes.	
II.1.4. <u>Yersinia enterocolitica</u> .	
II.2. <u>Vibrionaceae</u> .	15
II.2.1. <u>Vibrio cholerae</u> .	
II.2.2. autres vibrions pathogènes.	
II.2.3. <u>Aeromonas</u> .	
II.2.4. <u>Plesiomonas shigelloides</u> .	
CHAPITRE III - L'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DES EAUX. principes et méthodes.	
III.1. Le choix des indicateurs.	19
III.2. Le choix d'une méthodologie.	20
III.2.1. Les critères de sélection.	
III.2.2. Détermination de la spécificité.	
III.2.3. Détermination de la sensibilité.	
III.3. Les coliformes.	24
III.3.1. Matériel et méthodes.	
III.3.2. Résultats et discussion.	
III.4. Les entérocoques.	35
III.4.1. Matériel et méthodes.	
III.4.2. Résultats et discussion.	
III.5. <u>Clostridium perfringens</u> .	39
III.5.1. Matériel et méthodes.	
III.5.2. Résultats et discussion.	
III.6. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> .	43
III.6.1. Matériel et méthodes.	
III.6.2. Résultats et discussion.	
III.7. Conclusion.	49

## CHAPITRE IV - ESTIMATION DE LA SURVIE DE BACTERIES ENTERIQUES DANS LES EAUX LAGUNAIRES.

IV.1. Protocole expérimental.	51
IV.2. Résultats.	
IV.2.1. Mises au point méthodologiques.	55
IV.2.2. Incubation en eau naturelle de surface.	57
IV.2.3. Incubation en eau filtrée et autoclavée.	61
IV.2.4. Incubation d' <i>E. coli</i> en eau filtrée et/ou autoclavée.	63
IV.2.5. Incubation en situation écologique simulant l'hypolimnion des zones stratifiées.	63
IV.3. Discussion.	
IV.3.1. Influence des conditions expérimentales.	67
IV.3.2. Survie bactérienne dans les eaux de surface.	68
IV.3.3. Survie bactérienne dans les eaux de l'hypolimnion des zones stratifiées.	75
IV.3.4. Influences des variations hydroclimatiques.	77
IV.4. Conclusion.	82

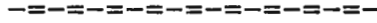
## CHAPITRE V - EVOLUTION DE LA CONTAMINATION MICROBIENNE DES EAUX LAGUNAIRES AU COURS D' UN CYCLE ANNUEL.

V.1. Matériel et méthodes.	
V.1.1. Echantillonnage.	86
V.1.2. Méthodologie.	87
V.2. Résultats hydrobioclimatiques.	
V.3.1. Caractéristiques climatiques et hydrologiques.	94
V.3.2. Caractéristiques hydrobiologiques.	94
V.4. Résultats bactériologiques.	
V.4.1. Ajustement à la loi de distribution normale.	100
V.4.2. Détermination des paramètres statistiques de la qualité bactériologique des eaux.	104
V.4.3. Evolution saisonnière de la contamination des eaux lagunaires par <i>E. coli</i> , les entérocoques et <i>C. perfringens</i> .	104
V.4.4. Recherche de bactéries pathogènes.	110
V.5. Discussion.	115
V.6. Conclusion.	124
CONCLUSION GENERALE	127
RESUME	130

BIBLIOGRAPHIE.

ANNEXES.

## INTRODUCTION





Par leur situation géographique, aux confins des milieux continentaux et marins, les lagunes côtières constituent des sites privilégiés d'implantation et de développement des activités humaines. Les pressions anthropiques qui s'y exercent alors sont généralement très diverses voire antagonistes (pêche, aquaculture, aménagement portuaire, pollution,...). Sous la croissance démographique et le développement industriel, les agressions polluantes des rejets urbains, industriels et agricoles tendent à s'accroître d'année en année, mettant en péril l'exceptionnelle productivité de ces écosystèmes (Lasserre, 1979 ; Durand et al., 1982). Le milieu lagunaire devient le réceptacle obligé de l'ensemble des déchets générés par les activités humaines.

Dans les pays en voie de développement, les effluents sont le plus souvent déversés sans traitement préalable. Le coût et l'inadaptation des solutions classiques limitent la mise en place de systèmes d'assainissement et d'épuration (Colcanap et Dufour, 1982). La salubrité du milieu continue alors à dépendre du pouvoir auto-épurateur lagunaire et du renouvellement des eaux lié aux flux et reflux de la marée.

Les effets de ces rejets sur l'écosystème lagunaire sont évidents et constituent autant d'injures à la beauté de ces sites et aux personnes qui les côtoient. Lorsque le niveau de pollution dépasse les capacités auto-épuratrices du milieu, celui-ci présente différents stades d'eutrophisation, de désoxygénation voire d'empoisonnement du milieu (Dufour et Maurer, 1979 ; Guiral, 1984 ; Carmouze et Caumette, 1985). L'intensité de ces phénomènes est accentuée par le confinement des eaux lagunaires et par la température élevée des milieux tropicaux (Dufour, 1982).

Associée aux rejets eutrophisants, la contamination microbienne peut s'avérer préoccupante compte tenu des risques épidémiologiques qui lui sont associés (Colwell, 1980). Le milieu aquatique devient alors le réservoir (Fig. 1) de nombreux micro-organismes responsables d'affections intestinales telles que les fièvres thyphoïdes et le choléra mais aussi d'autres maladies plus fréquentes comme les hépatites ou les gastro-entérites (Leclerc, 1983). Les micro-organismes pathogènes (Tab. 1) transmis par l'eau soit directement par absorption, soit par consommation de produits d'origine aquatique contaminés représentent l'une des causes principales de morbidité et de mortalité dans les pays en voie de développement. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS, 1984), les maladies diarrhéiques provoqueraient à elles seules 25 millions de morts par an.

Dans ces régions, plusieurs facteurs contribuent au maintien de ces infections à l'état endémique. L'hygiène et l'assainissement sont principalement mis en cause. Ils dépendent souvent de la disponibilité en eau potable mais aussi de la fréquence élevée des contacts avec les eaux souillées lors des activités ménagères et lors des inondations aux saisons des pluies ou de crues. A un autre niveau, on peut également suspecter la sous-alimentation et la malnutrition qui déséquilibrent la flore intestinale et de ce fait, ne lui permettent plus d'assurer son rôle de barrière à la prolifération des micro-organismes pathogènes (Ducluzeau et Raibaud, 1979).

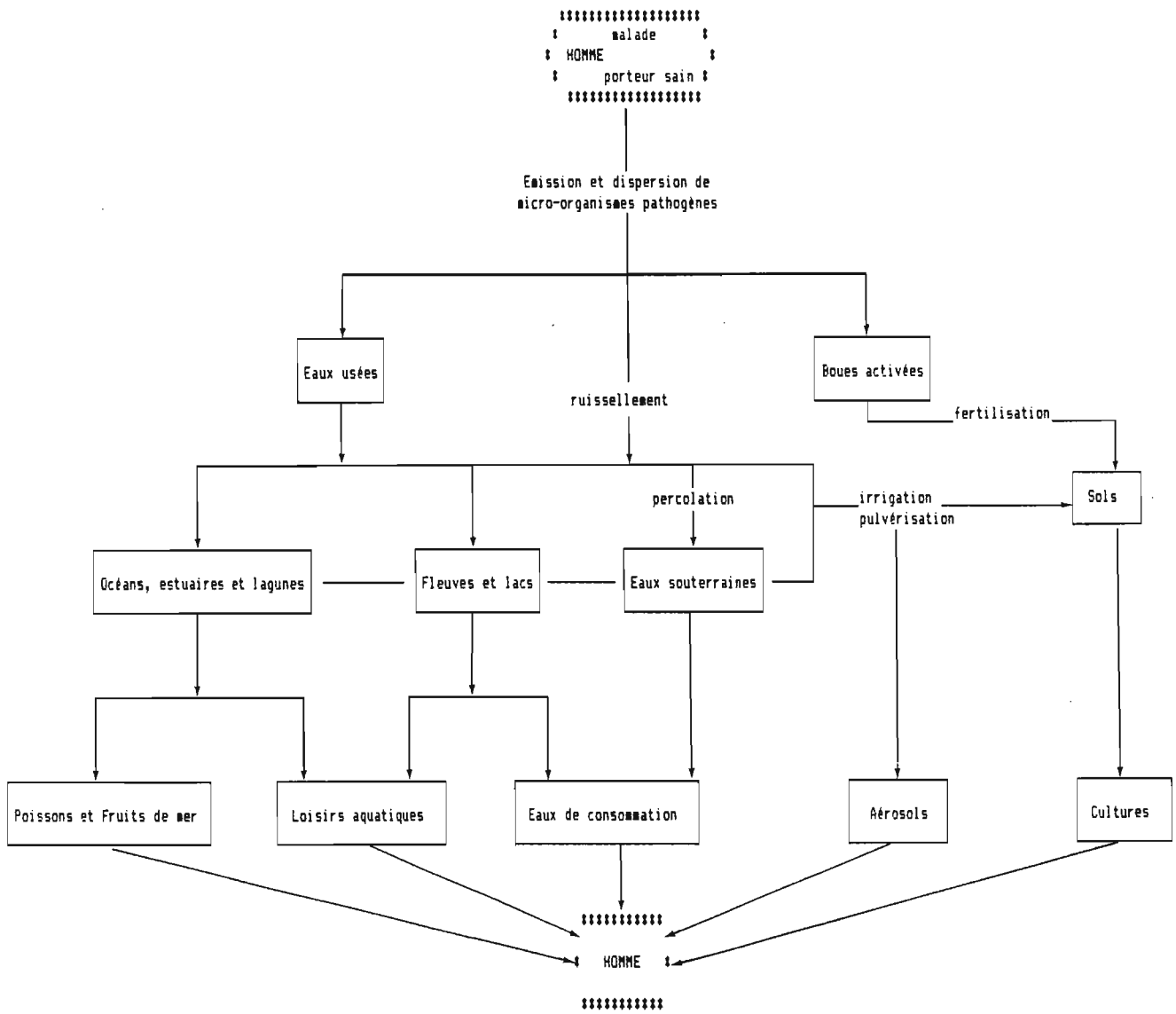


Figure 1 : Voies générales de transmission hydrique des principaux micro-organismes pathogènes de l'homme.

De plus, la transmission de ces infections dépend des aptitudes de survie des micro-organismes qui elles-mêmes, sont conditionnées par les caractéristiques auto-épuratrices du milieu récepteur. L'étude du pouvoir auto-épurateur océanique a fait l'objet de nombreux travaux recensés par Aubert et al. (1981) et comparativement, les eaux lagunaires sont soupçonnées de prolonger la durée de survie des micro-organismes pathogènes (Lasserre, 1979).

La fréquente implication de la salubrité des eaux ou des produits d'origine aquatique impose donc la mise en place de programmes d'évaluation du degré de pollution microbienne. Dans les régions tempérées, ces programmes ont abouti à la détermination de critères de qualité hydrobiologique et à la définition de normes sanitaires (C.E.E., 1975). En zone tropicale, devant l'absence d'études comparables, certains écosystèmes sont soumis à cette même réglementation (Owens, 1977).

Cependant, aucune étude ne prouve que la stratégie de surveillance des eaux tempérées puisse être directement transposable aux eaux tropicales et plus particulièrement aux lagunes tropicales. Au contraire, divers travaux (Evison et James, 1973 ; Carillo et al., 1985) signalent par exemple, l'inadéquation d'*Escherichia coli* comme indicateur de contamination fécale en milieu tropical alors que l'ensemble des normes occidentales repose sur le dénombrement de cette bactérie.

Enfin, il est actuellement reconnu que l'écologie des micro-organismes pathogènes en milieu aquatique constitue une des priorités pour l'étude étiologique de certaines pathologies humaines et animales ainsi que pour l'installation et l'exploitation d'activités aquacoles. De ce fait, cette approche écologique devrait être doublement féconde en permettant à la fois de mieux connaître l'évolution des micro-organismes et leurs relations avec l'homme (Leclerc, 1983).

A cet égard, les milieux saumâtres (lagunes, estuaires, deltas,...) constituent le biotope aquatique privilégié des *Vibrionaceae* (principalement le genre *Vibrio*). Impliqués dans diverses affections (Blake et al., 1980 ; Colwell, 1984) dont la plus grave est le choléra, les *Vibrio* sont fréquemment rencontrés dans ces écosystèmes que ce soit dans l'eau (Colwell et al., 1977 ; Richard et Lhuillier, 1977 ; Molitoris et al., 1985 ; Garay et al., 1985) ou chez des organismes aquatiques (David et Sizemore, 1982 ; Huq et al., 1983 ; Schandevyl et al., 1984).

La température et la salinité sont les paramètres hydrobiologiques principaux conditionnant la présence de ces bactéries dans l'environnement aquatique (Singleton et al., 1982 ; Huq et al., 1983). De ce fait, les milieux saumâtres tropicaux pourraient être plus propices à la prolifération de ces micro-organismes (Bockemühl et Triemer, 1974 ; Nair et al., 1980).

La Côte d'Ivoire, avec un des réseaux lagunaires les plus étendus de l'Afrique de l'Ouest est particulièrement soumise à ces problèmes. De nombreuses affections d'origine hydrique sévissent sous une forme endémique (fièvre typhoïde: Le Noc et Orio, 1972 ; Gallais et al., 1983) ou endémo-sporadique (choléra : Bourgeade et al., 1973 ; Dosso et al., 1983).

La lagune Ebrié dans sa région centrale subit l'expansion économique de la ville d'Abidjan et son état sanitaire préoccupant a déjà signalé (Pagès et Citeau, 1978 ; Dufour, 1984). Néanmoins, le péril fécal, bien que souvent évoqué n'avait pas réellement été évalué. Cette constatation est à l'origine de notre travail. La lagune d'Abidjan constitue de plus un cadre idéal pour aborder l'ensemble des problèmes liés à l'étude des contaminations microbiennes d'une lagune tropicale.

Dans un premier temps, nous avons testé puis sélectionné diverses méthodes d'analyse microbiologique des indicateurs bactériens. Les méthodologies retenues ont ensuite été appliquées au suivi annuel du niveau de contamination microbienne des eaux et sédiments de la zone estuarienne de la lagune Ebrié. Parallèlement, dans le but de conforter les interprétations sur l'évolution spatio-temporelle de ces contaminations, la survie de bactéries pathogènes a été étudiée expérimentalement. Chacune de ces étapes correspond à un chapitre de cette thèse.

BACTERIES	VIRUS
Escherichia coli	Enterovirus (Polio,
Clostridium perfringens	coxsackie, E.C.H.O.)
Salmonella	Virus de l'hépatite A.
Shigella	Reovirus
Yersinia enterocolitica	Rotavirus
Vibrio cholerae	Coronavirus
Vibrio parahaemolyticus	Calicivirus
Campylobacter jejuni	Astrovirus
Staphylococcus aureus	Adenovirus
Pseudomonas aeruginosa	Parvovirus
Aeromonas hydrophila	
Plesiomonas shigelloïdes	

Tableau 1 : Principaux micro-organismes pathogènes (bactéries et virus) véhiculés par l'eau (d'après Leclerc, 1983).

CHAPITRE I : LE MILIEU LAGUNAIRE IVOIRIEN



Cette présentation succincte est empruntée à de nombreuses études répertoriées par Charles-Dominique et Durand (1982).

### I.1. Situation géographique.

Le réseau lagunaire ivoirien est constitué de trois lagunes côtières distinctes :

- la lagune de Grand-Lahou
- la lagune Aby et
- la lagune Ebrié

Avec une superficie de 566 km<sup>2</sup> (Varlet, 1978), cette dernière constitue l'étendue saumâtre la plus vaste de l'Afrique Occidentale. Son bassin versant couvre 93 600 km<sup>2</sup> dont 78 000 sont drainés par le fleuve Comoé, 8 900 et 4 300 par les rivières Agnéby et Mé (Girard *et al.*, 1971). Séparée de l'Océan Atlantique par un cordon sableux de 1 à 8 km de largeur, cette lagune s'étire sur 125 km le long du littoral ivoirien. Depuis 1950, ce cordon est traversé en sa partie centrale au niveau d'Abidjan par le canal artificiel de Vridi. Ce canal, large de 370 m et profond d'une vingtaine de mètres est la seule communication de la lagune avec l'Océan. Son ouverture a entraîné l'ensablement progressif du grau de Grand-Bassam qui constituait initialement l'exutoire naturel de cette lagune.

Abidjan, capitale économique de la Côte d'Ivoire est implantée autour de nombreuses baies (Biétri, Marcory, Cocody ...) dans cette zone à faciès estuarien (Fig. 2) et l'agglomération abidjanaise couvre une superficie de 7900 ha.

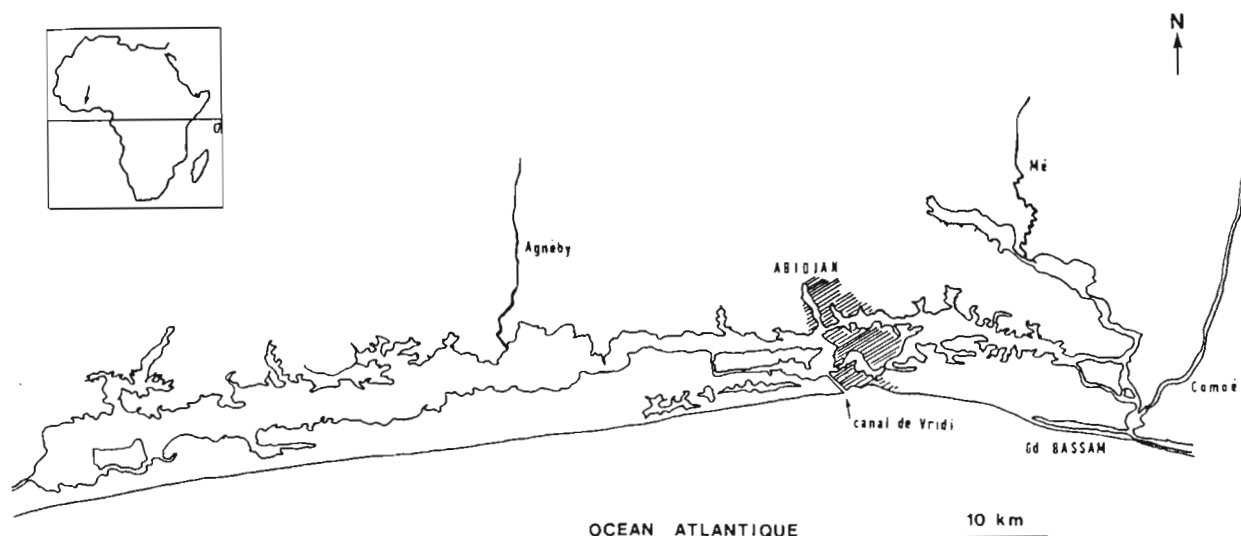


Figure 2 : La lagune Ebrié.

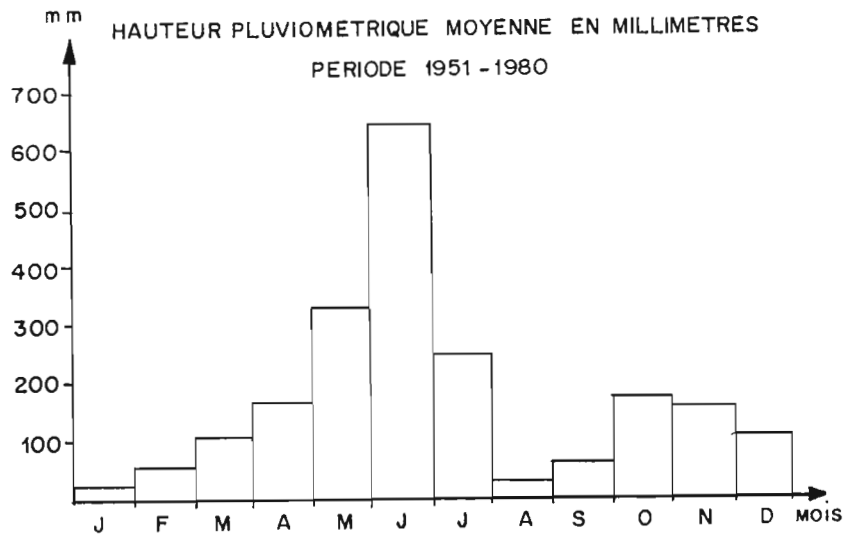


Figure 3 : Pluviométrie au niveau d'Abidjan.  
(Données de l'ASECNA).

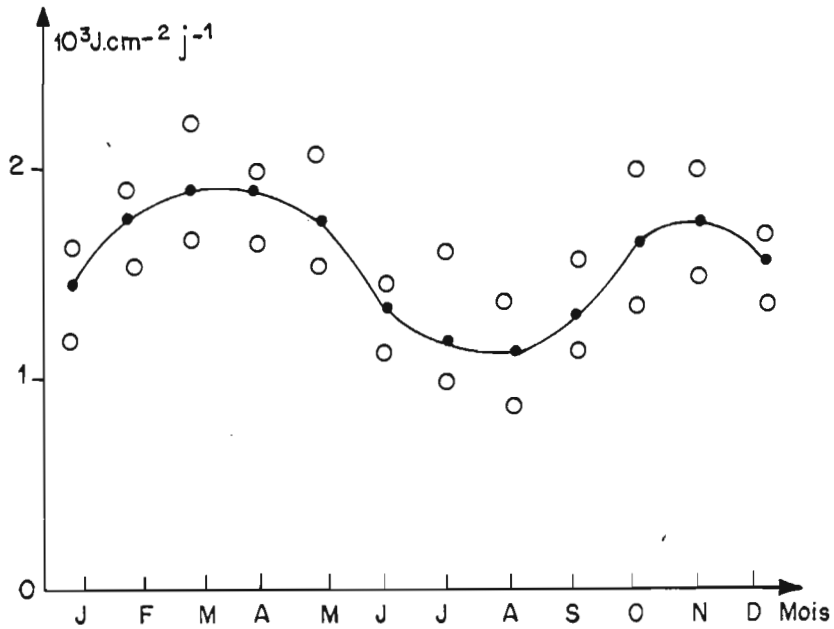


Figure 4 : Variations du rayonnement solaire global.  
Moyennes, maximum et minimum de 1968 à 1977.  
(d'après Gosse et Eldin, 1974 in Dufour, 1982).

## I.2. Hydroclimat de la zone estuarienne .

Le climat de la Côte d'Ivoire est soumis aux déplacements saisonniers de la convergence intertropicale ou front intertropical (F.I.T.) (Eldin, 1971). Les mouvements du F.I.T. régulent le climat en déterminant les régimes des vents, des températures et des précipitations (Fig. 3) détaillés par Dufour (1982), et par Durand et Chantraine (1982). Le rayonnement solaire (Fig. 4) présente un cycle saisonnier lié d'une part, à la couverture nuageuse (de juin à septembre) et d'autre part, à la hauteur relativement plus faible du soleil et aux fréquents brouillards (de décembre à janvier).

Au sud du sixième parallèle nord, le climat de la zone littorale est défini comme climat équatorial de transition par l'existence de 2 saisons des pluies d'inégale importance ; la plus intense et la plus longue présente un maximum en juin, la plus courte est centrée sur octobre. Deux saisons intermédiaires les séparent ; la petite saison sèche en août et septembre et la grande saison sèche qui dure de novembre-décembre à février-mars (Eldin, 1971).

En remontant sur le nord, le climat évolue vers un climat tropical plus sec caractérisé par l'unique saison des pluies de juillet à septembre. Le régime climatique de cette zone affecte directement la lagune par l'intermédiaire des rivières. Le volume moyen annuel charrié par ces cours d'eau est de 9,7 km<sup>3</sup> (in Dufour, 1982), soit près de 4 fois celui du bassin lagunaire. Les précipitations directes sur le plan d'eau lagunaire ne représentent que 12% des apports continentaux tandis que l'évaporation n'élimine que 7% de ces derniers. Les eaux continentales constituent donc l'essentiel du bilan net d'eau douce du système lagunaire. Le fleuve Comoé est responsable à lui seul de 70% de ces apports. A travers le canal de Vridi, l'hydroclimat lagunaire ressent l'influence marine qui peut être caractérisée par une succession de 4 saisons (Morlière, 1970) :

- La petite saison froide (fin décembre-janvier): Il se produit un upwelling côtier qui intéresse toute la côte ivoirienne. Les eaux marines côtières sont relativement froides (24-25°C) et salées (plus de 35%).

- La grande saison chaude (février-mai): La température de la couche océanique superficielle devant Abidjan s'élève au-dessus de 26°C et la salinité est proche de 35% .

- La grande saison froide (juillet-octobre): C'est la saison de l'upwelling normalement plus marqué, la salinité des eaux marines côtières est toujours proche de 35%. avec une température inférieure à 23°C.

- La petite saison chaude (novembre-décembre): Des eaux dites guinéennes de température comprise entre 26 et 29°C et de salinité inférieure à 35%. viennent recouvrir celles de l'upwelling.



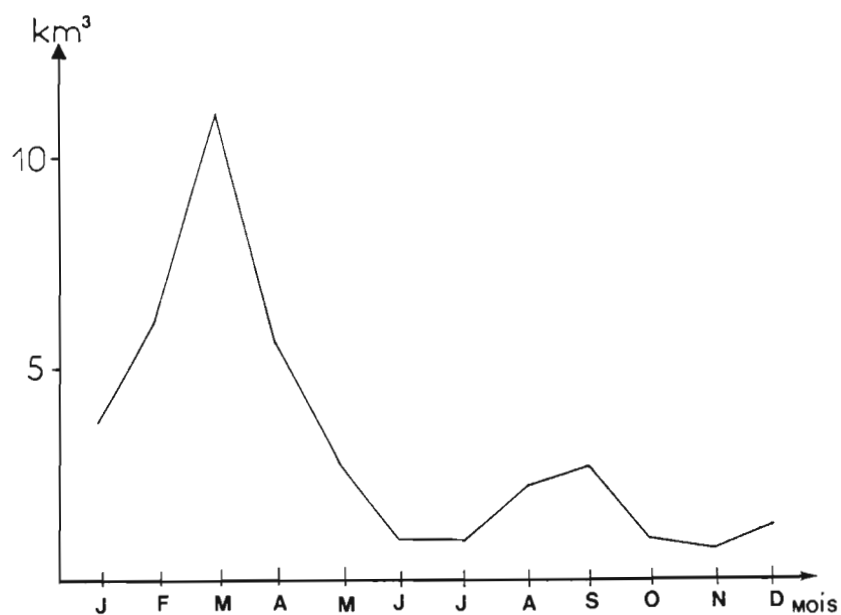


Figure 5 : Variations mensuelles du volume d'eau océanique entrant en lagune (d'après Varlet, 1978).

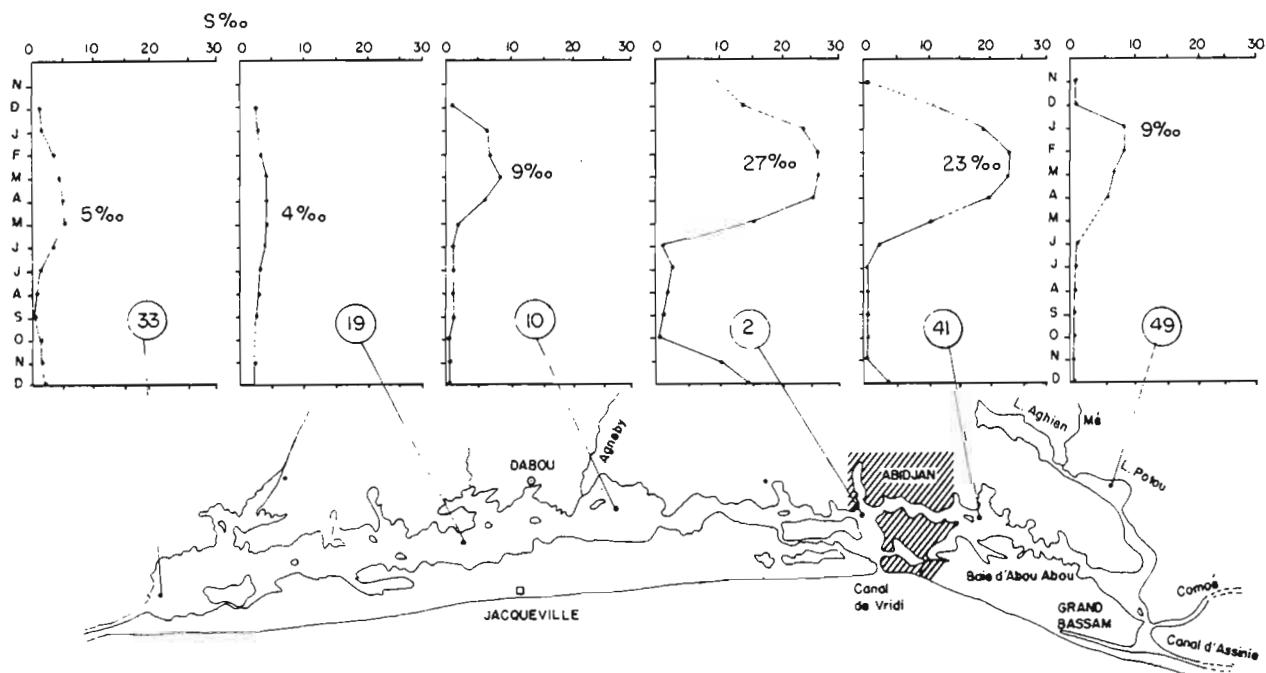


Figure 6 : Variation annuelle de la salinité en 6 stations réparties d'Ouest en Est dans le chenal central de la lagune Ebrié (Pagès et al., 1979).

Selon une estimation de Varlet (1978) basée sur des observations faites en 1951-52, et citée par Dufour (1982), le volume d'eau marine pénétrant annuellement en baie d'Abidjan serait de 38 km<sup>3</sup>, soit plus de 14 fois le volume total de la lagune (Fig. 5). Ces apports d'eau marine sont donc nettement supérieurs aux apports continentaux. Cette prédominance tend à s'accroître consécutivement au fort déficit pluviométrique qui affecte le nord de l'Afrique depuis quelques années.

L'hydroclimat lagunaire intègre donc l'ensemble des influences climatiques marines et terrestres. La figure 6 témoigne de l'alternance saisonnière de ces influences au niveau de la variation annuelle de la salinité en 6 stations du chenal central de la lagune (d'après Pagès et al., 1979).

Trois saisons distinctes peuvent être caractérisées (in Durand et Skubich, 1982 et Dufour, 1982).

- Une saison sèche (de janvier à avril) : Les apports continentaux, qu'il s'agisse d'écoulement ou de précipitations sont minimes. L'évaporation est maximale et l'influence océanique prépondérante. La température et la salinité atteignent leurs niveaux les plus élevés.

- Une saison des pluies (de mai à août) : Epoque des plus fortes précipitations puis des apports des rivières forestières. La couverture nuageuse limite l'ensoleillement. A la fin de cette saison, l'upwelling refroidit l'atmosphère et la température atteint sa valeur minimale de l'année.

- Une saison des crues (de septembre à décembre) : L'arrivée des eaux fluviales bouleverse certaines régions lagunaires. Les valeurs de salinité s'approchent de zéro et restent faibles jusqu'en novembre avec les pluies locales et les crues secondaires des rivières guinéennes. La température remonte à partir d'octobre.

### I.3. La lagune d'Abidjan, cible des pressions anthropiques.

Le sort de la lagune est lié à l'essor de la ville d'Abidjan qui s'est considérablement accéléré depuis une trentaine d'années. De 22 000 habitants en 1939, Abidjan passait à 128 000 en 1955, 650 000 en 1973 pour atteindre aujourd'hui plus de 1,6 million d'habitants. Cette poussée démographique est due à l'accroissement naturel de la population mais aussi aux migrations provenant de l'intérieur du pays et des pays voisins de la Côte d'Ivoire. Cette démographie galopante n'est pas sans causer des problèmes aux autorités locales en particulier à travers les problèmes d'assainissement qu'elle engendre.

En 1979, un schéma d'assainissement fut défini. Il prévoyait la réalisation de trois collecteurs de base conduisant la totalité des effluents de la ville à une station d'épuration située à Port-Bouët. Les eaux usées devaient être rejetées à 1 200 mètres en mer par l'intermédiaire d'un émissaire. En ce qui concerne le drainage, l'objectif était de supprimer les inondations dans les différents quartiers dont certains sont plus bas que la lagune.

Cependant, en raison des difficultés économiques traversées par la Côte d'Ivoire mais aussi de par sa conception technique irréaliste, le schéma directeur originel a dû être modifié pour donner priorité à l'assainissement des quartiers. En 1982, le rapport Colcanap-Dufour estimait que les 3/4 de la population n'étaient pas encore reliés aux collecteurs - d'égouts, et selon les prévisions les plus optimistes, seulement 60% de la population devraient l'être en 1990.

Actuellement, la priorité est donnée aux raccordements aux réseaux mais les collecteurs principaux réalisés se rejettent non pas en mer mais en totalité dans la lagune. L'impact de cette pollution organique sur le milieu a été étudié par de nombreux auteurs du Centre de Recherches Océanographiques de Côte d'Ivoire.

Sans reprendre l'ensemble des résultats acquis (*in* Dadié, 1979), on peut constater que le niveau d'eutrophisation atteint est très élevé, à la limite de la crise dystrophique pour certaines baies confinées.

La demande biologique en oxygène pour dégrader cette charge organique est très forte et peut excéder le contenu en oxygène du milieu naturel (Dufour, 1982). Cette charge polluante a par ailleurs profondément modifié la structure des communautés phytoplanctoniques en favorisant les espèces de petites tailles à activité métabolique intense (Maurer, 1978). Ce développement phytoplanctonique exubérant permet néanmoins de maintenir une couche d'eau oxygénée de 2 à 3 mètres d'épaisseur au-dessus de vases organiques très réductrices ou d'une couche d'eau anoxique selon la bathymétrie.

Dans les zones profondes, parallèlement à cette oxycline, la présence saisonnière d'une halocline renforce le confinement de l'hypolimnion qui devient alors le siège d'intenses fermentations et respirations anaérobies microbiennes avec production d'hydrogène sulfuré (Caumette, 1985). Lorsque l'influence marine redevient prédominante, la destratification de la colonne d'eau qui en résulte, provoque une remontée plus ou moins brutale de composés réduits dont l'incidence sur l'oxygénation des eaux peut se révéler catastrophique (Guiral et Chantraine, 1982 ; Carmouze et Caumette, 1985).

Pour la baie de Biétri, Guiral (1984) constate cependant que la minéralisation se déroule de manière satisfaisante et complémentaire grâce à la superposition de ces deux couches dans la colonne d'eau et aussi grâce aux communications de la baie avec des milieux adjacents moins eutrophes. Le milieu fonctionnerait comme un bassin de lagunage naturel mais cet auteur fait remarquer que le temps de génération et les taux d'activité métabolique des bactéries et des organismes photosynthétiques sur lesquels repose cet équilibre ne pourront s'accélérer indéfiniment au rythme de l'accroissement des rejets.

D'autre part, ces rejets domestiques sont la source d'une intense pollution microbienne que Pagès et Citeau (1978) jugent préoccupante surtout dans les baies où le renouvellement des eaux s'opère mal. En 1984, malgré l'amélioration de la circulation des eaux (ouvertures de communications entre la baie de Biétri et celles de Koumassi et Marcory), Lanusse et Djédjé (résultats non publiés) retrouvent des niveaux de contamination très élevés qu'ils qualifient de hors-normes. Ils soulignent de ce fait la nécessité de rechercher aussi les micro-organismes pathogènes en complément des bio-indicateurs afin d'évaluer plus précisément les risques liés à la fréquentation et l'exploitation de ce milieu.

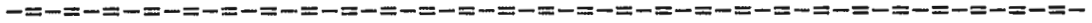
Parallèlement, les pressions anthropiques s'exercent à d'autres niveaux.

Ainsi, l'homme intervient directement sur cet écosystème avec les grands travaux publics qui en remodelant la topographie, modifient l'hydrodynamique lagunaire. Le plus spectaculaire d'entre eux fut le percement du canal de Vridi en 1950, cause d'un profond bouleversement écologique en même temps que stimulant économique déterminant pour le développement d'Abidjan.

L'ouverture du port commercial a entraîné l'implantation d'un important réseau industriel. Actuellement, l'agglomération abidjanaise regroupe 63% des entreprises industrielles ivoiriennes et celles-ci sont essentiellement concentrées au sud de la ville.

De natures très différentes selon le type d'activité industrielle, les rejets s'effectuent sans traitement dans le milieu lagunaire. Leurs impacts commencent à être décelés à travers différents programmes de surveillance nationale ( R.N.O. ivoirien ) et sous-régionale (W.A.C.A.F : Programme O.M.S /P.N.U.E /F.A.O de surveillance de l'environnement marin de l'Afrique Occidentale et Centrale ) auxquels participe le Centre de Recherches Océanographiques de Côte d'Ivoire.

CHAPITRE II : LES PRINCIPALES BACTERIES PATHOGENES.



Réceptacle privilégié des micro-organismes pathogènes des compartiments humains et animaux, le milieu aquatique contaminé est impliqué dans de nombreuses épidémies meurtrières à travers les divers usages de l'eau (Leclerc, 1983).

Bien que l'on assiste actuellement à une régression, voire une disparition des grandes endémies historiques telles que les fièvres typhoïdes, la dysenterie bacillaire ou encore le choléra, celles-ci restent toujours l'apanage des populations dont l'hygiène et la salubrité des eaux s'avèrent insuffisantes.

A cet égard, les populations des pays tropicaux sont plus particulièrement exposées compte-tenu aussi, il est vrai, de l'écologie des micro-organismes impliqués.

Dans ce chapitre, sont succinctement présentées quelques bactéries pathogènes parmi les plus fréquemment rencontrées dans ces pays. Deux familles y sont principalement décrites compte-tenu de leur importance en pathologie humaine ; la famille des Enterobacteriaceae et celle des Vibrionaceae. D'autres bactéries telles que Clostridium perfringens et Pseudomonas aeruginosa sont aussi pathogènes pour l'homme. Utilisées comme bio-indicateurs, celles-ci sont décrites dans le chapitre III. Cette présentation est largement inspirée de celle réalisée par Hartemann et Foliquet (1985).

## II.1 Enterobacteriaceae

Les caractéristiques de cette famille sont les caractères de bacilles à Gram -, mobiles, aéro-anaérobies facultatifs, la fermentation des glucides et l'absence d'une oxydase.

### II.1.1. Salmonella

La majorité des Salmonella sont pathogènes pour l'homme et causent 2 sortes de manifestations cliniques ;

- Les fièvres typhoïdes (S. typhi) ou paratyphoïdes (S. paratyphi A et B).
- Les gastro-entérites à type de diarrhées plus ou moins aiguës appelées salmonelloses.

En Côte d'Ivoire, ces infections intestinales sévissent à l'état endémique. Gallais et al. (1983) rapportent 213 cas de fièvre typhoïde à Abidjan entre février 1976 et février 1980. Les quartiers les plus peuplés et les plus insalubres sont les plus touchés avec une létalité globale de 4%.

En fréquence, les Salmonella occupent à Abidjan la première place des bactéries pathogènes isolées par hémoculture et la deuxième place de celles isolées d'affections intestinales (Le Noc et Orio, 1972).

Le genre Salmonella comprend des bacilles de 1 à 3 µm, Gram -, non sporulés et mobiles à de rares exceptions près. Ils sont fermentatifs, glucose +, lactose -, oxydase - et H<sub>2</sub>S + dans la plupart des cas.

Leur classification se réfère à leurs structures antigéniques somatiques (O) et flagellaires (H).

On dénombre actuellement plus de 2000 sérotypes. Un seul antigène d'enveloppe, désigné Vi est connu et il n'existe que dans 2 sérotypes (*S. typhi* et *S. paratyphi C*). Parmi l'ensemble de ces sérotypes, certains d'entre eux peuvent encore être subdivisés par la lyse phagique en lysotypes et être alors utilisés comme marqueurs en épidémiologie.

L'hybridation des acides nucléiques a bouleversé la taxonomie des *Salmonella* (Le Minor et al., 1983). Les *Salmonella* ne constitueraient qu'une seule espèce comprenant 6 sous-espèces.

En Côte d'Ivoire, Gallais et al. (1983) signalent que les salmonelloses humaines sont provoquées par un éventail important de sérotypes puisque jusqu'ici 51 sérotypes ont été répertoriés. *Salmonella typhi* est l'espèce la plus fréquemment isolée au cours des syndromes typhoïdiques avec 48,5 % des 703 souches isolées dans les laboratoires hospitaliers entre mai 1965 et juin 1970. Les 4 sérotypes responsables de ces syndromes sont néanmoins présents en Côte d'Ivoire bien que *S. paratyphi A* et *B* soient rencontrés avec une faible fréquence. D'autres sérotypes ubiquistes en Afrique y jouent aussi un rôle important à l'état endémique (*S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. enteridis*). Par contre, certains sérotypes (*S. aba* et *S. hato*) sont particulièrement isolés chez l'homme ivoirien alors qu'ils ne sont pas signalés dans les autres pays d'Afrique et que leur réservoir animal reste inconnu.

D'origine fécale, les *Salmonella* ne sont généralement présentes dans les eaux qu'en faible nombre et leur isolement nécessite la concentration, si la turbidité de l'échantillon le permet et l'enrichissement des échantillons analysés. Consécutivement, la mise en culture sur milieux sélectifs permet d'isoler des colonies typiques qui sont alors soumises à l'analyse des caractères biochimiques et antigéniques (test sérologiques).

#### II.1.2. *Shigella*

Ces micro-organismes sont responsables d'affections intestinales communément appelées dysenteries bacillaires ou shigelloses, caractérisées par l'émission très fréquentes de selles peu volumineuses et muco-sanguinolentes.

A Abidjan, les *Shigella* occupent la première place des bactéries isolées d'affections intestinales (Le Noc et Orio, 1972).

Le genre *Shigella* comporte des bâtonnets Gram -, immobiles, non-sporulés. Ils sont fermentatifs, glucose +, lactose -, H<sub>2</sub>S - et oxydase -.

L'association de caractères biochimiques et sérologiques permet de distinguer 4 sous-groupes :

- Sous-groupe A, espèce-type *S. dysenteriae*, avec 10 sérotypes ;
- Sous-groupe B, espèce-type *S. flexneri*, avec 9 sérotypes ;
- Sous-groupe C, espèce-type *S. boydii*, avec 15 sérotypes ;
- Sous-groupe D, espèce-type *S. sonnei*, avec 1 seul sérotype.

La caractérisation biochimiques de ces différents sérotypes est basée sur la production d'indole, et la fermentation du lactose, mannitol, maltose, dulcitol, du rhamnose, arabinose, xylose et sorbitol.

Présentant les mêmes caractéristiques de dispersion que les *Salmonella*, l'isolement des *Shigella* dans les eaux impose la même démarche analytique.

### II.1.3. *Escherichia coli* pathogènes.

Au cours des 30 dernières années, il est apparu que certains types d'*Escherichia coli* sont impliqués en pathologie humaine.

Ainsi les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC) sont, avec les rotavirus, la principale cause de décès par diarrhées aiguës chez les enfants des pays tropicaux, tandis qu'ils sont responsables de la "turista", nom couramment réservé à la diarrhée contractée par les touristes visitant ces pays (Charmot, 1980).

La diarrhée due aux ETEC relève de 2 phénomènes : la colonisation de l'intestin grêle par le micro-organisme et la sécrétion de 2 entérotoxines, l'une, thermolabile (LT), apparentée à la toxine cholérique, l'autre, thermostable (ST) plus hétérogène. La synthèse de ces toxines est codée par un plasmide qui peut aussi porter le gène des facteurs de colonisation.

A côté des ETEC, d'autres *E. coli* sont pathogènes pour le tube digestif humain. Ce sont :

- Les *E. coli* invasifs (EIEC) qui appartiennent à un douzaine de sérotypes O (dont les plus connus sont O124, O136 et O144) et qui, génétiquement très proches des *Shigella*, provoquent un syndrome dysentérique.

- Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) qui, appartenant au sérotype O157:H7, provoquent une diarrhée hémorragique.

- Les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC) qui appartiennent à 17 sérotypes O (surtout 26, 55, 111, 119, 127, 128) et qui causent des diarrhées chez l'enfant des pays tropicaux ainsi que la "turista".

Le diagnostic de ces différents sérotypes repose sur la recherche des facteurs de colonisation et des entérotoxines pour les ETEC ou sur l'immuno-agglutination par des sérums commercialisés pour les EPEC. Signalons également de nombreuses études (in Bohlool et Schmidt, 1982) qui décrivent la technique d'immuno-fluorescence permettant sous microscope, une identification et un dénombrement directs des ETEC dans les eaux.

### II.1.4. *Yersinia enterocolitica*

Cocco-bacille, Gram -, anaérobie facultatif, *Y. enterocolitica* est caractérisé par un métabolisme thermodépendant. Certains caractères évoluent avec la température d'incubation et 5 chimiotypes peuvent être individualisés.

Au niveau sérologique, seuls les antigènes somatiques sont pris en compte et les sérotypes O3, O8 et O9 sont les plus souvent impliqués en pathologie humaine.

L'entérocolite aiguë est la manifestation la plus fréquente de l'infection digestive causée par cette bactérie chez l'enfant de 5 à 6 ans tandis qu'après cet âge, il s'agit dans 50 % des cas d'un syndrome abdominal fébrile pseudo-appendiculaire. Les connaissances épidémiologiques sont encore imprécises et l'écologie de ce micro-organisme dans l'environnement aquatique reste peu étudiée.



Il n'existe aucune méthode standardisée pour l'isolement de V. enterocolitica dans les milieux hydriques et la méthode retenue est celle décrite par Highsmith et al. (1977 ; in Hartemann et Foliquet, 1985).

## II.2 Vibrionaceae

Actuellement, cette famille comprend les genres Vibrio, Aeromonas, Plesiomonas, Photobacterium et Lucibacterium. Les caractéristiques de cette famille sont les caractères de bacilles à Gram -, mobiles ou immobiles, aéro-anaérobies facultatifs, la réduction des nitrates, la fermentation des glucides et la présence d'une oxydase qui les différencie des Enterobacteriaceae.

### II.2.1. Vibrio cholerae

Agent du choléra, V. cholerae est un bacille très fin à Gram -, incurvé en forme de virgule, très mobile grâce à un cil polaire monotriche et ne présentant ni capsule ni spore. Cette espèce se caractérise surtout par son aptitude à sécréter de nombreux enzymes extracellulaires et une entérotoxine, responsable de l'affection.

La toxine cholérique est sécrétée par les vibrions ayant réussi à coloniser la lumière intestinale et sa fixation sur la membrane des entérocytes entraîne une activation de l'adénylcyclase qui provoque alors une violente fuite d'eau (plusieurs litres d'eau par jour). Accompagnant cette diarrhée caractéristique, le vibron est alors émis en grande quantité dans l'environnement de même qu'avec les vomissements et la sueur.

Dans les cas sévères, la mort survient par collapsus cardiovasculaire avec acidose et insuffisance rénale.

On a décrit jusqu'à maintenant plus de 100 sérotypes O, mais classiquement, toutes les souches pathogènes appartiennent au sérotype O:1 qui est subdivisé en 2 biotypes (Cholerae classique et El Tor) et 3 sérotypes (Ogawa, Inaba et Hikojima).

Des vibrions qui n'agglutinent pas avec le sérum anti O:1 sont isolés très fréquemment dans divers écosystèmes aquatiques (Sakazaki et Balows, 1981). Ces Vibrio nonagglutinables (NAG) sont aussi considérés comme des V. cholerae et provoquent entre autres, des syndromes cholériques (Hughes et al., 1978 ; Dodin, 1982).

D'autre part, certaines souches de Vibrio nag produisent une entérotoxine qui peut être neutralisée par l'antisérum contre la toxine cholérique (in Sakazaki et Balows, 1981).

L'épidémiologie de cette affection est l'objet de nombreuses controverses. Pour certains, l'homme est considéré comme l'unique réservoir tandis que de nombreuses études supportent l'hypothèse de Colwell et al. (1981) qui assimilent cette espèce à la microflore autochtone des milieux estuariens et saumâtres.

Bien qu'en régression, l'endémie mondiale du choléra ne doit pas être sous-estimée (Leclerc, 1983). La brutale arrivée du choléra en Afrique Occidentale a marqué une étape importante dans l'histoire de la septième pandémie et celle-ci a permis de signaler le rôle du contact interhumain dans la transmission et la diffusion de cette affection, sans que la transmission hydrique soit remise en question (Dodin, 1982).

En 1970, le choléra fut signalé pour la première fois dans les zones côtières du golfe de Guinée et s'installa dans la région lagunaire ivoirienne au cours du mois d'octobre de cette année. Le *Vibrio El Tor* sérotype *Ogawa* fut principalement mis en cause (Bourgeade *et al.*, 1973) et celui-ci fut régulièrement isolé des eaux lagunaires baignant les villages atteints (Duchassin *et al.*, 1973). Depuis, cette affection semble se maintenir sous une forme endémo-sporadique dans les régions lagunaires (Duchassin *et al.*, 1973 ; Dosso *et al.*, 1983).

Au niveau épidémiologique, un diagnostic rapide s'avère primordial. Il n'existe aucune méthode idéale mais l'enrichissement en eau peptonée alcaline (pH 8,4) suivi d'un étalement sur le milieu T.C.B.S. (thio-sulfate, citrate de sodium, bile de boeuf et saccharose) est la méthode la plus couramment utilisée. Les colonies suspectes arrondies et jaunes sont alors testées pour la recherche spécifique des caractères morphologiques, biochimiques et sérologiques (Dodin et Goud, 1983).

#### II.2.2. Autres vibrions pathogènes pour l'homme (*V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus*)

Ce sont des vibrions halophiles, mobiles, aéro-anaérobies facultatifs. Ces bactéries sont actuellement classées au sein du genre *Vibrio*. Popoff *et al.* (1983) distinguent *V. parahaemolyticus* (*V. parahaemolyticus* biotype 1) et *V. alginolyticus* (*V. parahaemolyticus* biotype 2). D'après Bianchi M. (1976), ces deux taxons présentent de nombreuses caractéristiques phénotypiques identiques ; les souches sont luminescentes, présentent une ciliature péritriche en culture solide et exigent du NaCl pour se développer. La cytochrome oxydase, la lysine décarboxylase et l'ornithine décarboxylase sont positives tandis que l'arginine dihydrolase, la réaction au test de Voges Proskauer et la production d'H<sub>2</sub>S sont négatives. Le diagnostic différentiel repose sur les caractères suivants ; *V. parahaemolyticus* : test VP - (pas de production d'acétoïne), Saccharose - et Arabinose +, *V. alginolyticus* ayant les caractères inverses.

Depuis son implication dans une toxi-infection alimentaire à la suite de la consommation de poisson (Fujino *et al.*, 1951, cités par Watkins et Cabelli, 1985), l'isolement des *V. parahaemolyticus* est signalé par de nombreux auteurs qui le recherchent dans les eaux, et plus spécialement les eaux chaudes tropicales, les crustacés ou encore les poissons (David et Sizemore, 1982 ; Huq *et al.*, 1983 ; Schandevyl *et al.*, 1984 ; Molitoris *et al.*, 1985).

Leur présence semble favorablement influencée par la température et le degré d'eutrophisation (Baross et Liston, 1970 ; Kaneko et Colwell, 1975 ; Watkins et Cabelli, 1985).

Sur le plan épidémiologique, *V. parahaemolyticus* est responsable de gastro-entérites qui sont signalées dans de nombreux pays (Richard et Lhuillier, 1977), y compris ceux bordant le golfe de Guinée (Bockemühl et Triemer, 1974).

En Côte d'Ivoire, le *V. parahaemolyticus* est impliqué en pathologie humaine sous 2 formes cliniques : une gastro-entérite caractérisée par des vomissements, des diarrhées profuses avec une leucocytorrhée importante rappelant une shigellose et un syndrome cholériforme évocateur du choléra et probablement étiqueté ainsi à tort par les cliniciens (Dosso *et al.*, 1983). Les données épidémiologiques semblent révéler des variations saisonnières et la période de mai à août serait la plus favorable à la contamination humaine.

L'entéropathogénicité de ce *Vibrio* serait due à la présence de 2 hémolysines dont la principale est thermostable (Richard et Lhuillier, 1977). Les souches obtenues par coprocultures des victimes de gastro-entérites sont bêta-hémolytiques en présence de sang, soit humain du groupe O, soit de lapin (Phénomène de Kanagawa positif). Les activités hémolytiques peuvent être détectées sur le milieu de Wagatsuma (1968, *in* Miyamoto *et al.*, 1969). En complément de ce test *in vitro*, le phénomène de Kanagawa peut être mise en évidence par la réponse de l'anse iléale ligaturée du lapin - (Sakazaki *et al.*, 1968 ; Kaper *et al.*, 1979).

Les souches "Kanagawa" négatives (KP -) sont peu entérotoxiques et correspondent à la majorité des isollements réalisés à partir d'échantillons d'eaux, de poissons ou de fruits de mer (*in* Hartemann et Foliquet, 1985).

Il n'existe pas de techniques de recherche particulière pour ces souches et les méthodes décrites pour *V. cholerae* peuvent être utilisées avec succès.

Citons le milieu gélosé de Watkins *et al.* (1976) qui peut être directementensemencé par des membranes filtrantes ainsi que les recommandations de Dupray et Cormier (1985) sur la durée d'incubation pour un recouvrement optimal de cette bactérie dans les coquillages.

### II.2.3. *Aeromonas*

Ce genre comprend des bacilles Gram-, mobiles (sauf *A. salmonicida*), à ciliature polaire, fermentant le glucose avec ou sans production de gaz et possédant une catalase et une oxydase actives.

La classification des différentes espèces de ce genre a également supporté de nombreuses modifications taxonomiques et nous retiendrons celle présentée par Popoff et Véron (1976). Ainsi, à côté d'*A. salmonicida* qui se différencie nettement des autres espèces, on distingue *A. hydrophila*, *A. sobria* et *A. caviae*.

Les *Aeromonas* sont responsables de nombreuses affections humaines recensées par Davis *et al.* (1978) et ils peuvent aussi être impliqués dans des gastro-entérites aiguës voire des diarrhées cholériformes (Show *et al.*, 1977 ; Champsour *et al.*, 1982). Les animaux vivant dans les milieux aquatiques peuvent également être infectés par ces bactéries (Hazen *et al.*, 1978) et certains auteurs suspectent le poisson de servir de réservoir d'*A. hydrophila* (*in* Kaper *et al.*, 1981).

La pathogénicité de ces bactéries serait liée à la présence d'une cytotoxine doublée d'une activité hémolytique (D'après Sakazaki et Balows, 1981). L'entéro-toxigénicité peut être mise en évidence par la réponse de l'anse iléale ligaturée de lapin (Kaper *et al.*, 1981).

Aucune méthode ne donne entière satisfaction pour l'isolement spécifique des Aeromonas. Notons les milieux de Kaper et al. (1981) et de Rippey et Cabelli (1980) qui ont permis de dénombrer ces espèces dans différents écosystèmes aquatiques.

#### II.2.4. Plesiomonas shigelloïdes

Seule espèce du genre Plesiomonas, P. shigelloïdes se distingue principalement des autres Vibrionaceae par l'activité des 3 enzymes déshydrogénasiques (LDC, ODC et ADH +) et l'absence d'exoenzyme.

Le biotope principal de cette bactérie est hydrique et les réservoirs animaux sont très divers (d'après Von Graevenitz, 1980).

Les connaissances sur la pathogénicité de P. shigelloïdes sont limitées mais Von Graevenitz (1980) recense de nombreuses implications dans des diarrhées en zone tropicale et Vandepitte et al. (1980) incriminent le tube digestif de poissons d'eau douce comme réservoir possible de cette bactérie.

CHAPITRE III : L' ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DES EAUX,  
principes et méthodes.

=====

La majorité des affections d'origine hydrique est causée par des micro-organismes pathogènes qui ont pour cible la sphère digestive et qui sont rejetés dans les matières fécales (cf. Tab. 1). Devant la diversité de ces micro-organismes, les difficultés de leur isolement et de leur identification pour un contrôle routinier, on a recours au concept de bio-indicateur. Ces indicateurs sont pour la plupart des bactéries de l'intestin de l'homme et des animaux homéothermes et leur présence conduit à suspecter une contamination fécale du milieu analysé. On parle alors de bactéries tests de contamination fécale.

Associés à ce concept, deux problèmes apparaissent : le choix des indicateurs et celui d'une méthodologie appropriée pour leur isolement dans l'eau.

### III.1. Le choix des indicateurs

Le bio-indicateur idéal, pour révéler une pollution microbienne d'origine fécale devrait toujours être exclusivement présent dans les matières fécales, être absent dans l'environnement non pollué et survivre au moins aussi longtemps que les micro-organismes pathogènes. Il devrait d'autre part, pouvoir être spécifiquement et aisément dénombré avec des techniques fiables dans le cadre d'analyses de routine.

La première utilisation des bactéries comme indicateurs de la qualité sanitaire d'une eau remonte à 1880, date à laquelle Von Fritsch identifiait *Klebsiella pneumoniae* et *K. rhinoscleromatis* comme des bactéries caractéristiques d'une contamination d'origine humaine. C'est cependant à Escherich (1885) que l'on doit la première observation du *Bacterium coli* (*Escherichia coli*) dans les fèces et de son association fréquente avec *Salmonella typhi*.

En 1945, d'après les critères énumérés ci-dessus, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis* et *Clostridium perfringens* étaient proposés par Prescott, Winslow et Mc Grady comme germes-témoins de contamination fécale. De nos jours, l'ensemble des normes de qualité d'un milieu se réfère à ces propositions en recherchant les groupements bactériens tels que les coliformes ou les streptocoques fécaux (cf. III.3-4). Ces groupes se sont substitués aux bactéries initialement proposées et on dénombre de ce fait, les coliformes plutôt qu'*E. coli*, les streptocoques fécaux à la place de *S. faecalis* ou encore les *Clostridium* sulfite-réducteurs plutôt que *C. perfringens*. Ces substitutions imposées par la faible sélectivité des méthodes de culture disponibles se sont soldées par une dénaturation substantielle de l'information recherchée. En effet, de nombreuses souches extra-fécales sont dénombrées dans ces groupes bactériens conduisant à une surestimation des risques épidémiologiques (Geldreich et Kenner, 1969 ; Dufour et Cabelli, 1976 ; Oger *et al.*, 1981).

Il faut reconnaître qu'il n'existe pas d'indicateur idéal, ni d'ailleurs d'indicateur universel. La recherche des germes-tests les mieux adaptés au milieu étudié se justifie pleinement. Celle-ci doit s'appuyer sur la comparaison des aptitudes de survie dans le milieu étudié entre le bio-indicateur et les micro-organismes réellement pathogènes responsables des endémies locales d'origine hydrique.

Evison et James (1973) et Carillo et al. (1985) signalent la croissance d'*E. coli* dans certains écosystèmes dulçaquicoles tropicaux ; de ce fait, ils réfutent l'utilisation de cette bactérie en tant qu'indicateur bactérien. Comme substitut, *Bifidobacterium adolescentis* (Evison et James, 1973) et à un degré moindre, *Pseudomonas aeruginosa* (Geldreich, 1973) ont été suggérés pour évaluer la salubrité de ces milieux caractérisés par leur température et souvent leur degré d'eutrophisation élevés. Il reste néanmoins à confirmer ces propositions qui se heurtent dans certains cas à l'absence de méthodes de cultures fiables permettant l'isolement et le dénombrement rapides et sélectifs de ces bactéries (Carillo et al., 1985).

### III.2. Le choix d'une méthodologie.

#### III.2.1. Les critères de sélection.

L'intérêt du recours aux bio-indicateurs a incité de nombreux auteurs à proposer différentes méthodes d'estimation de la concentration bactérienne. L'estimation du nombre le plus probable par la technique des tubes multiples (Mac Grady, 1918) fut la plus utilisée jusqu'à l'introduction des membranes filtrantes (Buttiaux et al., 1953). Depuis, sont apparues de nouvelles techniques microscopiques (Bohlool et Schmidt, 1982), enzymatiques (Trinel et Leclerc, 1977) et potentiométriques (Charrière et al., 1984). Dans le cas de ces bio-indicateurs, le dénombrement des colonies se développant sur milieu de culture solide reste néanmoins le moyen le plus utilisé pour l'estimation de la concentration bactérienne. L'optimisation de cette méthode a entraîné une multiplication des milieux de culture qui paradoxalement complique la définition des méthodes de référence. Actuellement, ces milieux sont trop nombreux et on compte par exemple plus de 20 milieux de culture différents pour la recherche des coliformes. De ce fait, des études comparatives de milieux ou de techniques abondent dans la littérature scientifique (Bissonnette et al., 1977 ; Pagel et al., 1982 ; Wright, 1984). Leurs conclusions se révèlent quelques fois critiquables par manque d'interprétation statistique rigoureuse.

Tout ceci souligne l'intérêt d'une rationalisation et d'une standardisation des méthodes de référence afin de pouvoir comparer les données recueillies dans le cadre de différents programmes. Dans ce but, nous nous proposons de définir les principes et la démarche sur lesquels devrait reposer le choix d'une méthodologie optimale.

La méthode idéale est celle qui permet la croissance exclusive de la totalité des bactéries appartenant à l'espèce ou au type recherché. Elle doit toujours tenir compte du "stress" que subissent les bactéries entériques lors de leurs rejets dans le milieu aquatique (Klein et Wu, 1974 ; Rhodes et al., 1983). Bissonnette et al. (1975) ont montré que les bactéries soumises à ce stress devenaient sensibles aux agents inhibiteurs incorporés pour sélectionner leur culture et se trouvaient alors incapables de croître sur les milieux sélectifs. De même, Xu et al. (1982) visualisent en immunofluorescence des bactéries viables incapables de supporter la sélectivité de la méthodologie mise en oeuvre.

Si le coût, la difficulté de préparation, ou la durée de conservation du milieu peuvent parfois s'avérer limitants, la spécificité et la sensibilité restent les deux critères de choix déterminants. Ceux-ci sont indissociables puisque le plus souvent le gain de spécificité s'obtient au détriment de la sensibilité.

Au niveau du protocole expérimental, le microbiologiste peut alors intervenir d'une part sur la composition du milieu de culture, d'autre part sur les conditions d'incubation. Pour chacun de ces niveaux, deux stratégies s'offrent à lui ; soit définir les conditions optimales au développement préférentiel de l'espèce recherchée, soit réaliser une incubation sélective c'est à dire en empêchant les espèces indésirables de croître. Celles-ci peuvent en effet biaiser l'énumération soit par excès, soit par défaut en inhibant les bactéries recherchées (Le Chevalier et Mc Feters, 1985).

Bien évidemment, la meilleure méthodologie devrait simultanément favoriser la croissance de la population recherchée et limiter la culture des autres mais dans la pratique, la simultanéité de ces deux composantes est difficile à satisfaire.

#### \* La composition du milieu de culture.

Pour le dénombrement des bio-indicateurs, on dispose d'un choix très large de bouillons de culture ou de milieux gélosés. On oppose souvent la mise en évidence de potentialités biochimiques des cultures en milieux liquides aux caractéristiques morphologiques et tinctoriales des colonies se développant sur milieu solide. Dans certains cas, on dispose d'une combinaison de ces deux types d'information ; fluorescence de certains Pseudomonas en milieu liquide (King et al., 1954) ou sulfite-réduction des Clostridium en milieu gélosé (Marshall et al., 1965) par exemple.

Selon la première stratégie énoncée précédemment, on peut donc choisir de préparer un milieu de culture dont la composition favoriserait préférentiellement la bactérie recherchée. Ainsi, les géloses lactosées sont très favorables à la croissance des entérobactéries.

D'autre part, le recours à une telle stratégie peut s'avérer indispensable lorsqu'aucun milieu de culture est suffisamment sélectif pour la bactérie recherchée ou que celle-ci se trouve en faible quantité dans l'échantillon analysé. On prépare alors un milieu d'enrichissement qui permet de privilégier la croissance de l'espèce désirée. Les bouillons peptonés salés et basiques favorisent par exemple la multiplication des Vibrionaceae. Cette approche ne permet cependant que d'apprécier la présence ou l'absence de la bactérie recherchée et reste par conséquent principalement réservé à la détection des micro-organismes pathogènes.

Par contre, lorsqu'un grand nombre de bactéries est en compétition, on peut être contraint de préparer un milieu de culture sélectif. Le pouvoir de sélection de ces milieux dépend alors de certains agents chimiques inhibiteurs (bile, sulfite, ...) ou antibiotiques (Néomycine, Kanamycine, ...) qui sont ajoutés à des concentrations que supporte l'espèce recherchée.

#### \* Les conditions d'incubation.

Les conditions d'incubation et plus particulièrement la température jouent des rôles complémentaires dans la sélection des micro-organismes recherchés.

Dans l'environnement on distingue les bactéries mésophiles, psychrophiles et thermophiles caractérisées par leurs températures optimales de croissance respectivement moyenne (30-37°C), basse (<30°C) et haute (> 37°C).



Parmi les mésophiles, les psychrotrophes et les thermotrophes sont en plus capables de croître respectivement aux basses ou hautes températures. Ces différentes aptitudes de croissance sont connues et utilisées pour l'isolement de nombreuses espèces bactériennes.

Ainsi, on peut choisir d'incuber l'échantillon analysé à la température optimale de la bactérie recherchée pour lui permettre de se développer préférentiellement. Par exemple, pour la recherche des *Salmonella*, la température d'incubation influence l'efficacité du milieu d'enrichissement et une température de 43°C facilite l'isolement de ce genre (Leclerc *et al.*, 1970). De même, la durée d'incubation peut permettre un enrichissement plus spécifique; une incubation de 7 à 8 h en eau peptonée salée est considérée comme optimale pour la recherche du *Vibrio parahaemolyticus* dans les coquillages (Dupray et Cormier, 1985).

Néanmoins, compte-tenu de la faible spécificité qu'elle procure, cette approche est peu utilisée et reste principalement réservée à l'isolement des bactéries pathogènes.

Par contre, l'utilisation de la température en tant que facteur de sélection est depuis très longtemps mise à profit. Cette stratégie fait appel à la propriété de thermotolérance de certaines espèces qui sont capables de supporter des températures "extrêmes" dans la mesure où elles se révèlent létales pour d'autres. En effet, très tôt, Eijkman (1904) avait noté que la production de gaz dans un bouillon glucosé incubé à 46°C permettait de différencier *E. coli* des autres micro-organismes. Actuellement, en référence à la thermotolérance de cette bactérie, une incubation de 48 h à 44.5°C est recommandée pour l'isolement des coliformes fécaux. Même si le choix de cette température reste controversé (Leclerc *et al.*, 1981 ; Oger *et al.*, 1981), cette incubation sélective constitue un moyen simple de séparer parmi les autres bactéries coliformes, les espèces dites fécales et celles de l'environnement.

Outre la température, l'ambiance d'incubation conditionne la structure de la microflore cultivée. Si l'anaérobiose s'impose pour la recherche des bactéries anaérobies, elle permet aussi de limiter la contamination du milieu de culture. Ainsi, Doyle *et al.* (1984) proposent d'incuber en anaérobiose les membranes filtrantes pour le dénombrement des coliformes fécaux. Leurs travaux montrent que l'anaérobiose limite la contamination des membranes par des bactéries de type aérobie strict sans modifier le recouvrement des coliformes.

Une fois l'élaboration d'une nouvelle méthodologie terminée, il convient de la comparer aux méthodologies déjà disponibles. Le microbiologiste doit alors évaluer à la fois la spécificité et la sensibilité de la méthode à tester. Auparavant, il est indispensable de préciser les paramètres physico-chimiques (salinité, température, pH, ...) des échantillons avec lesquels s'effectueront les comparaisons.

### III.2.2. Détermination de la spécificité

Cela revient à isoler puis à identifier pour chaque couple milieu-incubation un certain nombre de colonies (une trentaine au minimum) puis à calculer le pourcentage de bactéries recherchées par rapport à l'ensemble des colonies présentes.

Dans certains cas, à la place des galeries classiques d'identification, quelques caractères phénotypiques spécifiques peuvent suffire tels que par exemple, la production de gaz et d'indole à 44,5°C chez *E. coli* (Pugsley *et al.*, 1973), ou la caséinolyse chez *P. aeruginosa* (Brown et Foster, 1970).

Généralement, on ne tient compte que des colonies typiques cultivant sur le milieu. Les caractéristiques morphologiques et tinctoriales des colonies recherchées doivent par conséquent être préalablement déterminées par l'ensemencement d'une culture pure de l'espèce recherchée sur le milieu considéré.

En complément, il peut être intéressant voire indispensable de préciser la spécificité de ces caractéristiques culturelles en identifiant des colonies d'aspect différent (colonies atypiques). Dans certains cas, il devra être mentionné l'ensemble des colonies formées afin d'apprécier les phénomènes de compétition bactérienne et d'antibiose (Le Chevallier et Mc Feters, 1985).

### III.2.3. Détermination de la sensibilité

Cela revient à déterminer quel pourcentage de bactéries présentes dans l'échantillon analysé pourra être effectivement dénombré.

Le nombre réel de bactéries présentes est difficile à évaluer. Cependant, il peut être estimé, soit en comparant la méthode testée à une méthode de référence non sélective (avec des cultures pures incubées dans des échantillons d'eau stérilisés ou faiblement contaminés) (Pagel *et al.*, 1982) ; soit en dénombrant les bactéries présentes dans l'échantillon par des techniques de diagnostic direct telles que l'immunofluorescence (Bohlool et Schmidt, 1982).

En pratique courante, on compare entre elles les différentes méthodes testées. Sur milieu gélosé, la comparaison s'effectue pour les dilutions permettant une numération correcte des colonies (généralement entre 30 et 300 colonies par boîtes de Petri). Un minimum de 5 ensemencements par dilution est nécessaire pour utiliser des tests statistiques tels que l'analyse de variance et la comparaison des moyennes pour des petits échantillons. Ces tests paramétriques imposent cependant que les données suivent une distribution normale, ce qui peut être souvent réalisé par une transformation logarithmique des concentrations bactériennes. Dans le cas contraire, la loi de Taylor permet de calculer la transformation adéquate que l'on testera alors par le test de Bartlett (Elliott, 1977). Enfin, d'utilisation plus pratique, les tests non paramétriques peuvent être préférés pour la comparaison des différentes méthodes entre elles (Dagnélie, 1970 ; Elliot, 1977)

Finalement, l'appréciation de la sensibilité et la spécificité conduit à la définition de la méthodologie optimale qui permet la croissance spécifique du plus grand nombre de bactéries recherchées. A l'instar de nombreux auteurs, différentes méthodes d'analyse et divers milieux de culture ont été testés et choisis en tenant compte de ces considérations.

Selon cette démarche, la méthodologie optimale a été sélectionnée pour rechercher spécifiquement les *Escherichia coli*, les entérocoques, les *Clostridium perfringens* et les *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux lagunaires ivoiriennes.

### III.3. Les coliformes / *Escherichia coli*.

Le groupe bactérien des coliformes est le plus recherché en tant qu'indicateur de contamination fécale. L'ensemble des normes et standards s'y réfère pour évaluer la potabilité des eaux de consommation ou la salubrité des milieux aquatiques.

Selon la définition I.S.O. (International Systematic Organisation) citée par Leclerc et al. (1981), les coliformes sont des bactéries Gram -, non sporulées, oxydase -, aérobies ou anaérobies facultatives, capables de se multiplier en présence de sels biliaries et de faire fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 h à une température de 35°- 37°C.

Classiquement, les coliformes comprennent les espèces suivantes : *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* et *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *C. diversus* (*Levinea malonatica*) et *C. amalonaticus* (*L. amalonatica*), *Enterobacter cloacae* et *E. aerogenes*.

Cependant, la spécificité de ce groupe comme témoin de contamination fécale est depuis quelques années de plus en plus critiquée. En fait, ce groupe bactérien n'a aucune réalité systématique. Les espèces qui le composent appartiennent à différents genres de la famille des *Enterobacteriaceae*. Le terme de coliforme, initialement proposé par Breed et Norton (1937) pour désigner les bactéries Lactose+ était équivalent à ceux de groupe colon, coli-aérogènes ou encore *Escherichia-Aerobacter* (Leclerc et al., 1983).

Depuis une dizaine d'année, grâce aux progrès de la biologie moléculaire, la classification bactérienne a pu se libérer de la simple caractérisation phénotypique pour tendre vers une définition plus précise de l'espèce bactérienne. Les méthodes génétiques (hétéroduplex, % GC), moléculaires (études immunologiques des protéines) et de taxonomie numérique sont beaucoup plus rigoureuses. Ces méthodes ont bouleversé la systématique bactérienne et en particulier celle de la famille des *Escherichiaceae* improprement dénommée *Enterobacteriaceae* (Richard, 1983).

Au niveau des coliformes, le recours à différentes stratégies taxonomiques (Gavini et al., 1982 ; Leclerc et al., 1983) a permis d'identifier de nombreuses espèces considérées comme atypiques d'après les techniques d'études conventionnelles. De ce fait, de nouveaux genres et espèces de l'environnement telles que *Serratia fonticola*, *Rahnella aquatilis*, *Klebsiella trevisanii*, *K. terrigena*, *Buttiauxella agresti*, *Enterobacter amnicolus* et *E. intermedium* complètent la liste des coliformes initialement identifiés par les tests IMVIC (I: production d'indole/ M: test du rouge de méthyle/ V: production d'acétyl-méthyl-carbinol: fermentation de l'inositol/ C: utilisation du citrate de sodium).

L'origine aquatique ou tellurique de ces espèces souligne par conséquent l'inadéquation de ce groupe pour témoigner d'une contamination bactérienne d'origine fécale. La recherche des coliformes sans une identification précise des espèces n'a donc aucune signification sanitaire. Il serait donc plus significatif de rechercher exclusivement des coliformes d'origine fécale. A cet égard, la thermotolérance de ces espèces rapportée pour la première fois par Eijkman (1904) peut être mise à profit pour les séparer des espèces de l'environnement. Les coliformes fécaux sont par définition des coliformes qui conservent les mêmes propriétés à 44,5°C comme à 35-37°C. Actuellement, une incubation à 44,5°C est recommandée par l'ensemble des méthodes de référence.

Cependant, le choix de cette température fait l'objet de nombreuses critiques tant au niveau de la sensibilité que de la spécificité obtenues. Ainsi, certains auteurs (Green *et al.*, 1980 ; Dufour *et al.*, 1981) recommandent une pré-incubation de 2 à 4 heures à 35°C avant l'incubation sélective à 44,5°C. Consécutivement à ce traitement, Dufour *et al.* (1981) notent une augmentation de 80% du nombre d'*E. coli* pour des échantillons d'eau de mer analysés sur le milieu m-TEC (Total *E. coli*). Cette pré-incubation permettrait aux bactéries de récupérer et de pouvoir ainsi mieux supporter les hautes températures sélectives pour leur mise en évidence.

D'autre part, lors de l'étude de croissance d'espèces d'origine intestinale en culture pure, Gavini *et al.* (1982) ont montré que la température de 44,5°C inhibait une large proportion de coliformes fécaux. De ce fait, ces auteurs préconisent la température de 41°C qui permet le développement de la quasi-totalité des coliformes fécaux tout en empêchant la croissance des coliformes non fécaux (seuls 9% de *K. oxytoca* seraient alors inhibés).

Dutka (1983) quant à lui conteste cette température pour le manque de spécificité qu'elle procure et propose une incubation à 43°C. Inversement, la thermotolérance n'implique pas systématiquement une origine fécale exclusive. Un certain nombre de travaux (Caplenas *et al.*, 1981 ; Kanarek, 1984) rapportent à cet effet qu'en l'absence de toute contamination fécale, certaines souches de *Klebsiella* thermotolérantes ont pu être isolées dans des effluents industriels riches en matières organiques. La présence d'espèces thermotolérantes d'origine extra-fécale a conduit Cabelli (1979) à recommander la recherche exclusive d'*E. coli* pour apprécier significativement l'origine humaine d'une contamination fécale.

Pour les eaux tropicales, cette recommandation peut s'avérer d'autant plus importante que de nombreux auteurs observent sur les milieux de culture la croissance d'espèces thermotolérantes d'origine extra-fécale (Lavoie, 1983 ; Wright, 1984 ; Carillo *et al.*, 1985).

Suite à ces considérations, nous avons entrepris de comparer différents milieux de culture pour une quantification optimale des *E. coli* dans les eaux lagunaires ivoiriennes.

### III.3.1. Matériel et méthodes.

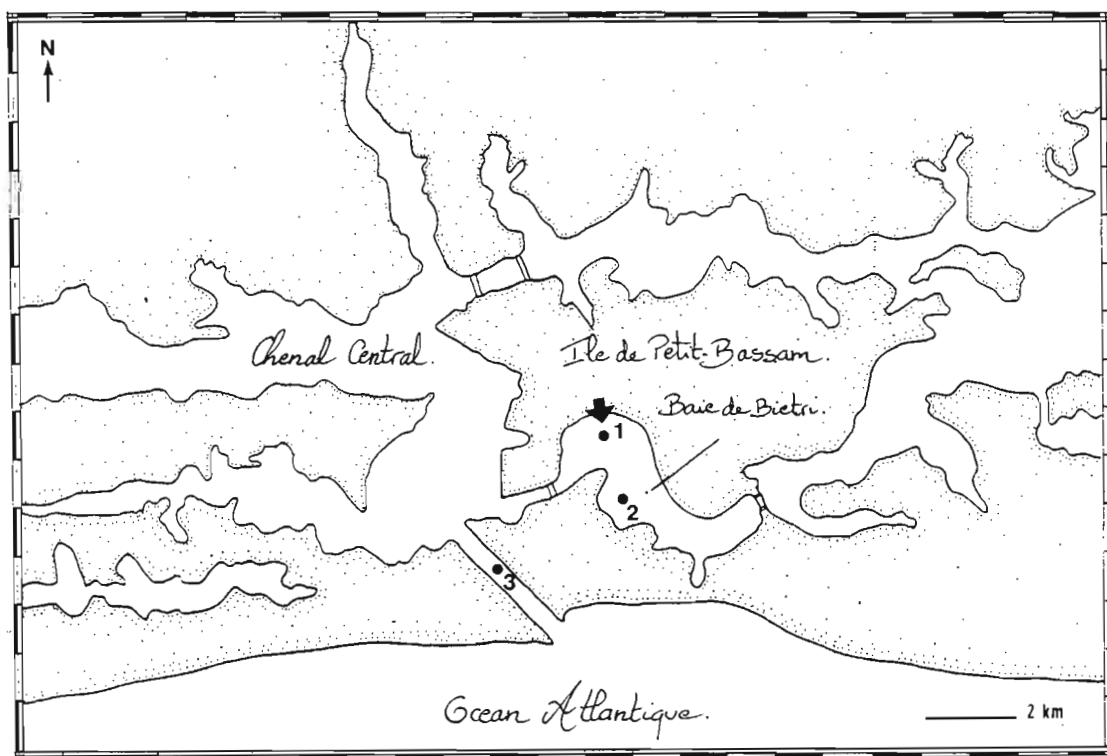
#### \* Echantillons d'eau.

Cette comparaison a été réalisée grâce à l'analyse de 3 échantillons d'eau polluée prélevés en lagune.

Ces échantillons proviennent de la surface de 3 stations différentes (Fig. 7). La station 1, proche du collecteur central qui se rejette en baie de Biétri, a été analysée par étalement direct de 0,1 ml à la surface des milieux de culture tandis que les échantillons d'eau des stations 2 et 3 ont du être analysés par la technique des membranes filtrantes (Filtre Whatman de 47 mm, 0,45 µm de porosité). Les 3 échantillons ont été analysés immédiatement après leurs prélèvements.

Station	t°C	Sal.(%)	pH	mode d'ensemencement
1	29,0	13,0	7,70	étalement en surface
2	29,0	17,5	7,75	membranes filtrantes
3	28,5	24,5	7,95	membranes filtrantes

Tableau 2 : Caractéristiques physico-chimiques et mode d'ensemencement des 3 échantillons.



- La lagune Ebrié au niveau d'Abidjan -

Figure 7 : Localisation des 3 stations de prélèvement des eaux de surface et du principal point de rejet d'eaux d'égout en baie de Biétri ( ↓ ).

Le tableau 2 regroupe les valeurs de température, de salinité et de pH ainsi que le mode d'ensemencement utilisé compte-tenu du degré de contamination.

Les sensibilités respectives des différentes méthodologies mises en oeuvre ont été comparées entre elles en réalisant 5 analyses par échantillons et par milieux de culture.

#### \* Milieux de culture

Pour le dénombrement des *E. coli* dans l'eau, de très nombreux milieux de culture sont disponibles et leurs comparaisons ont fait l'objet de multiples études (Pagel *et al.*, 1982 ; Dufour *et al.*, 1981 ; Wright, 1984).

En tenant compte des conclusions de ces auteurs, 6 milieux de culture ont été présélectionnés pour être testés : le milieu Eosine-bleu de méthylène de Levine (EMB ; BioMérieux), la gélose au desoxycholate lactose (DCL ; BioMérieux), la gélose lactosée au TTC (triphenyltétrazolium chloride) et au tergitol (Institut Pasteur), le milieu m-FC (DIFCO), la gélose ELSAB (Enriched Lauryl Sulphate-Aniline Blue ; Wright, 1984) et le milieu m-TEC (total *E. coli* ; Dufour *et al.*, 1981).

Les compositions de ces milieux et les recommandations respectives de préparation sont présentées annexe 1.

Pour améliorer la sensibilité de la méthodologie, les boîtes de Petri ensemencées ont été préincubées à 37°C pendant 2 à 3 h avant une incubation de 24 +/- 2 heures à 44,5°C. Pour la même raison, l'acide rosanique n'a pas été incorporé dans le milieu m-FC (Presswood et Strong 1978 ; cités par Pagel *et al.*, 1982).

Les colonies d'*E. coli* cultivant sur ces milieux présentent respectivement les caractéristiques morphologiques et tinctoriales suivantes ; colonies noires à reflêt métallique sur le milieu EMB, colonies rouges de forme lenticulaire sur le milieu DCL, colonies jaunes et oranges sur le milieu TTC, colonies bleues foncées sur le milieu m-FC, colonies bleues et bleu-vertes sur le milieu ELSAB et colonies jaunes sur le milieu m-TEC.

#### \* Identification.

L'identification des colonies typiques à l'espèce *E. coli* a été réalisée grâce au tube multi-test T.M.B (Tryptone Mannitol Broth) mis au point par Pugsley *et al.* (1973) (Composition en annexe). Incubé à 44°C pendant 24 h, ce bouillon présente l'avantage de tester simultanément la thermotolérance (croissance à 44°C), la fermentation du mannitol avec production d'acide et de gaz (mises en évidence respectivement par le virage de l'indicateur de pH et par le flottement d'une cloche de Dunham initialement immergée), ainsi que la production d'indole à partir du tryptophane de la tryptone. Ce dernier caractère est apprécié par introduction d'une goutte du réactif de Kovacs (Inst. Pasteur) dont le virage au rouge témoigne immédiatement de la présence d'indole.

Tests biochimiques																				Zid des biotypes d' <u>E.coli</u>					
DNPS	ADH	LEC	DOC	CIT	H S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	IND	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX	Nombres	1	2	3	4
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	14	98,9	-	-	1
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	5	83,3	-	9,8	-
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	3	37,8	-	55,4	-
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	3	92,9	2,6	-	4,1
+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	2	84,9	-	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	2	97,3	-	1,6	0,9
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	2	91,1	-	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	1	63,2	69,1	18,1	-
+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	-	1	-	-	-	-
+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	1	90,1	-	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	1	14,5	0,7	84,1	-
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	1	42,6	-	48,9	-
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	1	38,8	-	56,9	-
+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	1	5,3	88,6	-	-
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	1	63,7	-	32,1	-
+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	1	5,3	88,6	-	-
+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	1	6,9	89,56	-	-
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	1	27,5	-	71,7	-
+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	1	76,1	-	8,9	-
+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	-	1	97,3	-	1,6	0,9
+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	1	99,1	-	0,5	0,3

Tableau 3 : Profils biochimiques et pourcentage d'identification des différents biotypes souches d'Escherichia coli isolées dans les eaux de surface et identifiées avec les galeries API 20E.

Au niveau de ce test, il est important de signaler que, d'une part, ce réactif est fortement bactéricide et que, d'autre part, selon la teneur en tryptophane de la tryptone utilisée, une incorporation supplémentaire de cet acide aminé peut s'avérer nécessaire pour une meilleure visualisation du résultat.

D'après ces auteurs, le tube TMB fournit un résultat fiable et de ce fait, il permet d'identifier facilement et rapidement les colonies d'*E. coli*. Néanmoins, avant de l'utiliser, la fiabilité de cette technique a été vérifiée. Pour ce faire, 50 colonies présomptivement identifiées comme *E. coli* d'après ce test ont été contrôlées par l'utilisation des galeries API 20E \*. De même, 30 colonies présomptivement considérées comme différentes ont été soumises au contrôle.

Pour évaluer la spécificité de chaque milieu de culture, 30 colonies typiques, repiquées au hasard de chacun des milieux ont été purifiées et identifiées grâce au tube TMB. Les caractéristiques morphologiques et tinctoriales typiques des colonies présomptives d'*E. coli* ont été appréciées par comparaison à des colonies-témoins obtenues par ensemencement d'une culture pure d'*E. coli* biotype 1 sur chaque milieu.

### III.3.2. Résultats et discussion.

Le recours au tube TMB de Pugsley *et al.* (1973) présentait un double intérêt, celui d'une part, de limiter la démarche analytique pour une comparaison de la spécificité des différents milieux de culture et celui d'autre part, d'évaluer la fiabilité d'un tel tube pour son utilisation dans le cadre d'analyse de routine.

A l'usage, le tube TMB se révèle très pratique et très satisfaisant puisque toutes les colonies présomptivement assignées à *E. coli* avec ce tube ont été confirmées par le système API 20E.

Inversement, sur les 30 colonies répondant négativement, 2 seulement s'avèrent être des *E. coli* (indole -) avec la galerie API. Le reste des colonies se répartit de la manière suivante :

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	: 21
<i>Citrobacter freundii</i>	: 3
<i>Enterobacter cloacae</i>	: 2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	: 1
<i>Salmonella arizonae</i>	: 1

Hormis *S. arizonae*, ces espèces appartiennent au groupe des coliformes. On observe à côté des *E. coli* une nette dominance des *Klebsiella* et en particulier de *K. pneumoniae*. Cette remarque conforte les résultats de Lavoie (1983) qui avait également noté la forte présence des *Klebsiella* dans les eaux de puits pollués de Côte d'Ivoire.

Les profils biochimiques de l'ensemble des souches d'*E. coli* confirmées mettent en évidence une nette prédominance du biotype 1 d'*E. coli* (Tab. 3). Cette prédominance aurait pu résulter de la stratégie de repiquage, mais nous avons pu vérifier que les différents biotypes d'*E. coli* ne présentaient pas de caractéristiques morphologiques et tinctoriales distinctes.



		Milieux									
		C	G	M/L	I	EMB	DCL	TTC	m-TEC	ELSAB	m-FC
Nombre d' <u>E. coli</u> présumptifs	:					28	30	30	30	28	30
Nombre d' <u>E. coli</u> confirmés	:										
	TMB	+	+	+	+	20	22	25	21	16	25
	TLB	+	+	-/+	+	3	0	0	0	3	0
Total en % (= % de spécificité)	:					82%	73,5%	83%	70%	68%	83%
Nombre de colonies ≠ d' <u>E. coli</u>	:					28	30	30	30	28	30
Nombre d' <u>E. coli</u> atypiques confirmés	:										
	TMB	+	+	+	+	4	7	3	2	4	7
	TLB	+	+	-/+	+	1	0	0	0	0	0
Total en %	:					17%	24%	10%	6%	13%	24%
Rapport de "Caractérisation"	:					4,8	3,1	8,3	11,7	5,2	3,5

C: croissance à 44,5°C ; G: production de gaz ;  
M/L: mannitol+ / lac+ ; I: production d'indole.

Tableau 4 : Evaluation de la sélectivité des 6 milieux de culture utilisés pour la numération des Escherichia coli dans les eaux lagunaires.

D'autre part, ce biotype correspond à celui recommandé par Bonde (1977) en tant qu'indicateur de contamination fécale dans les eaux tempérées. Cette recommandation pourrait donc également s'avérer valable pour ce milieu aquatique tropical.

Les résultats sur l'évaluation de la spécificité des 6 milieux de culture sont présentés (Tab. 4). Les différents pourcentages ont été déterminés d'après les tests du tube TMB. Néanmoins, les colonies ne faisant pas fermenter le mannitol ont aussi été testées vis à vis du lactose avec un tube TLB dans lequel le lactose remplaçait le mannitol (Pugsley *et al.*, 1973). Au total, 7 colonies répondant négativement avec le TMB ont tout de même pu être assignées à *E. coli* du fait de la fermentation du lactose. Ces colonies proviennent de 2 milieux de culture (EMB et ELSAB). Ces données s'opposent donc aux motivations qui ont conduit Pugsley *et al.* (1973) à préférer le mannitol dans leur tube multitest.

En effet, ces auteurs se sont référés aux travaux de Holden (1970) qui signalait dans les eaux tropicales, l'existence de bactéries coliformes (autres qu'*E. coli*) capables de faire fermenter le lactose et produire de l'indole à 44°C. D'autre part, toujours d'après ces auteurs, certaines souches d'*E. coli* produiraient par fermentation de lactose une quantité trop faible de gaz pour être détectable alors que la fermentation du mannitol permettrait une production plus importante de gaz.

Dans leur étude, Pugsley *et al.* (1973) rapportaient que 7 souches sur 529 testées étaient incapables de produire du gaz avec du lactose (alors qu'elles en produisaient avec du mannitol) et qu'à l'inverse toutes les souches qui ne produisaient pas de gaz par fermentation du lactose n'en produisaient pas non plus avec le mannitol. Bien que se référant à beaucoup moins de souches, notre étude contredit donc ces constatations puisque des souches incapables de produire du gaz par fermentation du mannitol se sont révélées positives avec le lactose.

Ces considérations soulignent par conséquent les insuffisances du tube TMB pour identifier les colonies cultivant sur les milieux EMB et ELSAB. L'adéquation de ce tube pour les autres milieux reste néanmoins valable, en particulier pour le milieu m-FC puisque des *E. coli* atypiques (Lactose -) ont été isolés sur ce milieu (Rychert et Stephenson, 1986).

Les 6 milieux se distinguent par un pourcentage de spécificité très différent. On distingue 2 groupes dont le premier avec les milieux EMB, TTC et m-FC présente les meilleurs résultats (82-83 %). Cependant, ces pourcentages sont loin des 93-95 % de spécificité mentionnés avec le milieu m-FC dans les écosystèmes tempérés (Anonimous, 1976 ; Pagel *et al.*, 1982). Comparativement, on observe donc une diminution de spécificité d'environ 12%. Ce même écart existe également pour le milieu m-TEC entre nos valeurs et celle de Pagel *et al.* (1982). A l'instar de Lavoie (1983) et Wright (1984), on doit donc évoquer la possibilité d'une contamination des cultures par des bactéries thermotolérantes différentes d'*E. coli*. Ces bactéries appartiendraient à la flore autochtone du milieu lagunaire qui par sa température élevée (29°C) pourrait favoriser des micro-organismes capables de tolérer la température d'incubation supposée sélective pour *E. coli*. L'isolement et l'identification de telles bactéries devraient confirmer cette hypothèse. D'après les analyses d'eaux de puits contaminés réalisées en Côte d'Ivoire (Lavoie, 1983), la spécificité du milieu m-FC avec de tels échantillons serait encore plus faible (66%) ce qui laisserait donc suspecter l'origine tellurique ou dulçaquicole de telles bactéries.

	STATION 1			STATION 2			STATION 3		
milieu	UFC / 0,01 ml			UFC / 10 ml			UFC / 20 ml		
EMB	25 ; 43 ; 50 ; i. ; i.			10 ; 11 ; i. ; i. ; i.			31 ; 45 ; 50 ; i. ; i.		
DCL	29 ; 31 ; 34 ; 40 ; 54			14 ; 17 ; 21 ; 24 ; 36			50 ; 57 ; 65 ; 74 ; 88		
TTC	34 ; 36 ; 41 ; 58 ; 58			07 ; 10 ; 11 ; 13 ; 25			60 ; 75 ; 76 ; 69 ; 86		
m-TEC	38 ; 57 ; 59 ; 60 ; 65			23 ; 24 ; 27 ; 28 ; 40			70 ; 82 ; 90 ; 96 ; 105		
ELSAB	43 ; 46 ; 52 ; 55 ; 66			18 ; 20 ; 20 ; 25 ; 40			78 ; 84 ; 86 ; 91 ; 93		
m-FC	32 ; 40 ; 43 ; 45 ; 50			17 ; 28 ; 38 ; 39 ; 53			89 ; 113 ; 115 ; 115 ; 121		

i.: Dénombrement impossible.

Après correction de la spécificité de chaque milieu et pour 100 ml.

milieu	m	s	C.V%	m	s	C.V%	m	s	C.V%
EMB	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DCL	276000	75365,8	36,1%	163	64,6	40,1%	237	68,9	29,1%
TTC	376000	97365,3	25,9%	110	58,7	53,4%	306	44,1	14,4%
m-TEC	391000	70746,0	18,1%	200	47,4	23,7%	308	47,3	15,4%
ELSAB	354000	62289,6	17,6%	168	59,7	35,6%	294	13,9	7,1%
m-FC	349000	53665,6	15,4%	288	111,7	38,8%	458	50,6	11,0%

m : moyenne    s : écart-type    C.V% : coefficient de variation

Tableau 5 : Résultats des analyses des 3 échantillons.

Par ailleurs, cette contamination ne semble pas uniquement résulter de la thermotolérance de bactéries autochtones puisque comparativement aux travaux de Oudart (1980), les milieux TTC et DCL présentent dans notre étude les mêmes spécificités que celles calculées avec des échantillons d'eaux d'une station d'épuration française (83 et 69 %). Si l'existence de bactéries indigènes thermotolérantes se vérifiait, ces résultats mettraient donc en évidence la sensibilité de ces bactéries aux agents de sélection présents dans les milieux TTC et DCL, soit le tergitol, le chlorure de triphenyltétraazolium et le rouge de phénol du milieu TTC, soit le desoxycholate de sodium (1,2%) et le rouge neutre du milieu DCL. De tels agents pourraient alors être ajoutés aux milieux m-TEC, m-FC et EMB pour accroître leurs spécificités.

D'autre part, la possibilité de reconnaître précisément les colonies d' E. coli constitue également un critère de choix d'un milieu de culture. A cet égard, les milieux DCL et m-FC présentent les plus mauvais résultats puisque 24 % des colonies considérées présomptivement différentes d'E. coli se révèlent en fait appartenir à cette espèce.

Pour mieux comparer les différents milieux, nous avons défini et calculé un rapport de "caractérisation", correspondant au rapport du pourcentage de spécificité sur le pourcentage d'E. coli atypiques dénombrés parmi les colonies non présomptives. Ainsi, ce rapport confirme la supériorité relative des milieux m-TEC et TTC pour dénombrer spécifiquement les colonies d'E. coli. La supériorité du milieu m-TEC avait initialement été signalée par Dufour et al. (1981) qui améliorent encore cette caractérisation par la réalisation d'un test uréase in situ. Le mauvais résultat du milieu m-FC semble spécifique aux échantillons lagunaires puisque Lavoie (1984) n'a identifié aucun E. coli parmi les 24 colonies ne montrant pas de coloration bleue sur ce milieu.

Cette différence témoigne de l'existence d' E. coli atypique dans les échantillons analysés et ces taxons formaient des colonies jaunes de 2 à 3 mm de diamètre. De telles colonies jaunes d'E. coli ont déjà été mises en évidence sur le milieu m-FC et ceux-ci seraient lactose - (Rychert et Stepherson, 1981 et 1986).

L'étude plus spécifique de ces souches devra faire l'objet d'investigations ultérieures. Une meilleure caractérisation morphologique et tinctoriale de ces souches permettrait alors un dénombrement plus précis des E. coli dans les eaux lagunaires ivoiriennes.

Les résultats bruts des dénombrements sont présentés dans le tableau 5 et après correction de la spécificité, les moyennes, les écart-types et les coefficients de variation ont été estimés pour 100 ml d'échantillon. Ces paramètres n'ont pas pu être calculés pour le milieu EMB car dans de nombreux cas, les dénombrements se sont avérés irréalisables du fait de l'envahissement des boîtes de Petri par des colonies non identifiées. Malgré un bon pourcentage de spécificité parmi les colonies typiques d'E. coli, la sélectivité de ce milieu ne se révèle pas suffisante pour ce type d'échantillons.

Pour les autres milieux, leur classement d'après les valeurs de ces paramètres diffère selon l'échantillon. On observe néanmoins que les milieux m-FC et m-TEC permettent les meilleurs recouvrements tandis que pour 2 échantillons, le milieu DCL présente les plus mauvais résultats avec des moyennes faibles et des coefficients de variation très élevés.

Pour évaluer la signification des différences de dénombrement des *E. coli*, nous avons utilisé un test non paramétrique ; le test de Kruskal et Wallis (Dagnelie, 1970).

La réalisation de ce test est basée sur le classement de l'ensemble des N observations par ordre croissant, la détermination du rang de chacune d'elles et le calcul des sommes des rangs  $Y_i$  relatives aux différents milieux. A partir des ces sommes, on calcule alors :

$$K = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^p \frac{Y_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

où n désigne le nombre de boîtesensemencées pour chaque milieu et N, le nombre total de boîtesensemencées.

Cette valeur K suit approximativement une loi de CHI2 à p-1 degrés de liberté. L'hypothèse d'identité des p populations, au niveau "a" est rejetée lorsque  $CHI2_{obs.} > CHI2_{théo.}$

Pour les échantillons des stations 1, 2 et 3, les valeurs de K sont respectivement de 6,4, 10,8 et 14,6. On constate donc que plus la station échantillonnée s'éloigne du point de rejet, plus les différences entre les milieux de culture s'accroissent.

Cette constatation rejoint celles de nombreux auteurs qui rapportent l'existence d'un stress subi par les bactéries allochtones lors de leur rejet dans le milieu aquatique (Bissonnette et al., 1975).

Ce stress résulterait d'un choc thermique, osmotique et nutritionnel (Carlucci et Pramer, 1960) qui en se répercutant sur la viabilité des bactéries, conditionnerait leurs recouvrements sur les milieux de culture sélectifs (Zaske et al., 1980). De même, la mise en évidence de bactéries viables mais incapables de croître sur ces milieux confirment l'influence de ce stress (Xu et al., 1982). La sensibilité bactérienne aux agents sélectifs de culture serait donc simultanément conditionnée par la durée de séjour de la bactérie et par l'"agressivité" des paramètres de l'environnement. Anderson et al. (1979) notent par exemple, que plus la salinité est élevée, plus les conséquences de ce stress se manifestent rapidement.

Néanmoins, au seuil  $\alpha = 0,05$ , seuls les échantillons 2 et 3 permettent de mettre en évidence des différences significatives entre les milieux de culture. Les bactéries rejetées par le collecteur au niveau de la station 1 supportent donc indifféremment la sélectivité des milieux de culture utilisés pour les isoler. Elles n'ont donc ni séjourné suffisamment longtemps pour être stressées, ni rencontré un environnement défavorable à leur aptitude à croître sur les milieux sélectifs utilisés.

D'autre part, les échantillons n'ont pas été analysés avec la même technique et ces différences de dénombrement pourraient aussi être reliées à la méthode d'analyse. En effet, des phénomènes d'antibiose et de compétition s'exercent entre les espèces bactériennes cultivant à la surface des milieux de culture et se répercutent sur la croissance de certaines espèces (LeChevalier et Mc Feters, 1985). La technique des membranes filtrantes en concentrant l'ensemble des bactéries favoriserait donc l'expression de ces phénomènes et mettrait plus significativement en relief les différences de sélectivité des divers milieux de culture.

D'après le dénombrement de l'ensemble des bactéries cultivant sur le milieu m-TEC, la densité des bactéries dénombrées sur la membrane filtrante (St. 3) serait 10 fois plus forte que celle à la surface de la boîte de Petri après étalement (St. 1).

De la même manière, ces phénomènes d'antibiose et de compétition pourraient être à l'origine des différences significatives de dénombrement observées entre les milieux. La sensibilité des populations indigènes aux agents sélectifs de chaque milieu conditionnerait la qualité du recouvrement des *E. coli*.

En estimant l'ensemble des populations cultivant à la surface des membranes filtrantes de l'échantillon 3, les milieux de culture ont été classés selon leur sélectivité totale. Le classement croissant est le suivant : m-TEC > m-FC > TTC > ELSAB > DCL > EMB. Celui-ci est tout à fait en accord avec les dénombrements des *E. coli* sur ces milieux et souligne par conséquent l'influence des populations autochtones thermotolérantes sur la croissance des *E. coli*.

D'après les résultats de cette étude, les milieux m-FC et m-TEC permettent donc le dénombrement du plus grand nombre d' *E. coli* dans les eaux lagunaires ivoiriennes. Par contre, spécialement composé pour rechercher les *E. coli* dans les eaux tropicales, le milieu ELSAB ne présente pas d'intérêt supplémentaire et au contraire, la distinction spécifique des *E. coli* paraît difficile. A cet égard, le milieu TTC permet une très bonne caractérisation des *E. coli* mais cette aptitude semble satisfaite au détriment de la sensibilité surtout pour les stations éloignées des points de rejet. Néanmoins, avec une des meilleures spécificités, ce milieu peut être utilisé pour les eaux d'égout. Enfin, les milieux DCL et surtout EMB ne présentent pas une sélectivité suffisante pour ce type d'échantillon.

Cette étude souligne la nécessité de prendre en compte également les caractéristiques physico-chimiques de l'échantillon à analyser pour sélectionner le milieu de culture le plus adéquat à l'espèce recherchée. Aucun milieu ne s'avère en effet idéal pour analyser les différents types d'échantillons. La préparation de celui-ci reste donc à optimiser en sélectionnant les meilleures caractéristiques de chacun des milieux de culture.

#### III.4. Les entérocoques.

Initialement créé par Thiercelin pour désigner *Streptococcus faecalis* (in Mundt (1983), le terme entérocoque est utilisé aujourd'hui, pour regrouper parmi les streptocoques du groupe sérologique D de Lancefield, les espèces suivantes ; *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *S. durans* et *S. avium* (Facklam, 1980). Ce groupe se différencie de celui plus général des streptocoques fécaux qui comprend en plus des streptocoques d'origine exclusivement animale ; *S. bovis* et *S. equinus*. D'autre part, des études taxonomiques ont conduit différents auteurs à proposer le statut de genre (*Enterococcus*) à ce groupe bactérien (Schleifer et Kilpper-Baltz, 1984).

Appartenant à la famille des *Streptococcaceae*, les streptocoques du groupe D sont des coques aérobies-anaérobies facultatifs, Gram -, cytochrome - et les entérocoques s'y distinguent par leur aptitude à se développer à 10°C et 45°C ainsi que par leur croissance sur des milieux hostiles tel qu'un milieu à pH 9,6 ou un bouillon à 6,5% de chlorure de sodium.

Tests Espèces	Catalase	Croissance 6,5% NaCl	Mannitol	Sorbitol	Arabinose
<i>S. faecalis</i>	-	+	+	+	-
<i>S. faecium</i>	-	+	+	-	+
<i>S. durans</i>	-	+	-	-	-
<i>S. avium</i>	-	+	+	+	+
<i>S. bovis</i>	-	-	+/-	-	-

Tableau 6 : Différenciation des streptocoques du groupe D.  
(D'après Falkam et Wilkinson, 1981).

Les tubes digestifs de l'homme et des animaux homéothermes sont les biotopes privilégiés de ces micro-organismes qui, de ce fait, ont été très tôt proposés comme indicateurs de contamination fécale (Malmann et Sypien, 1934 ; in Mundt, 1983). Quelques autres streptocoques peuvent être isolés dans les fèces mais n'appartiennent pas au groupe sérologique D de Lancefield ; c'est le cas de *S. mitis* et *S. salivarius* que l'on retrouve dans la bouche de l'homme et qui sont avalés avec la salive.

Bien qu'ils comptent parmi les hôtes normaux du tube digestif de l'homme, ils peuvent occasionnellement être pathogènes. Ainsi, ils sont responsables chez l'homme d'infections du tractus urinaire et sont à l'origine de 10 à 20% de l'ensemble des endocardites bactériennes ; on les trouve aussi dans les pus abdominaux et sur des plaies infectées (Facklam, 1980).

Différents milieux de culture ont été proposés et comparés pour l'isolement des streptocoques du groupe D (Facklam, 1973 ; Dutka et Kwan, 1978) et actuellement, les plus forts taux de recouvrement dans les eaux de surface sont obtenus avec les milieux P.S.E. (Pfizer Selective Enterococcus agar : Isenberg *et al.*, 1970) et K.F. (Kenner *et al.*, 1961). Certains auteurs préfèrent le milieu PSE qui nécessite une incubation plus courte (24h), comparativement aux 48 heures d'incubation pour le milieu KF (Dutka et Kwan, 1978). Cependant, aucun milieu de culture n'est suffisamment sélectif pour permettre d'isoler uniquement les entérocoques.

A cet égard, Brosky et Schiemann (1976) notent néanmoins que le milieu PSE incubé à 35°C est le plus sélectif pour l'isolement des entérocoques avec respectivement 90% et 86% des souches qui appartiennent aux groupes des streptocoques fécaux et des entérocoques. La sélectivité de ce milieu résulte de la présence d'esculine (1 g/l), de bile (10 g/l) et d'azide de Na (0,25 g/l) (Isenberg *et al.*, 1970). Du fait de la réduction de l'esculine, les streptocoques du groupe D et les entérocoques cultivant sur ce milieu se présentent sous la forme de petites colonies translucides entourées d'un halo noir.

D'autre part, la température d'incubation de 44°C permet une culture plus sélective des entérocoques sans entraîner une modification de la sensibilité (100% d'entérocoques à 44°C au lieu de 85% à 35°C) (Tosti et Volterra, 1984) ; cette température empêcherait la croissance des *Streptococcus mitis*, *sanguis*, *uberis*, *salivarius* et *pyogenes* qui cultivent sur la gélose D-Coccosel à 35°C.

A la suite de ces études, nous avons choisi de rechercher les entérocoques dans le milieu lagunaire en incubant les échantillons à 44°C pendant 24 heures sur le milieu PSE (gélose D-coccosel de BioMérieux)). Cependant, avant son utilisation, la spécificité de cette méthodologie a été évaluée pour les échantillons d'eau lagunaire.

#### III.4.1 Matériel et méthodes.

Cette évaluation a été réalisée en identifiant les colonies qui cultivaient sur la gélose D-Coccosel (composition en annexe 1) après 24 h d'incubation à 44°C. Cette gélose a été ensemencée par étalement en surface de 0,1 ml d'échantillon d'eau lagunaire polluée. Seules les colonies translucides entourées d'un halo noir ont été prises en compte. Les différentes souches repiquées au hasard ont été purifiées puis identifiées d'après les caractères de différenciation (Tab. 6) (Falkam et Wilkinson, 1981) ; Coloration de Gram, Catalase, croissance en bouillon à 6,5 % de NaCl, fermentation du mannitol, du sorbitol et de l'arabinose.



Ainsi, parmi les streptocoques du groupe D de Lancefield, les espèces suivantes ont été différenciées : *Streptococcus faecalis*, *S. faecium*, *S. durans*, *S. avium* et *S. bovis*. De plus, ce protocole a permis d'éliminer *Listeria monocytogenes*, bactérie à Gram+ qui cultive aussi sur cette gélose D-Coccosel mais qui est catalase + et mannitol - (Lennette et al., 1980).

#### III.4.2. Résultats et discussion.

Parmi les 75 souches identifiées, le pourcentage de chaque espèce est présenté (Tab. 7). Bien que simple, le protocole d'identification utilisé a permis de réaliser le diagnostic d'espèces pour 70 souches cultivant sur gélose D-Coccosel en formant des colonies translucides entourées d'un halo noir. Ces espèces peuvent toutes être considérées comme d'origine fécale et ce résultat confirme l'intérêt de l'incubation à 44 °C proposée par Tosti et Volterra (1984). Les colonies restantes présentaient trop de réponses négatives aux tests utilisés pour une identification satisfaisante.

Parmi ces streptocoques fécaux, on observe une nette prédominance des espèces *S. faecium* et *S. durans* avec respectivement 28 et 26,5 % de fréquence; on note aussi la présence significative de *S. bovis* et *S. avium*, streptocoques d'origine exclusivement animale. Le pourcentage des entérocoques dans les eaux lagunaires s'élève à 74,5 % mais la spécificité de cette méthodologie vis à vis des entérocoques n'est pas aussi élevée que celle observée par Tosti et Volterra (1984). La présence de streptocoques d'origine animale est à l'origine de cette différence et constitue un biais non négligeable à l'évaluation de la contamination fécale d'origine humaine.

Espèces	Nombre	%
<i>S. faecalis</i>	4	5,5
<i>S. faecium</i>	21	28,0
<i>S. durans</i>	20	26,5
<i>S. avium</i>	11	14,5
<i>S. bovis</i>	12	16,0
Cat-, NaCl-, Man-, Sor-, Ara-	4	5,5
Cat+, NaCl-, Man-, Sor-, Ara-	1	1,5

Tableau 7 : Identification des colonies isolées sur gélose D-Coccosel incubée à 44°C.

### III.5. Clostridium perfringens

Clostridium perfringens est un bacille anaérobie strict et sporulant, capable de réduire le sulfite en sulfure à 48°C en 24 heures. Cette bactérie à Gram+ présente une croissance optimale à 35-37°C mais elle peut se développer jusqu'à 50°C.

Certains types de Clostridium perfringens (A et C) sont pathogènes pour les hommes et les animaux. Ils sont la cause chez l'homme, d'entérites nécrosantes, de diarrhées, de gangrènes gazeuses ou de toxi-infections alimentaires ; plus de 50% des intoxications à caractère collectif seraient dues à C. perfringens (Romond et al., 1981). Présente dans les matières fécales humaines et animales, dans les sols et dans les eaux douces et marines, C. perfringens est la bactérie anaérobie pathogène la plus répandue dans l'environnement. On la retrouve le plus souvent dans le tube digestif des homéothermes et de ce fait, elle fut très tôt proposée comme bactérie témoin de contamination fécale (Klein et Houston, 1899 ; in Bisson et Cabelli, 1979).

Cependant, de part sa distribution ubiquiste dans l'environnement, son utilisation en tant qu'indicateur de pollution reste controversée. Ainsi, les hygiénistes américains critiquent la signification de cet indicateur dans l'analyse des eaux (Prescott et al., 1945) tandis que de nombreux auteurs européens soulignent l'intérêt de rechercher Clostridium perfringens (Taylor, 1958 ; Buttiaux, 1951 in Bonde, 1977) ou plus précisément sa forme non sporulée (Wilson et Blair, 1925). Pour certains d'entre eux (Taylor, 1958 ; Bonde, 1977), sa recherche doit toutefois être réservée pour des situations bien particulières telles que l'analyse des eaux chlorées ou contenant des substances toxiques pour les bactéries non sporulées et dans le cas où la pollution à détecter est d'origine ancienne.

Sa recherche peut être effectuée de nombreuses façons. Les techniques utilisées se réfèrent aux caractéristiques physiologiques de la bactérie ; culture en anaérobiose, croissance à 46°C, sulfito-réduction en présence de sels de Fer. Mais leur sélectivité provient surtout de l'incorporation dans le milieu de culture d'agents inhibiteurs tels que le sulfite, la cyclosérine, la polymyxine ou la néomycine.

Bisson et Cabelli (1979), critiquant le manque de spécificité des milieux disponibles, proposent un milieu gélosé pour la recherche spécifique du C. perfringens. Ce milieu présente l'avantage d'utiliser les membranes filtrantes. Cependant la nécessité de maintenir les boîtes de Pétri en jarres anaérobies jusqu'à leurs ensemencements limite son utilisation en analyse routinière. La technique des tubes multiples peut être également envisagée avec le milieu L.S (Lactose-Sulfite) de Romond et al. (1981) afin de dénombrer les C. perfringens dans les aliments.

Pour cette étude, nous avons choisi le milieu gélosé de Marshall et al. (1965) (gélose Trypcase, Sulfite, Neomycine -TSN- de BioMérieux) mentionné dans les directives applicables à la surveillance de la qualité sanitaire des eaux littorales méditerranéennes (OMS-PNUE, 1977). Ce milieu gélosé permet l'isolement sélectif de C. perfringens par la mise en évidence du pouvoir sulfito-réducteur à 46°C. Cependant, pour conforter ce choix, sa spécificité a été évaluée avec des échantillons d'eaux lagunaires ivoirien-

Echantillon	t°C	Sal.(%)	pH	O2 (ppm)/redox (mV)
Eau de surface	29,5	26,7	7,9	9,2 / +215
Sédiment en suspension	27,9	30,4	8,2	0 / -130

Tableau 8 : Caractéristiques physico-chimiques des échantillons analysés.

Espèces	Mobilité	Fermentation du				Hydrolyse de		
		Glucose	Mannitol	Lactose	Sucrose	Esculine	Gélatine	Caséine
<i>C. bifementans</i>	+	+	-	-	-	V	+	+
<i>C. botulinum</i> type A	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>C. botulinum</i> type B	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>C. butyricum</i>	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>C. cadaveris</i>	+	+	-	-	-	-	V	-
<i>C. clostridiiforme</i>	V	+	-	+	+	+	-	-
<i>C. difficile</i>	V	+	+	-	-	+	-	-
<i>C. histolyticum</i>	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. innocuum</i>	-	+	+	-	V	+	-	-
<i>C. limosum</i>	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. novyi</i> type A	+	+	-	-	-	V	+	-
<i>C. paraputrificum</i>	+	+	-	+	+	+	-	-
<i>C. perfringens</i>	-	+	-	+	+	V	+	-
<i>C. ramosum</i>	-	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. septicum</i>	+	+	-	+	-	+	+	-
<i>C. sordellii</i>	+	+	-	-	-	-	+	+
<i>C. sphenoides</i>	V	+	V	+	+	+	-	-
<i>C. sporogenes</i>	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>C. subterminale</i>	+	-	-	-	-	-	+	+
<i>C. tertium</i>	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>C. tetani</i>	+	-	-	-	-	-	+	-

+, réaction positive ; -, réaction négative ; V, réaction variable.

Tableau 9 : Principales caractéristiques permettant de différencier les espèces de *Clostridium* (d'après Smith et Dowell, 1980 et Hill, 1981).

### III.5.1 Matériel et méthodes.

#### \* Echantillons

Cette évaluation a été réalisée avec des colonies provenant d'échantillons d'eau et de sédiment de lagune dont la température, la salinité, le pH et le potentiel Redox sont présentés (Tab. 8).

Les échantillons ont été analysés dans l'heure suivant leur prélèvement. Un millilitre de chacun des échantillons a été incorporé dans 15 ml de gélose T.S.N maintenue en surfusion, puis mis en incubation au bain-marie à 46°C pendant 30 heures après prise en masse de la gélose.

Pour chaque ensemencement, 30 colonies sphériques et présentant une auréole noire dans ce milieu ont été repiquées au hasard dans un bouillon anaérobie (Bouillon au thioglycolate, BioMérieux) régénéré au bain-marie avant ensemencement. Après 24 heures d'incubation à 37°C, les différentes colonies ont été alors identifiées.

#### \* Identification

Pour l'identification des colonies sulfite-réductrices, 2 caractéristiques spécifiques de l'espèce C. perfringens ont été sélectionnées d'après les potentialités biochimiques des Clostridium présentées dans le tableau 9 ; l'hydrolyse de la gélatine et la fermentation du saccharose.

La gélatinolyse a été testée en incubant à 37°C les colonies dans un bouillon au thioglycolate (BioMérieux) solidifié par l'incorporation de gélatine en poudre (concentration finale : 60 g/l). La liquéfaction du milieu témoigne de la capacité de la bactérie à hydrolyser la gélatine, la consistance du milieu étant appréciée après réfrigération des tubes pendant une quinzaine de minutes.

La fermentation du saccharose a été étudiée en repiquant sous azote les colonies dans un bouillon anaérobie préparé en s'inspirant du milieu de Romond et al. (1981) et contenant du saccharose et un indicateur de pH (annexe 1). Après une incubation à 37°C, le virage au jaune de l'indicateur de pH témoigne de l'utilisation du sucre. Les colonies Gel+ et Sac+ sont considérées comme C. perfringens.

Cette identification a été complétée par l'étude de la fermentation du lactose réalisée en milieu liquide -Lactose, Sulfite-de Romond et al. (1981). D'après ces auteurs, ce milieu incubé à 46°C permet en moins de 24 heures le dénombrement spécifique du C. perfringens puisque dans ce milieu et à cette température, seul Clostridium peut faire fermenter le lactose avec développement gazeux et réduire le sulfite en sulfure.

	Mobilité	Col. de Gram	Gel.	Sac.	Lac.	n
Surface (N = 30)	-	+	+	+	+	28
	-	+	+	-	+	2
Fond (N = 30 )	-	+	+	+	+	30

Gel : Gélatine, Sac : Saccharose, Lac : Lactose.

Tableau 10 : Résultats des tests d'identification des N colonies sulfito-réductrices cultivant en gélose profonde dans le milieu TSN isolées dans des échantillons d'eau de surface ou prélevée en profondeur.

### III.5.2. Résultats et discussion.

La quasi-totalité des colonies cultivant à 46°C dans la gélose T.S.N. sont sulfito-réductrices. La précipitation du sel de fer avec formation de sulfure de fer noir permet facilement le dénombrement de ces colonies sphériques et noires. Ce dénombrement doit être réalisé rapidement (24 à 36 heures d'incubation), soit avant le noircissement total du tube qui empêche une visualisation correcte des colonies.

Sur les 30 colonies repiquées à partir de la culture de l'échantillon d'eau de surface, 28 sont formées par des bacilles Gram+, immobiles, Gel+, Sac+ et Lac+ (Tab. 10). Capables de plus de croître en présence de sulfite, ceux-ci sont comptés comme *C. perfringens*.

Seules, deux colonies se sont révélées ne pas être *C. perfringens* car incapables de faire fermenter le saccharose. Ces 2 bactéries sont d'autre part, mobiles, gélatine + et capables de faire fermenter le lactose avec production de gaz dans le milieu L.S.. D'après le tableau 9, on peut les identifier comme *C. septicum*; *C. perfringens* n'est donc pas la seule espèce de ce genre à pouvoir à 46°C faire fermenter le lactose et réduire le sulfite. Ces bactéries en cultivant dans le milieu faussent le dénombrement des *C. perfringens* par la technique des tubes multiples utilisée par Romond et al. (1985).

Pour l'échantillon de sédiment, les 30 colonies repiquées se sont révélées immobiles, Gram + et positives pour les 3 tests (Tab. 10).

La gélose T.S.N. présente donc une bonne spécificité pour dénombrer exclusivement les *Clostridium perfringens* (93 à 100%) dans les eaux et sédiments lagunaires. Il peut être utilisé en tubes selon la méthode d'incorporation en gélose profonde ou bien en boîte de Petri avec les membranes filtrantes. Dans ce cas, les cultures doivent être incubées dans une jarre sous atmosphère anaérobie.

### III.6. *Pseudomonas aeruginosa*.

L'incidence croissante de *Pseudomonas aeruginosa* dans diverses infections (otites externes, éruptions cutanées) (Hoadley, 1977) contractées lors de la fréquentation de milieux aquatiques pollués, justifiait la recherche de cette bactérie dans le milieu lagunaire.

Du point de vue systématique, *P. aeruginosa* appartient au genre *Pseudomonas*; c'est un bacille aérobie strict, mobile, Gram -, qui possède une ciliature polaire monotriche et qui est catalase + et oxydase +.

Il constitue avec *P. fluorescens* et *P. putida*, le groupe des *Pseudomonas* fluorescents caractérisé par la production de pigments hydro-solubles et fluorescents sous lumière ultraviolette (Hugh et Gilardi, 1980).

*P. aeruginosa* est le seul de ce groupe à produire 2 pigments : la pyocyanine bleue, soluble dans le chloroforme et spécifique à *P. aeruginosa*, et la pyoverdine verte et insoluble dans le chloroforme.

De nombreux *Pseudomonas* sont pathogènes pour les plantes ou pour les animaux poïkilothermes (Hugh et Gilardi, 1980). Néanmoins jusqu'à présent, *P. aeruginosa* est le plus fréquemment impliqué dans la pathologie de l'homme et des animaux homéothermes (Bonde, 1977). La diversité des implications pathologiques de cette bactérie opportuniste serait liée à sa virulence multifactorielle (Nicas et Iglewski, 1985).

La distribution de *P. aeruginosa* est très ubiquiste puisqu'il est aussi bien isolé chez l'homme que dans les eaux de surface, dans le sol, sur de la végétation (Hoadley, 1977). Dans le sol, *P. aeruginosa* survit plus longtemps qu'*E. coli* (Klein et Casida, 1967) et les observations de Zechman et Casida (1982) semblent indiquer que cette bactérie persiste alors sous une forme dormante semblable en quelque sorte à un kyste.

Son indice de présence dans le tube digestif des homéothermes est faible (10%) (Hugh et Gilardi, 1980) et de ce fait, l'appartenance de *P. aeruginosa* à la flore intestinale humaine reste controversée (Hugh et Gilardi, 1980 ; Dutka, 1981).

Néanmoins, il est généralement admis que les rejets anthropiques sont à l'origine de sa présence dans l'environnement (Hoadley, 1977 ; - Wheeler et al., 1980) et ce micro-organisme est également considéré comme un indicateur de la qualité des eaux (Foster et al., 1971 ; Bonde, 1977).

Selon la procédure utilisée (membranes filtrantes ou tubes multiples), différents milieux de culture liquides ou solides ont été proposés mais le milieu gélosé m.PA de Levin et Cabelli (1972) s'avère le mieux adapté pour différents types d'eau analysés par la technique des membranes filtrantes (Levin et Cabelli, 1972 ; Martins et al., 1982). La sélectivité du milieu résulte de l'addition d'antibiotiques (sulphapyridine, kanamycine, acide nalidixique et actidione). Après une incubation à 41,5°C pendant 48-96 heures, *P. aeruginosa* forme des colonies caractéristiques de couleur brun ou vert foncé.

Dutka et Kwan (1977) en modifiant légèrement la composition de ce milieu (addition de sulfate de magnésium et réduction de la concentration en thiosulfate de sodium) obtiennent des résultats sensiblement supérieurs quel que soit le type d'eau analysée (eaux d'égout, eaux naturelles canadiennes). Leur milieu m.PA-B présente de plus une très bonne spécificité puisque 92 à 99 % des colonies typiques sont confirmés. Ce milieu est recommandé dans les Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (1975).

Cependant, tout en confirmant la supériorité du m.PA-B, Martins et al. (1982) signalent la faible sélectivité du milieu ensemencé par des eaux douces ou salées. Bien qu'ils notent le développement de nombreuses colonies thermophiles indésirables, le pourcentage de confirmation des colonies typiques se révèle tout de même très satisfaisant (95%).

Wheater et al. (1980) proposent d'ajouter du cetrimide (1 g/l) au milieu m.PA afin d'inhiber la croissance des entérocoques. Dans une étude comparative récente, Havelaar et al. (1985) confirment le rôle inhibiteur du cetrimide sur l'ensemble des streptocoques du groupe D ainsi que sur certaines espèces de bacilles et de levures et reconnaissent l'intérêt de cette incorporation pour l'analyse d'eaux fortement polluées. Cependant compte tenu du pouvoir inhibiteur élevé du cetrimide, ils recommandent le milieu m.PA-B pour la recherche de P. aeruginosa dans les eaux chlorées ou marines.

L'optimisation de la sélectivité du milieu se révèle donc primordiale. Levin et Cabelli (1972) avaient pressenti l'insuffisance de la sélectivité de leur gélose m.PA pour certains milieux aquatiques particuliers comme les milieux tropicaux du fait de la présence de bactéries thermophiles.

Brown et Foster (1970) ont montré que l'hydrolyse de la caséine par des bactéries formant des colonies pigmentées constituait un caractère suffisamment spécifique pour différencier P. aeruginosa des autres Pseudomonas. En conséquence, nous avons entrepris de préparer un nouveau milieu m.PA-L (Lait) par addition de poudre de lait écrémé au milieu m.PA-B. La spécificité de ces deux milieux a été évaluée avec des échantillons d'eaux lagunaires. Finalement, ces milieux m.PA-B et m.PA-L ont été comparés au milieu MIPA, milieu pour l'isolement de P. aeruginosa de l'Institut Pasteur.

### III.6.1 Matériel et méthodes.

#### \* Echantillons d'eau

Cette comparaison a été réalisée avec 2 échantillons d'eau de surface prélevés en lagune dont les caractéristiques physico-chimiques sont présentées Tableau 11. Ces échantillons ont été analysés avec les différents milieux par la technique de filtration sur membrane (Whatman, 0,45 µm de porosité). Cinq analyses par échantillon et par milieu ont été réalisées pour comparer la sensibilité des différents milieux de culture.

	t°C	Sal.(%)	pH
Echantillon n°1	27,4	22,5	7,81
Echantillon n°2	28,0	10,7	7,74

Tableau 11 : Température, Salinité et pH des échantillons analysés.

#### \* Milieux de culture

Les compositions des milieux m.PA-B (Dutka et Kwan, 1977 ; Dukta, 1983) et MIPA sont présentées annexe 1.

Après différentes tentatives de préparation du milieu m.PA-L, la poudre de lait écrémé a été incorporée à la concentration finale de 80 g/l. Cette addition entraînant une augmentation de volume de 5%, les concentrations du milieu m.PA-B ont été ajustées en conséquence. La composition et le mode de préparation de ce milieu sont présentés annexe 1.



	POURCENTAGE DE CONFIRMATION		
	m.PA-B	m.PA-L	MIPA
Echantillon n°1	50/55 (91%)	48/50 (96%)	44/50 (88%)
Echantillon n°2	49/53 (93%)	36/40 (90%)	45/55 (82%)

A/B : nombre de colonies caractéristiques de *P. aeruginosa* / nombre de colonies typiques testées.

Tableau 12 : Comparaison de la sélectivité des 3 milieux de culture. Le % de spécificité est entre parenthèses.

Milieu	ECHANTILLON n°1				ECHANTILLON n°2			
	x	m	s2	C.V%	x	m	s2	C.V%
mPA-B	19;20;22;24;28	22,6	12,8	15,8	36;41;44;50;58	45,8	72,2	18,5
mPA-L	17;18;20;23;26	20,8	13,7	17,8	32;39;43;51;55	44,0	85,0	20,9
MIPA	21;24;27;27;30	25,8	11,7	13,2	40;42;47;50;59	47,6	56,8	15,8

x : dénombrements des U.F.C. caractéristiques pour 10 ml filtrés.  
 m : moyenne, s2 : variance, C.V% : coefficient de variation.

Tableau 13 : Résultats des analyses des 2 échantillons ensemencés sur les milieux mPA-B, mPA-L et MIPA.

Pour les 3 milieux, l'incubation est réalisée à 41,5°C pendant 48 à 96 heures.

#### \* Identification

Les colonies brunes ou vertes foncées sur m.PA-B, entourées de plus par une auréole de lyse sur m.PA-L, et les colonies vertes fluorescentes sur MIPA sont comptées comme *P. aeruginosa*.

Pour confirmation, une cinquantaine de colonies caractéristiques sont repiquées et purifiées sur le milieu MIPA. Les caractéristiques suivantes sont alors testées selon la méthodologie précisée par Lennette *et al.* (1980): coloration de Gram, Oxydase, catalase, hydrolyse de la caséine (auréole de lyse sur milieu gélosé) et production de pigments fluorescents (pyocyanine) sur les milieux de King (I. Pasteur). Les bâtonnets mobiles, Gram-, oxydase+, catalase+, caséine+ et pyocyanine+ sont assimilées à *P. aeruginosa*. Pour les colonies suspectes, l'identification est confirmée par l'utilisation de galerie API 20E.

#### III.6.2 Résultats et discussion.

Les spécificités des milieux m.PA-B et m.PA-L pour les 2 échantillons se révèlent très satisfaisantes (Tab. 12) et sont comparables à celles observées par Dutka et Kwan (1977) et Martins *et al.* (1982). Toutes les colonies caséine + sont identifiées comme *P. aeruginosa* soulignant l'intérêt de ce test. Le milieu MIPA présente un pourcentage de confirmation nettement plus bas et cette moins bonne sélectivité a été prise en compte dans la comparaison quantitative des milieux de culture.

Les résultats des dénombrements sont présentés tableau 13. Le calcul des coefficients de variation révèle que la variabilité est plus forte pour l'échantillon n°2. On constate une plus faible précision du milieu m.PA-L et ceci pour les deux échantillons.

La signification des différences de dénombrement après correction de la spécificité de chacun des milieux a été évaluée par le test non paramétrique de Kruskal et Wallis (Dagnelie, 1970).

Pour les échantillons 1 et 2, les valeurs des K sont respectivement de 1,5 et 0,42, soit nettement inférieures au niveau 0,1 aux valeurs théoriques de la table de distribution de Pearson. Par conséquent, les 3 milieux testés produisent les mêmes dénombrements.

Cependant, le milieu MIPA favorise aussi la croissance de bactéries filamenteuses se déplaçant par glissements ("gliding bacteria" non identifiées). Celles-ci envahissent rapidement le filtre et empêchent tout dénombrement correct après 48 heures d'incubation. Par contre, la croissance de ces micro-organismes est limitée sur les 2 milieux m.PA. Cette inhibition doit donc résulter, soit de la présence de sulphapyradine, d'actidione et de kanamycine, soit de la plus forte concentration d'acide nalidixique des milieux m.PA.

Espèces	mPA-B	mPA-L	MIPA
<i>Escherichia coli</i>	+	+	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	-
<i>Streptococcus faecium</i>	+	+	-
<i>Streptococcus durans</i>	+	+	-
"Gliding bacteria"	-	-	+

Tableau 14 : Croissance de quelques espèces thermotolérantes sur les 3 milieux testés.

Toutefois, la présence de cetrimide (0,2 g/l) dans le milieu MIPA ne permet pas le développement des espèces thermotolérantes fréquemment rencontrées dans les eaux polluées (Tab. 14).

Ainsi, seul *Klebsiella pneumoniae* cultive sur ce milieu alors que les milieux mPA-B et mPA-L permettent la croissance d'*Escherichia coli*, de *Klebsiella pneumoniae* et des *Streptococcus faecalis*, *faecium* et *durans*.

Ces constatations, suite à celles de Brodsky et Ciebin (1978) et de Wheeler *et al.* (1984) confirment l'intérêt de l'incorporation de cet agent bactéricide. Havelaar *et al.* (1985) notent cependant, que la concentration proposée (1 g/l) s'avère un peu trop inhibitrice, en particulier pour l'isolement de *P. aeruginosa* des eaux marines. D'une manière générale, l'optimisation des concentrations en ces différents antibiotiques restent à définir et ceci devra faire l'objet de prochaines investigations.

En ce qui concerne le milieu m.PA-L, bien que les dénombrements soient équivalents à ceux obtenus avec le milieu m.PA-B, l'incorporation de lait en poudre présente plusieurs avantages. Ainsi, la caséinolyse constitue un caractère spécifique et facile à mettre en évidence.

De plus, nous avons constaté une meilleure croissance des *P. aeruginosa* sur le milieu m.PA-L sans entrainer par ailleurs une prolifération excessive des autres espèces. Ainsi, il est possible avec ce milieu d'obtenir un gain de 24 heures dans le dénombrement des *P. aeruginosa*. Ce gain s'ajoute aux 24 heures d'incubation supplémentaire que demanderait la mise en évidence de la caséinolyse sur le milieu de Brown et Foster (1970). Dans plusieurs cas, seul ce milieu a permis d'isoler quelques colonies de *P. aeruginosa* après ensemencement par étalement d'échantillons pollués. L'addition de lait semble donc être un facteur favorable à la croissance de *P. aeruginosa* lui permettant ainsi de mieux supporter les conditions sélectives du milieu m.PA-L. Ce milieu peut être utilisé comme milieu de purification et/ou de confirmation évitant alors la préparation d'un autre milieu à la caséine de conservation plus délicate.

En conséquence, nous avons choisi le milieu m.PA-L pour la recherche spécifique de *P. aeruginosa* dans les eaux lagunaires ivoiriennes.

### III.7. Conclusion.

Compte tenu de la diversité et de la dispersion des micro-organismes pathogènes du tube digestif humain, le recours aux bioindicateurs fécaux reste le moyen plus simple et le plus rapide pour prévenir les risques épidémiologiques liés à la dissémination de micro-organismes entériques dans une écosystème aquatique.

Les méthodes retenues sont pour *E. coli*, la culture sur les milieux gélosés m-FC et m-TEC à 44,5°C après une pré-incubation à 35°C; pour les entérocoques, la culture sur la gélose D-Coccosel à 44°C; pour *C. perfringens*, la culture en gélose profonde dans le milieu TSN à 45°C et pour *P. aeruginosa*, la culture sur le milieu m-PA.L à 43°C.

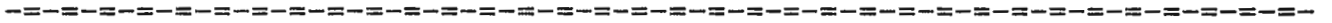
Les pourcentages de spécificité obtenues avec ces méthodes sont globalement satisfaisants avec 82% d'*E. coli* sur les 2 milieux, 74,5% d'entérocoques, 96% de *C. perfringens* et 93% de *P. aeruginosa*. Cependant, les températures sélectives d'incubation ne garantissent pas toujours l'exclusivité de l'origine fécale des bactéries thermotolérantes cultivant sur les milieux de culture.

La température des eaux lagunaires ivoiriennes et des eaux tropicales en général pourrait par conséquent permettre à des espèces bactériennes autochtones de supporter les températures sélectives d'incubation. Ces espèces thermotolérantes conduisent ainsi à biaiser les dénombrements bactériens soit par excès, soit par défaut en empêchant le développement des bactéries recherchées.

Outre la présence de bactéries allochtones, les résultats montrent que la gélose D-Coccosel même incubée à 44°C permet la croissance de *Streptococcus bovis* et *S. equinus*, espèces fréquemment rencontrées dans le tube digestif des ruminants; leurs dénombrements conduisent à la surestimation de la contamination fécale d'origine humaine.

Globalement, la sélectivité des différentes méthodologies reste encore à optimiser pour palier l'insuffisance de la température d'incubation. Néanmoins, celle-ci devra toujours tenir compte de la sensibilité puisque le plus souvent le gain de spécificité s'obtient au détriment de la sensibilité. L'optimisation de ce dernier critère doit tenir compte des caractéristiques physico-chimiques des échantillons. En milieu lagunaire tropical, ce fait est d'autant plus important que le rayonnement solaire, la température et les paramètres physico-chimiques de l'eau sensibilisent intensément les cellules bactériennes; Elles supportent alors plus mal les conditions sélectives de mise en incubation. Plus qu'ailleurs, la pré-incubation s'avère nécessaire. La sous-estimation de cette sensibilité peut entraîner une sous-évaluation de l'abondance réelle de la flore bactérienne et par conséquent, des risques épidémiologiques.

CHAPITRE IV : ESTIMATION DE LA SURVIE DE BACTERIES ENTERIQUES  
DANS LES EAUX LAGUNAIRES



Une juste évaluation des risques associés aux rejets d'eaux contaminées passe par la détermination des caractéristiques de survie des micro-organismes pathogènes. En effet, le niveau de contamination d'un milieu aquatique dépend de l'importance des rejets mais également des capacités auto-épuratrices du milieu récepteur.

Depuis le début du siècle, de nombreuses recherches sont consacrées à ce sujet en milieu marin. Il est généralement admis que le pouvoir auto-épurateur océanique résulte de l'action synergique de multiples facteurs physico-chimiques et biologiques parmi lesquels on peut citer : le rayonnement solaire (Gameson et Saxon, 1967 ; Chamberlain et Mitchell, 1978), la composition ionique de l'eau (Jones, 1967), la disponibilité en nutriments métabolisables (Moebus, 1973 ; Graham et Sieburth, 1973), les prédateurs en tout genre (Stolp et Starr, 1963 ; Roper et Marshall, 1978 ; Mc Cambridge et Mc Meekin, 1979), les bactériophages (Guélin, 1952 ; Carlucci et Pramer, 1960) ou encore les substances bactéricides (Aubert et al., 1968 ; Sieburth, 1964).

Comparativement, par leur caractère saumâtre et turbide mais aussi à cause de leur température et leur degré d'eutrophisation élevés, les eaux lagunaires tropicales pouvaient être soupçonnées de favoriser la survie des bactéries pathogènes (Lasserre, 1979).

Dans le cas de la lagune Ebrié, de nombreuses baies autour de la ville d'Abidjan ont un renouvellement des eaux très faibles. Compte tenu de leur degré de confinement ainsi que l'importance des rejets qui s'y déversent, l'hypolimnion de ces zones pouvait alors être suspecté de servir de réservoir aux micro-organismes pathogènes (Gerba et McLeod, 1976 ; Hood et Ness, 1982).

Ce chapitre a pour objet d'étudier la survie de quelques bactéries pathogènes à différentes saisons hydroclimatiques et de définir les facteurs conditionnant leurs aptitudes de survie dans les eaux lagunaires baignant la ville d'Abidjan.

#### IV.1. Protocole expérimental.

La survie des bactéries suivantes a été étudiée : *Escherichia coli* (Biotype 1), *Streptococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, et *Shigella dysenteriae*. Les trois premières ont été isolées du milieu lagunaire à partir d'échantillons d'eaux de surface polluées tandis que les 2 autres, provenant d'individus malades, ont été fournies par le service de bactériologie du C.H.U. de Cocody (Abidjan).

Ces bactéries ont été cultivées en bouillon nutritif salé (bouillon n°2 de l'Inst. Pasteur) pendant 24 heures à 37°C. Les cultures bactériennes ont été rincées par 2 centrifugations successives (5000 tr/mn pendant 15 mn) avec 10 ml d'une solution stérile de tampon phosphate (pH 7,2) (Composition en annexe 1). Remis en suspension dans 10 ml de tampon phosphate stérile (pH 7,2), les inoculums ont été incubés dans des échantillons d'eau lagunaire fraîchement prélevés en surface ou en profondeur.

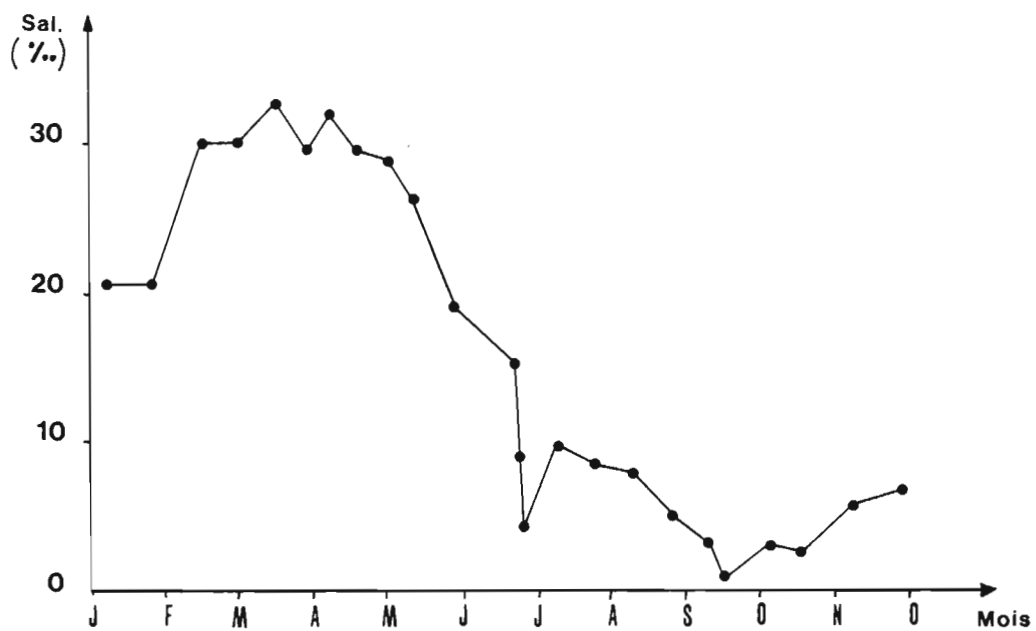


Figure 8 : Evolution saisonnière de la salinité de l'eau de surface prélevée dans le chenal central à Abidjan durant l'année 1984.

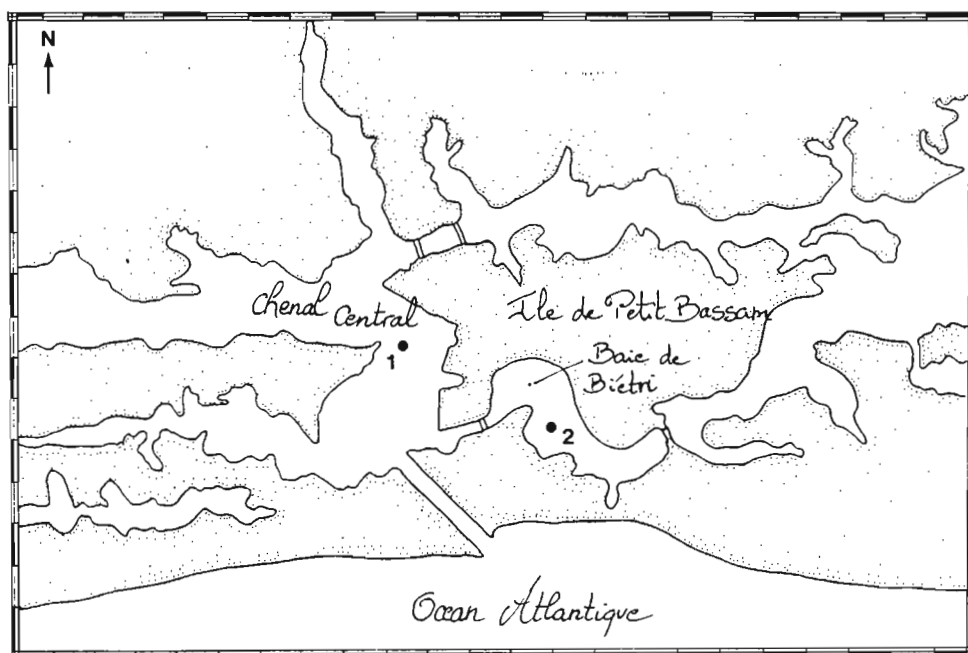


Figure 9 : Localisation des points de prélèvement d'eau de surface dans le chenal central (St. 1) et d'eau du fond en baie de Biétri (St. 2).



La température, la salinité et l'oxygène dissous de ces eaux ont été mesurés *in situ*, à l'aide d'un salinomètre et d'un oxymètre YSI tandis que les mesures du pH et du potentiel d'oxydo-réduction ont été réalisées à l'aide d'un pH-mètre Knick Portatest.

Pour l'analyse des sulfures, 1 ml, 10 ml ou 50 ml d'échantillon sont fixés immédiatement par 10 ml d'une solution à 2% d'acétate de zinc et 10% d'acide acétique. Les sulfures ont été dosés par la méthode colorimétrique de formation de bleu de méthylène, à 680 nm (Cline, 1969). La concentration en sulfure est déterminée à l'aide d'une droite de régression (absorbance-concentration) calculée avec différentes solutions témoins de Na<sub>2</sub>S. 9 H<sub>2</sub>O mesurées par cette méthode et vérifiées par une titration à l'iode (Caumette, 1985).

Les eaux de surface ont été prélevées dans le chenal central à différentes dates (16/04, 27/04, 11/05, 21/05, 13/06, 22/06, 28/06) au cours de l'année 1984. L'évolution saisonnière de la salinité mesurée au cours de l'année témoigne des fluctuations temporelles de la qualité hydrobiologique des eaux de surface de cette station (Fig. 8).

Immédiatement après leur prélèvement, les échantillons ont été répartis dans des Erlenmeyer de 200 ml et inoculés par 2 ml de suspension bactérienne rincée. Les fioles ont ensuite été mises en incubation dans un bain-marie et soumises à une fréquente agitation manuelle (quelques minutes toutes les heures durant la journée et avant chaque prélèvement durant la nuit). Le bain-marie était thermorégulé à 29°C (la température moyenne des eaux de surface lagunaires) et exposé à la lumière naturelle pénétrant dans le laboratoire.

Les eaux du fond provenaient de la baie de Biétri (Fig. 9). Prélevées à 7,5 mètres de la surface, celles-ci étaient très chargées de sédiment en suspension. Seuls les comportements d'*E. coli*, de *S. faecalis* et de *C. perfringens* y ont été étudiés. Les incubations de ces bactéries ont été réalisées selon le protocole défini pour les eaux de surface sauf pour la culture de *C. perfringens* qui a nécessité un bouillon nutritif au thio-glycolate (BioMérieux). Ces 3 bactéries ont été incubées en respectant les paramètres physico-chimiques caractérisant les eaux du fond. Aussitôt prélevés, les échantillons sont placés sous azote et inoculés par les cultures bactériennes rincées. Les incubations ont été effectuées à 26°C, sous azote et à l'obscurité dans des fioles coniques de 2 litres.

Parallèlement, une autre série d'essais a été entreprise pour mettre en évidence et évaluer l'importance respective des différents facteurs physico-chimiques et biologiques conditionnant la survie des bactéries. Des incubations d'*Escherichia coli* ont été réalisées dans de l'eau de lagune différemment traitée afin d'éliminer successivement les macroprédateurs, les microprédateurs et les substances organiques bactéricides; les échantillons ont ainsi été soit filtrés sur 8 µm, soit sur 0,2 µm, ou encore filtrés (0,2 µm) puis autoclavés (120°C, 20 mn).

Par opposition aux échantillons d'eau ainsi traités, nous appellerons eau naturelle, l'eau de lagune non traitée.

L'évolution de la concentration des populations bactériennes a été suivie en moyenne pendant une centaine d'heures par dénombrement des Unités Formant Colonie (U.F.C.) après ensemencement des milieux de culture appropriés à chaque population.

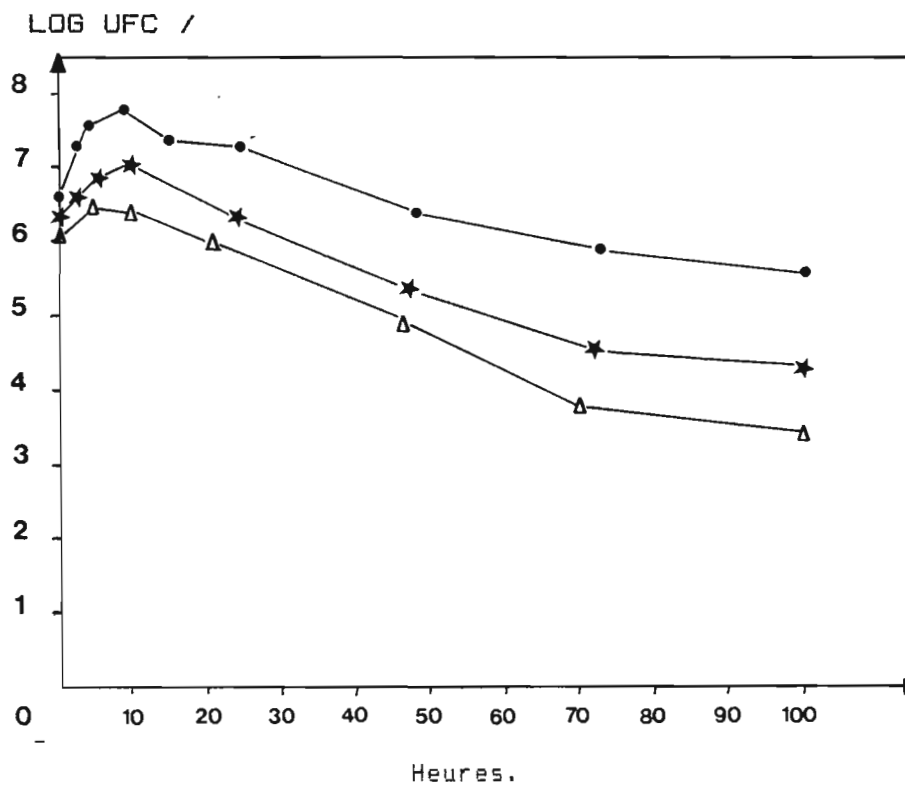


Figure 10 : Survie d'*Escherichia coli* incubé en eau naturelle à partir d'un bouillon soit non rincé (●—●; T90 = 51,4h), rincé une fois (★—★; T90 = 42,6h), rincé deux fois (△—△; T90 = 31,3h).

Les milieux de culture suivant ont été utilisés : pour *E. coli*, milieu au désoxycholate lactose (BioMérieux); pour *S. faecalis*, gélose D.coccosel (BioMérieux); pour *S. typhi* et *S. dysenteriae*, gélose au désoxycholate-citrate lactose (Inst. Pasteur); pour *C. perfringens*, gélose T.S.N. (BioMérieux) et pour *P. aeruginosa*, milieu m.PA-L (Annexe 1).

Après dilution décimale dans la solution tampon phosphate (pH 7.2), les ensemencements ont été réalisés en surface des milieux de culture (par étalement de 0,1 ml d'échantillon), excepté pour *C. perfringens* qui a été recherché par la technique d'incorporation de 1 ml en gélose profonde (Marshall et al., 1965).

En général, les milieux de culture ensemencés ont été incubés pendant 24 heures dans une étuve à 37°C. Pour *C. perfringens*, une incubation en bain-marie a été réalisée à 46°C tandis que pour *P. aeruginosa*, une incubation à 41°C a fait suite à une préincubation de 2 heures à 37°C.

Afin de faciliter les comparaisons, les aptitudes de survie ont été évaluées par le T90, soit la durée d'incubation nécessaire pour une diminution de 90% de la population initiale. Le T90 correspond à l'inverse de la pente de la droite de régression entre les concentrations bactériennes (unités formant colonies: U.F.C.) exprimées en logarithmes décimaux par millilitre et les durées d'incubation exprimées en heures.

Comparativement aux techniques de numération en microscopie à fluorescence, la méthodologie utilisée ne permet pas de dénombrer les cellules bactériennes en état de "dormance" c'est à dire les cellules viables mais non cultivables sur milieu de culture (Xu et al., 1982). Dans le texte qui suit, nous appellerons survie ou disparition bactérienne, la survie ou la disparition des bactéries capables de se développer selon la méthodologie utilisée.

## IV.2. Résultats.

### IV.2.1. Mises au point méthodologiques.

#### \* Effet du rinçage de l'inoculum.

La figure 10 met en évidence l'importance du rinçage de l'inoculum sur la culture d'*E. coli* incubé en eau lagunaire. L'incubation a été réalisée dans une eau prélevée le 16/04 et dont les caractéristiques physico-chimiques étaient les suivantes ; Salinité : 33 ‰, pH : 8,12, Oxygène dissous : 6,4 ppm.

Pour les 3 incubations, on observe une croissance résiduelle des *E. coli* pendant une quinzaine d'heures. Lorsque l'inoculum n'est pas rincé, les cellules d'*E. coli* présentent une phase initiale de croissance plus accentuée et secondairement une décroissance plus atténuée que celles observées après rinçage. En l'absence de rinçage, le T90 est de 51,4 h soit respectivement 1,2 et 1,7 fois plus qu'avec 1 ou 2 rinçages.

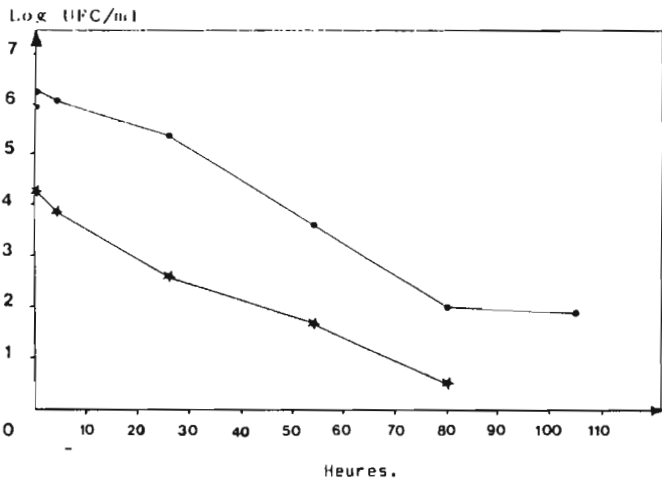


Figure 11 : Survie d'*Escherichia coli* incubé en eau naturelle à 2 dilutions différentes.

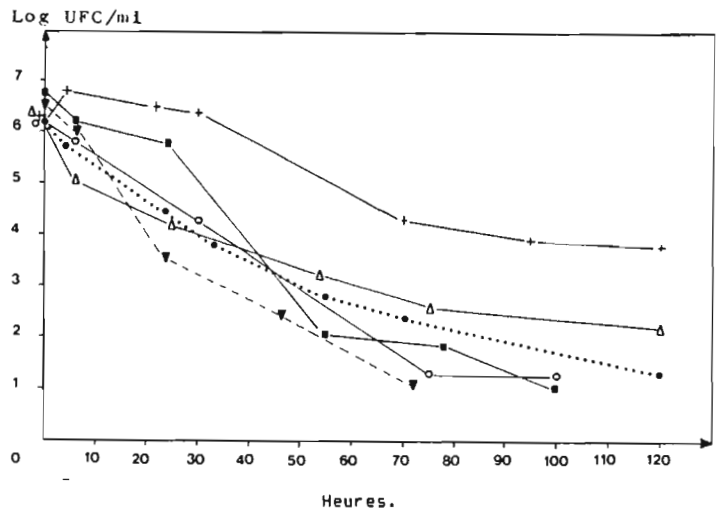


Figure 12 : Survie d'*Escherichia coli* en eau naturelle (■:33% ; ▼:30% ; ○:24% ; ●:13% ; △:9% ; +:4%).

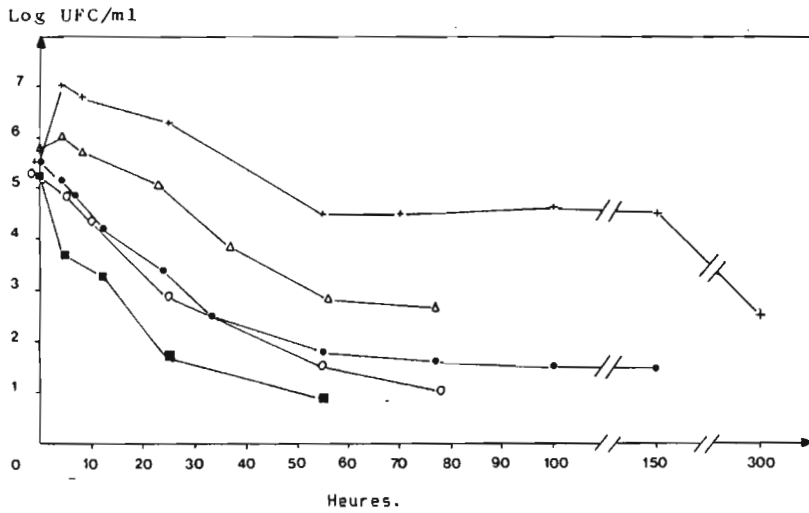


Figure 13 : Survie de *Salmonella typhi* en eau naturelle (■:33% ; ○:24% ; ●:13% ; △:9% ; +:4%).

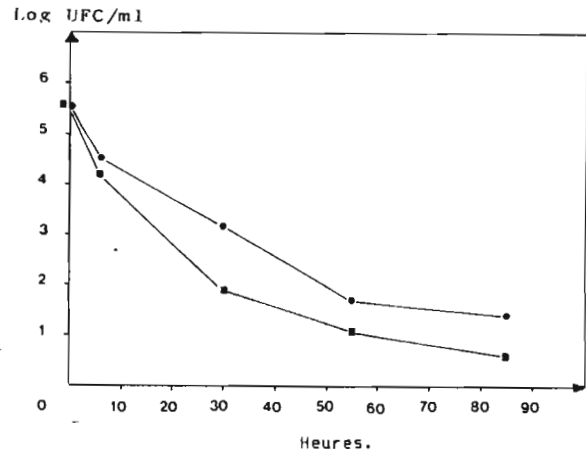


Figure 14 : Survie de *Pseudomonas aeruginosa* en eau naturelle (■:33% ; ●:13%).

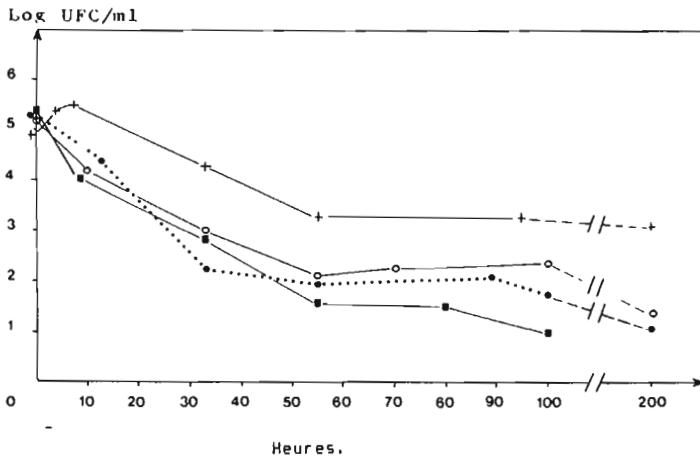


Figure 15 : Survie de *Shigella dysenteriae* en eau naturelle (■:33% ; ○:24% ; ●:13% ; +:4%).

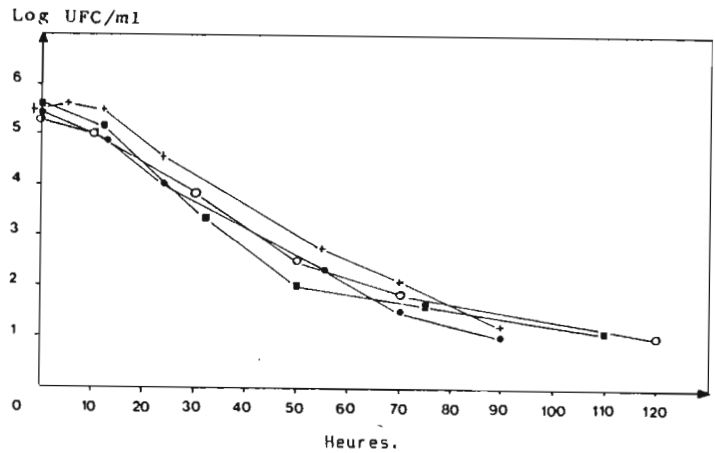


Figure 16 : Survie de *Streptococcus faecalis* en eau naturelle (■:33% ; ○:24% ; ●:13% ; +:4%).

D'autre part, en ensemençant une culture centrifugée puis remise en suspension sans rinçage, nous avons vérifié que cette opération n'affectait pas la viabilité des bactéries au moins telle qu'elle apparaît en culture. Les différences observées résultent donc du rinçage et non pas du stress lié à la centrifugation.

\* Effet de la concentration initiale de l'inoculum.

La préparation de l'inoculum ne permet pas d'introduire le même nombre de cellules bactériennes (UFC) lors des différentes incubations; il était donc nécessaire de vérifier que ces différences n'influençaient pas le comportement des cultures bactériennes.

Deux incubations en eau naturelle ont été réalisées avec 2 concentrations initiales différentes d'une même culture d'*E. coli* (6,2 et 4,2 Log UFC/ml). La salinité et le pH de l'échantillon étaient respectivement de 4 ‰ et de 7,5.

Dans les 2 cas, *E. coli* présente les mêmes aptitudes de survie avec des T90 de 21,6 et 24,4 heures (Fig. 11). Dans les conditions de l'étude, l'abondance initiale n'influe donc pas sur la survie des bactéries. De ce fait, lors des expérimentations suivantes, les concentrations bactériennes ont pu être exprimées en valeur réelle (UFC/ml) et non en pourcentage de bactéries survivantes.

IV.2.2. Incubation en eau naturelle de surface.

Les caractéristiques physico-chimiques des différents prélèvements témoignent de l'évolution temporelle de la qualité hydrobiologique des eaux de surface de cette station (Tab. 15).

dates	16/04	27/04	11/05	21/05	13/06	22/06	28/06
Salinité (‰)	33	30	26	24	13	9	4
pH	8,12	8,05	7,86	7,82	7,64	-	7,47
Oxygène dissous (ppm)	6,40	6,30	6,55	5,20	5,45	5,80	-

Tableau 15 : Caractéristiques physico-chimiques des différents échantillons d'eau de surface prélevés dans le canal central entre le 16/04 et le 22/06.

Les caractéristiques de survie des différentes bactéries incubées dans les eaux de la lagune sont présentées figures 12 à 16. Les différentes espèces bactériennes présentent des aptitudes de survie distinctes et variables selon les saisons hydroclimatiques. Dans l'ensemble, les bactéries ne se multiplient pas ou seulement pendant une dizaine d'heures, correspondant à une croissance résiduelle. Les eaux lagunaires ne sont donc pas favorables à la multiplication des bactéries incubées et on constate au contraire un déclin rapide des bactéries mises en incubation.

Espèce	Salinité (‰)	Droites de régression	r
<u>E. coli</u>			
	33	$y = - 0,062 x + 6,601$	- 0,967 ***
	30	$y = - 0,078 x + 6,224$	- 0,981 ***
	24	$y = - 0,055 x + 6,050$	- 0,972 ***
	13	$y = - 0,040 x + 5,532$	- 0,966 ***
	9	$y = - 0,030 x + 5,325$	- 0,921 ***
	4	$y = - 0,028 x + 6,861$	- 0,949 ***
<u>S. typhi</u>			
	33	$y = - 0,073 x + 4,351$	- 0,912 **
	24	$y = - 0,057 x + 4,972$	- 0,973 ***
	13	$y = - 0,040 x + 4,734$	- 0,925 ***
	9	$y = - 0,046 x + 5,935$	- 0,974 ***
	4	$y = - 0,029 x + 6,381$	- 0,908 **
<u>S. dysenteriae</u>			
	33	$y = - 0,040 x + 4,557$	- 0,931 ***
	24	$y = - 0,027 x + 4,431$	- 0,845 **
	13	$y = - 0,028 x + 4,456$	- 0,856 **
	4	$y = - 0,024 x + 5,223$	- 0,903 **
<u>P. aeruginosa</u>			
	33	$y = - 0,056 x + 6,605$	- 0,928 **
	13	$y = - 0,048 x + 6,940$	- 0,956 **

\*\*\* :  $P < 0,01$  ; \*\* :  $P < 0,05$

**Tableau 16 :** Equations des droites et coefficients de régression (r) calculés d'après les courbes respectives de survie en eau naturelle à différentes salinités.

Salinité (‰)	33	30	26	24	13	9	4
Espèce bactérienne							
<u>Escherichia coli</u>	16,2	12,6	18,2	18,0	24,8	32,8	35,4
<u>Streptococcus faecalis</u>	17,7	ND	ND	20,0	17,8	ND	18,9
<u>Salmonella typhi</u>	13,7	ND	ND	17,5	25,0	21,7	38,5
<u>Shigella dysenteriae</u>	24,8	ND	ND	36,4	34,8	ND	49,2
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	ND	18,7	ND	ND	22,9	ND	ND

ND : non déterminé.

**Tableau 17 :** T90 (en heures) des différentes espèces bactériennes incubées en eau naturelle en fonction de la salinité.

Ce déclin apparaît d'autant plus fort que l'influence marine est plus élevée; excepté pour *S. faecalis* qui manifeste les mêmes caractéristiques de culture dans les 4 conditions d'incubation (Fig. 16).

Pour *E. coli*, *S. typhi* et *S. dysenteriae*, les comportements en culture *in vitro* peuvent schématiquement se caractériser par 3 phases successives:

- une phase critique de quelques heures (<10 h) au cours de laquelle la population initiale augmente ou diminue selon l'espèce bactérienne ou l'échantillon mis en incubation. Ainsi, *S. typhi* se multiplie dans les échantillons prélevés le 22 et 28 juin tandis qu'*E. coli* et *S. dysenteriae* ne se multiplient que dans le dernier échantillon prélevé. Certaines caractéristiques physico-chimiques ou biologiques de ces échantillons limitent donc la multiplication spécifique de chaque bactérie. En considérant la salinité comme un témoin de pénétration marine, cette limite se situe entre 4 et 9 ‰ pour *E. coli*, 9 et 13 ‰ pour *S. typhi* et entre 4 et 9 ‰ pour *S. dysenteriae*. A 4 ‰, ces 3 micro-organismes se multiplient pendant les 10 premières heures d'incubation et *S. typhi* présente une croissance 10 fois plus forte que les 2 autres entérobactéries au cours de cette période.

- une phase de décroissance d'environ 50 heures dont la valeur des pentes après transformation logarithmique des dénombrements est constante. L'élimination du nombre de corps bactérien suit donc une loi de décroissance exponentielle de la forme:

$$N_t = N_0 \exp(-kt)$$

avec  $N_0$  : nombre initial de bactéries (UFC/ml),  $N_t$  nombre de bactéries au temps  $t$ ,  $k$  : constante d'élimination (1/h),  $t$  : durée d'incubation (h).

- enfin, une phase de résistance pendant laquelle la population survivante se maintient à un niveau stable plus ou moins marqué selon l'espèce bactérienne. Des concentrations de 2,8 Log UFC/ml de *S. typhi* et de 3,2 Log UFC/ml de *S. dysenteriae* ont pu être dénombrées après respectivement des durées d'incubation de 300 et 200 heures.

Malgré ces 3 phases distinctes, les représentations semi-logarithmiques sont satisfaisantes pour linéariser l'ensemble des données comme en témoignent les seuils de signification des coefficients de corrélation (Tab. 16).

Ainsi, pour chaque espèce et chaque incubation, l'équation des droites de régression a pu être définie (Tab.16) et les  $T_{90}$  calculés (Tab.17).

Le  $T_{90}$  le plus élevé est observé pour *S. dysenteriae* incubée dans l'échantillon à la salinité la plus faible (49,2 h) ; *E. coli* présente la survie la plus faible (12,6 h) lors d'une incubation dans une eau à 30 ‰ de salinité.

La constatation essentielle est que les  $T_{90}$  d'*E. coli*, *S. typhi* et *S. dysenteriae* sont environ 2 fois plus longs en milieu dulçaquicole qu'en milieu marin. Par conséquent, la période de pluies et de crues apparaît plus propice que la saison sèche au maintien d'un niveau de contamination élevé des eaux lagunaires par ces bactéries. Par contre, *S. faecalis* présente des  $T_{90}$  constants et son comportement *in vitro* ne semble pas être affecté par les variations de la qualité hydrobiologique des eaux lagunaires.

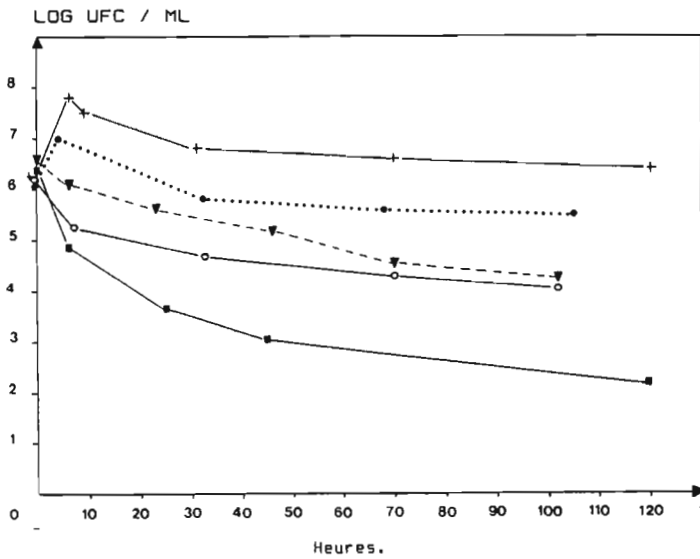


Figure 17 : Survie d'*Escherichia coli* en eau filtrée et autoclavée (■:33% ; ▼:30% ; ○:24% ; ●:13% ; +:4%).

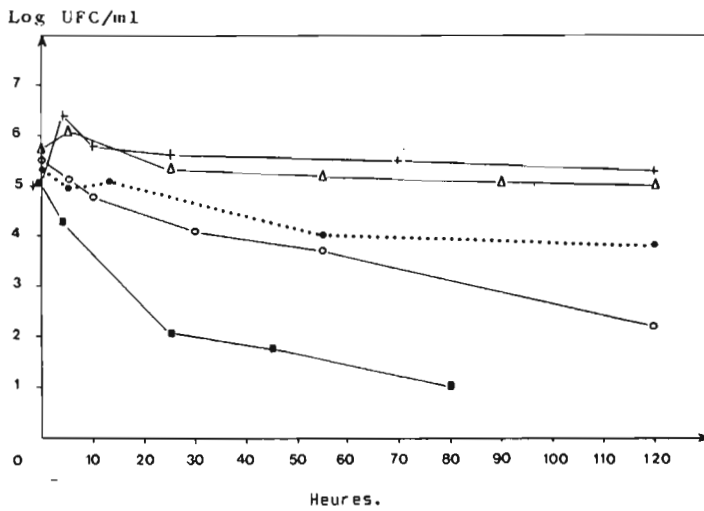


Figure 19 : Survie de *Salmonella typhi* en eau autoclavée (■:33% ; ○:24% ; ●:13% ; Δ:9% ; +:4%).

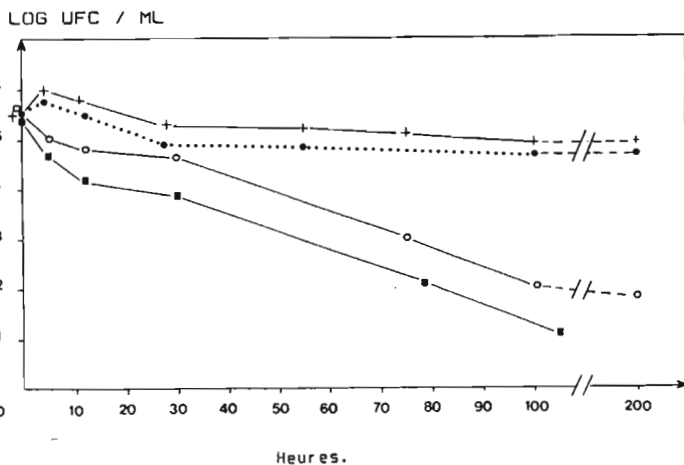


Figure 21 : Survie de *Shigella dysenteriae* en eau autoclavée (■:33% ; ○:24% ; ●:13% ; +:4%).

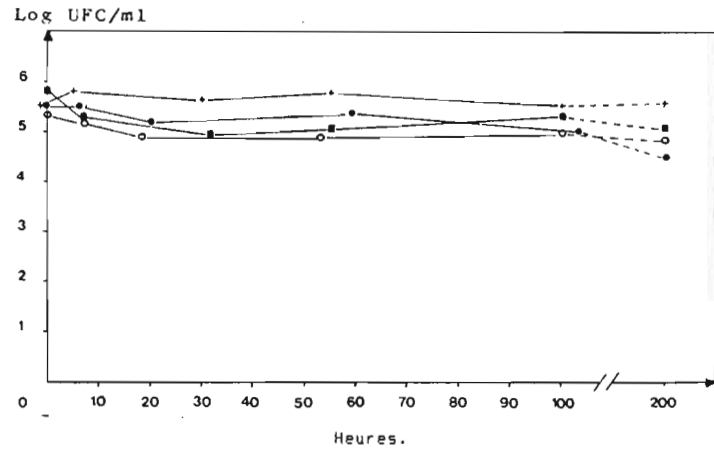


Figure 18 : Survie de *Streptococcus faecalis* en eau autoclavée (■:33% ; ○:24% ; ●:13% ; +:4%).

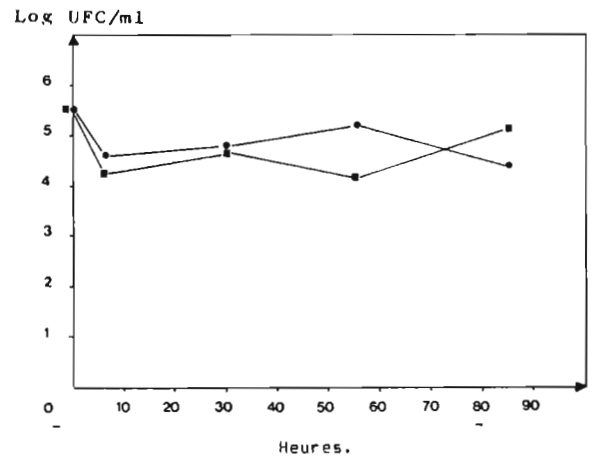


Figure 20 : Survie de *Pseudomonas aeruginosa* en eau filtrée et autoclavée (■:33% ; ●:13%).

Espèce	Salinité (‰)	Droites de régression	r
<b>E. coli</b>			
	33	$y = -0,028 x + 5,072$	-0,842 *
	30	$y = -0,018 x + 6,204$	-0,938 **
	24	$y = -0,015 x + 6,209$	-0,981 ***
	13	$y = -0,010 x + 6,432$	-0,761 *
<b>S. typhi</b>			
	33	$y = -0,049 x + 4,320$	-0,898 **
	24	$y = -0,026 x + 5,172$	-0,984 ***
	13	$y = -0,011 x + 5,135$	-0,881 *
	9	$y = -0,008 x + 5,807$	-0,835 *
	4	$y = -0,006 x + 6,031$	-0,773
<b>S. dysenteriae</b>			
	33	$y = -0,035 x + 4,901$	-0,974 ***
	24	$y = -0,032 x + 5,405$	-0,988 ***
	13	$y = -0,009 x + 5,457$	-0,801 *
	4	$y = -0,008 x + 5,792$	-0,904 **

\*\*\* : P < 0,01 ; \*\* : P < 0,05 ; \* : P < 0,1

Tableau 18 : Equations des droites et coefficients de régression (r) calculés d'après les courbes respectives de survie en eau filtrée et autoclavée à différentes salinités.



#### IV.2.3. Incubation en eau filtrée et autoclavée.

Comparativement aux incubations en eau naturelle, cet essai a pour but d'éliminer toute implication de facteurs biologique dans la disparition des bactéries en culture.

Les courbes de survie des différentes bactéries présentées dans les figures 17 à 21 mettent en évidence une phase critique de quelques heures (< 10 h) au cours de laquelle la population initiale se multiplie ou décroît selon l'espèce bactérienne ou l'échantillon mi en incubation. Les eaux lagunaires privées de tout facteur thermolabile ne permettent pas non plus une croissance de ces bactéries. Par contre, les phases de décroissance et de résistance sont difficilement identifiables.

Les bactéries étudiées supportent différemment les caractéristiques physico-chimiques du milieu d'incubation. Ainsi, *E. coli* et *S. dysenteriae* peuvent croître pendant quelques heures dans de l'eau à 13 ‰ de salinité tandis que *S. typhi* est inhibée au delà d'une salinité de 9 ‰.

La transformation logarithmique des concentrations bactériennes s'est également avérée satisfaisante pour calculer l'équation des droites de régression (Tab. 18) à partir desquelles les T90 ont été calculés (Tab. 19).

Pour *E. coli*, *S. typhi* et *S. dysenteriae* les décroissances sont d'autant plus rapides que l'influence marine est prépondérante. Cependant, comparativement aux résultats précédents (Tab. 17), les T90 (Tab. 19) sont plus élevées; ils traduisent une nette prolongation de la survie des bactéries incubées dans les échantillons d'eau filtrée et autoclavée.

Pour les incubations d'*E. coli* à 4 et 9 ‰ et de *P. aeruginosa*, même au bout de 100 heures, les décroissances n'ont pas été suffisantes pour évaluer les T90. La population de *S. faecalis* ne présente aucune décroissance pour les 4 incubations réalisées. Cette bactérie persiste au moins pendant 200 heures sans toutefois présenter de croissance significative.

Salinité (‰)	33	30	26	24	13	9	4
Esp. bactérienne							
<i>E. coli</i>	35,8	52,0	57,0	64,9	97,9	C	C
<i>S. faecalis</i>	C	ND	ND	C	C	ND	C
<i>S. typhi</i>	20,3	ND	ND	38,9	90,2	130,0	179,0
<i>S. dysenteriae</i>	28,7	ND	ND	30,7	109,0	ND	118,0
<i>P. aeruginosa</i>	ND	C	ND	ND	C	ND	ND

ND : non déterminé. C : croissance pendant 100 heures.

Tableau 19 : T90 (en heures) des différentes espèces bactériennes incubées en eau lagunaire de différentes salinités, préalablement filtrée (0,2 µm) et autoclavée.

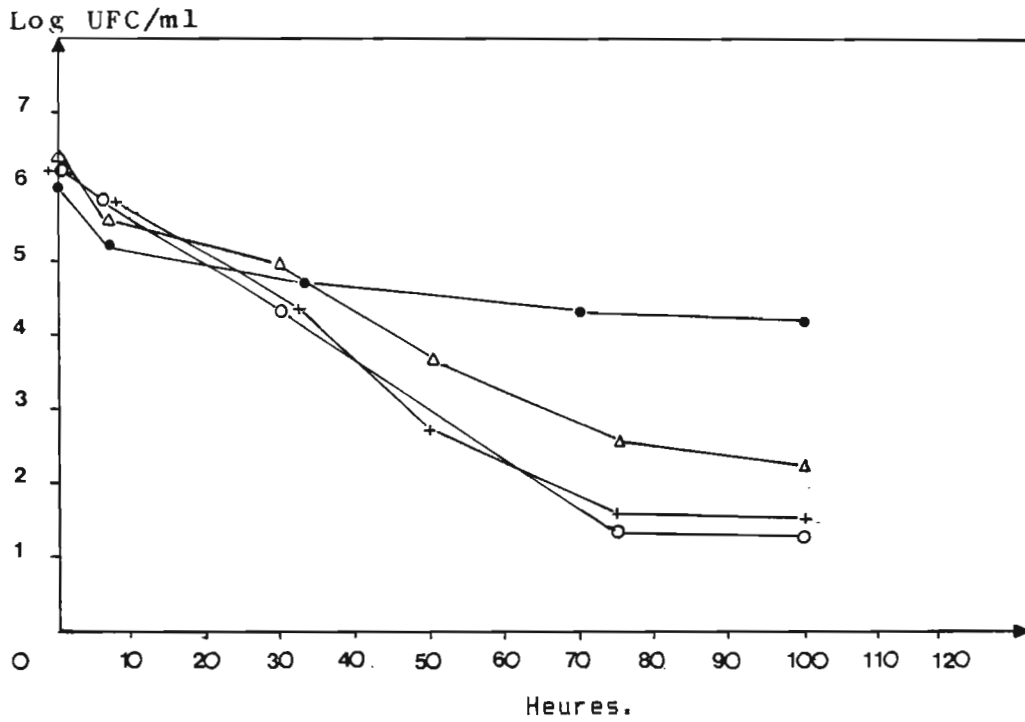


Figure 22 : Survie d'*Escherichia coli* en eau naturelle (o—o); en eau filtrée sur 8 µm (+—+); en eau filtrée sur 0,2 µm (Δ—Δ); en eau filtrée sur 0,2 µm et autoclavée (●—●).  
Salinité : 24%.

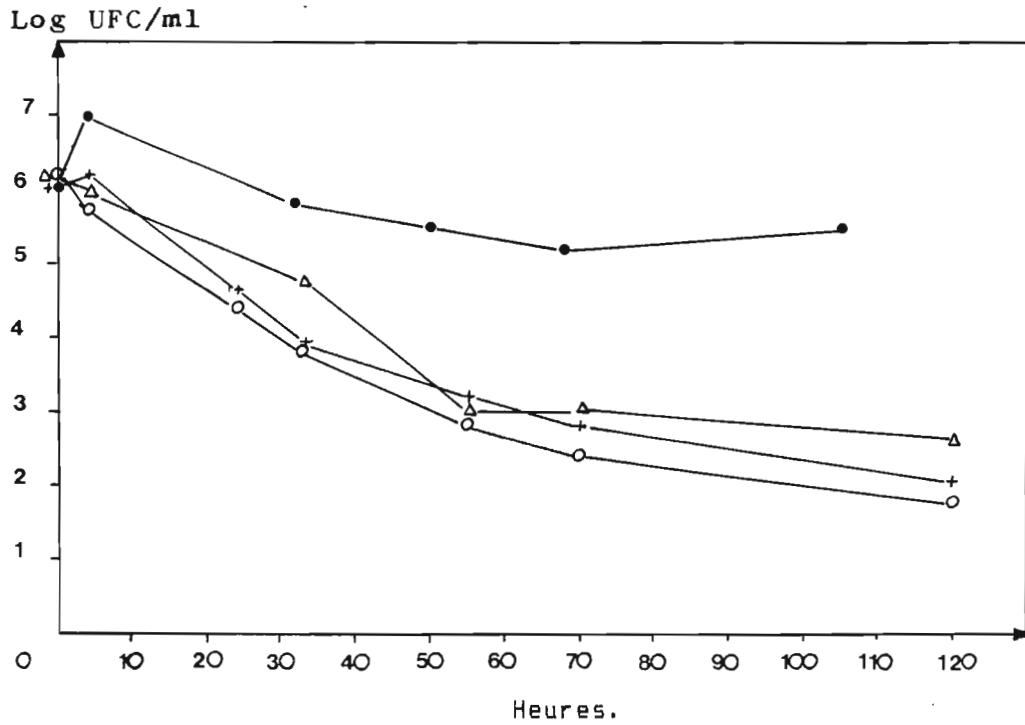


Figure 23 : Survie d'*Escherichia coli* en eau naturelle (o—o); en eau filtrée sur 8 µm (+—+); en eau filtrée sur 0,2 µm (Δ—Δ); en eau filtrée sur 0,2 µm et autoclavée (●—●).  
Salinité : 13%.

#### IV.2.4. Incubation d'*Escherichia coli* en eau naturelle filtrée et/ou autoclavée.

Les figures 22 et 23 présentent l'effet des différentes opérations de filtration et/ou de chauffage sur la survie d'*E. coli* incubée dans des échantillons d'eau de surface prélevée à 2 périodes différentes ( 10/05/1985, salinité : 24%. 16/06/1985, salinité : 13%). Dans les deux cas, elles mettent nettement en évidence le rôle prépondérant de composés thermosensibles et de taille inférieure à 0,2  $\mu\text{m}$  sur le contrôle des bactéries. D'après les T90 calculés, le traitement thermique à lui seul permettrait une prolongation de la survie respectivement de 40,5 et 59,2 heures pour les 2 incubations. D'autre part, seul l'échantillon du 16/06 permet une multiplication d'*E. coli*

Comparativement à la survie d'*E. coli* observée en eau lagunaire non filtrée, les opérations de filtration entraînent peu de variations. A 24%, seule la filtration sur 0,2  $\mu\text{m}$  prolonge de quelques heures la survie d'*E. coli* alors qu'à 13%, les filtrations sur 8 et 0,2  $\mu\text{m}$  ne déterminent qu'une légère amélioration de cette survie.

L'incubation dans l'eau lagunaire prélevée le 10/05 (Salinité : 24 %) permet donc de mettre en évidence l'intervention d'agents épurateurs dont la taille est comprise entre 0,2 et 8  $\mu\text{m}$ . Ce phénomène n'est plus observé dans la deuxième incubation (Salinité : 13 %) ce qui conduit à suspecter l'origine marine de ces agents.

#### IV.2.5. Incubation en situation écologique simulant l'hypolimnion des zones stratifiées.

Pour évaluer l'influence des différences hydrobiologiques liées à la stratification de la colonne d'eau, nous avons simultanément étudié la survie de quelques bactéries dans les eaux de l'épilimnion et de l'hypolimnion d'une même station.

Les échantillons d'eau de surface et de fond ont été prélevés le 16/02/1985 dans une station de 10 mètres de profondeur en baie de Biétri; les caractéristiques physico-chimiques sont présentées tableau 20.

	t°C	Sal.(%)	pH	O2 (ppm) / redox (mV)	Sulfure (mgS <sub>2</sub> -/l)
Surface.	29	31	7,85	9,44 / +220	0
Fond.	26	29	8,07	0 / -190	8,8

Tableau 20 : Caractéristiques physico-chimiques des eaux de surface et de fond de la station en baie de Biétri prélevées le 16/02.

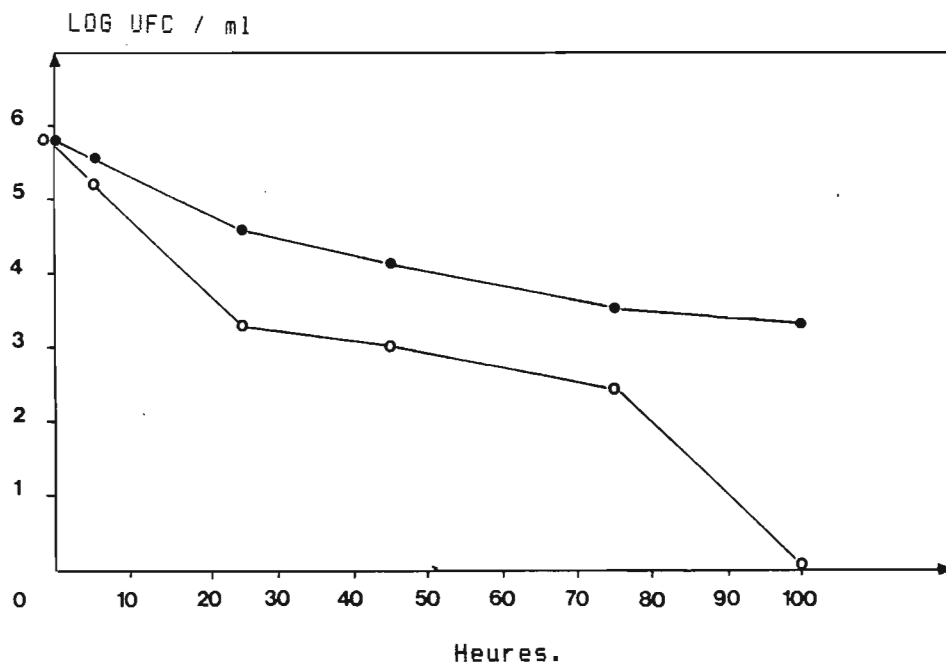


Figure 24: Survie d'*Escherichia coli* en eau de surface (o—o) et en eau du fond (■—■).

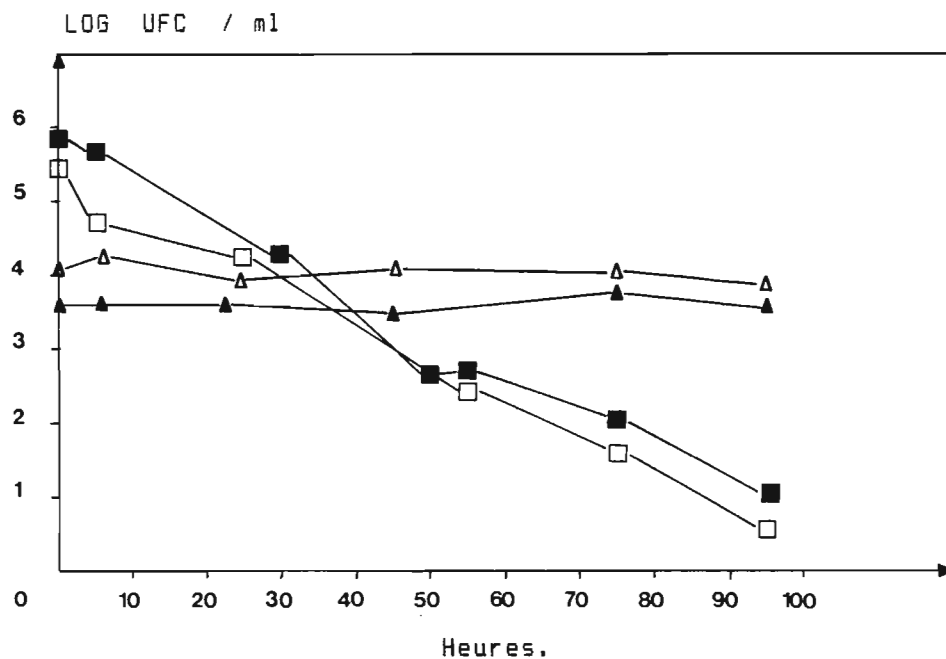


Figure 25: Survie de *Streptococcus faecalis* et *Clostridium perfringens* en eau de surface (□—□ ; △—△) et en eau du fond (■—■ ; ▲—▲).

Les figures 24 et 25 permettent respectivement de comparer les caractéristiques de survie d'Escherichia coli, Streptococcus faecalis et Clostridium perfringens incubés en eau de surface et en eau de fond.

Les espèces bactériennes supportent différemment les conditions d'anoxie et d'obscurité caractérisant les eaux de fond de cette station. Seul E. coli présente des différences de survie entre les 2 incubations. D'après les T90 calculés, E. coli est 2 fois plus rapidement éliminé dans les eaux de surface (T90 : 20,2 h) que dans celles du fond (T90 : 40,5 h). Par contre, S. faecalis présente la même décroissance aux 2 niveaux (T90 : 19,6 et 19,0 h). De ce fait, E. coli en profondeur survit 2 fois plus longtemps que S. faecalis.

A l'opposé de ces 2 micro-organismes, la concentration de C. perfringens pendant les 100 heures d'incubation ne présente pas de variation et ceci dans les eaux de surface comme dans celle de l'hypolimnion.

\* Cas particulier de la distribution des Clostridium perfringens dans la colonne d'eau.

Parallèlement à l'étude du comportement de C. perfringens incubé in vitro, la recherche de cette bactérie et de ses différentes formes cellulaires (végétatives et sporulées) a été entreprise dans la colonne d'eau de cette même station.

Les échantillons ont été prélevés tous les mètres et les caractéristiques physico-chimiques mesurées in situ. Le nombre de spores a été calculé en dénombrant les Clostridium cultivant après incubation des échantillons pendant 10 minutes à 80 °C (OMS, 1977) tandis que les formes végétatives thermosensibles ont été déduites en soustrayant le nombre de spores au nombre total de C. perfringens dénombrés initialement. Les analyses bactériologiques ont été effectuées en triple exemplaires.

Cette étude a été réalisée pendant la saison des crues, soit durant la période où la colonne d'eau présente la plus forte stratification des eaux. Au niveau de cette station, la dessalure liée au passage de la crue affecte les eaux de surface mais n'atteint pas l'hypolimnion; la distribution verticale de la salinité, de la température et de l'oxygène représente cet état stratifié (Fig. 26). Dans la tranche des 4 premiers mètres, la salinité reste inférieure à 10 ‰ avant de croître progressivement jusqu'à 31 ‰ au fond. Corrélativement, ce gradient vertical engendre une légère thermocline et une oxycline d'autant plus marquée que cette station est très eutrophe. De ce fait, à partir de 5 mètres, les eaux sont anoxiques et riches en hydrogène sulfuré.

La densité des eaux calculée à chaque niveau est également tracée (Fig. 27) et témoignent de la superposition de 2 couches d'eau aux caractéristiques physico-chimiques nettement différentes.

Cette stratification affecte non seulement la distribution verticale du nombre total de *C. perfringens* mais aussi celle des différentes formes cellulaires de *C. perfringens* (Fig. 27).

Dans la couche superficielle, le pourcentage de formes sporulées est majoritaire (> 80%) et augmente jusqu'à 5 mètres. A ce niveau, tous les *C. perfringens* dénombrés sont des spores et on constate une nette augmentation du nombre total de *Clostridium*; cette augmentation résulte de l'accumulation des spores. La densité des spores de cette bactérie doit donc se situer entre 1,002 et 1,005 et ces spores sont incapables de franchir la barrière de densité liée à la superposition des 2 couches d'eau.

A partir de 5 mètres, dès que l'on pénètre dans la zone anoxique, le pourcentage de spores diminue progressivement et près de 80 % des *Clostridium* sont sous une forme végétative. L'hypolimnion présente donc des caractéristiques physico-chimiques favorables au maintien des *C. perfringens* sous une forme végétative.

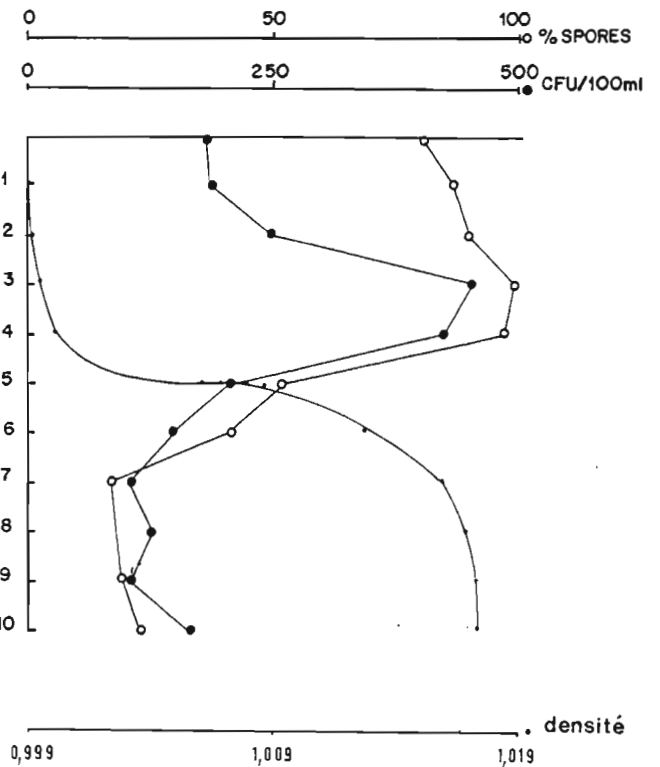
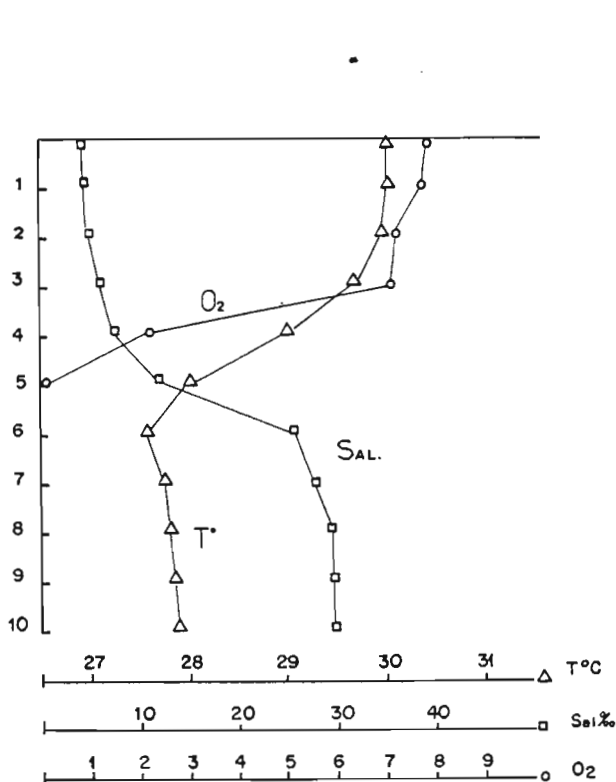


Fig. 26 : Caractéristiques physico-chimiques de la colonne d'eau à la station 2 pendant la période de stratification (16/02/1985).

Fig. 27 : Distribution verticale des *C. perfringens* totaux (●-●), du pourcentage de spores (○-○) et de la densité de l'eau (---).

### IV.3. Discussion.

#### IV.3.1. Influence des conditions expérimentales

La survie des bactéries allochtones dans les milieux aquatiques a fait l'objet de nombreuses recherches mettant en oeuvre une méthodologie très diversifiée.

Ainsi, certains auteurs réalisent des incubations *in situ* par immersion de sacs à dialyse (Anderson *et al.*, 1983 ; Lessard et Sieburth, 1983); d'autres préfèrent incuber des cultures bactériennes pures *in vitro* dans une eau naturelle ou artificielle (Hood et Ness, 1982). De même, l'inoculum bactérien mis en incubation peut être très différent. Hanes et Fragala (1967) suivent *in situ* l'évolution de bactéries fécales présentes dans les eaux d'égout tandis que d'autres auteurs incubent des cultures pures en phase exponentielle (Mc Feters et Stuart, 1972 ; Singleton *et al.*, 1981 et 1982).

Cette diversité est critiquable dans la mesure où elle limite les études comparatives. La méthodologie utilisée peut en effet influencer l'estimation de la vitalité bactérienne comme le montre par exemple, l'importance du ringage sur l'estimation de la survie d'*E. coli* (Fig. 10). Ainsi, en fonction du ringage, la multiplication de cette bactérie pendant la phase initiale est plus ou moins forte et de ce fait, le T90 varie selon la préparation de l'inoculum. Cet exemple souligne par conséquent l'intérêt d'utiliser une méthodologie standardisée afin de comparer les caractéristiques auto-épuratrices de différents milieux.

Pour cette étude, 2 types d'incubations pouvaient donc être réalisés ; soit des incubations *in situ* par immersion dans la lagune des chambres à diffusion contenant les micro-organismes à étudier, soit des incubations *in vitro* dans des échantillons d'eau lagunaire prélevés et ramenés au laboratoire. La seconde solution a été préférée. D'une part, les incubations *in vitro* évitaient aux cultures bactériennes de subir artificiellement des variations de condition de culture liées à la marée que naturellement elles n'auraient pas à supporter lors de leurs rejets; D'autre part, lors d'études préliminaires *in situ* avec des sacs à dialyse (Spectrapor), les membranes ont été colmatées ou détériorées. L'ensemble de ces considérations nous a donc conduit à réaliser les incubations bactériennes en enceintes thermo-régulées. Le recours à des incubations *in vitro* permet de plus une manipulation plus aisée ainsi que le contrôle des conditions de culture (Singleton *et al.*, 1981 ; Xu *et al.*, 1982).

En utilisation courante, cette méthodologie présente enfin l'avantage de permettre la comparaison des capacités auto-épuratrices de différents milieux dans des conditions expérimentales reproductibles. Ce dernier aspect apparaît capital compte tenu des caractéristiques hydrologiques de la zone étudiée.

#### IV.3.2. Survie bactérienne dans les eaux de surface.

Les expérimentations réalisées au cours de cette étude ont permis d'évaluer les vitalités en culture de quelques bactéries pathogènes dans le milieu lagunaire. Bien que variables selon la date de prélèvement, celles-ci s'avèrent globalement assez limitées. Même, lors de la saison des crues, *E. coli*, *S. typhi* et *S. dysenteriae* ne se multiplient que pendant quelques heures (< 10 h). De même pour les incubations sans rinçage d'*E. coli*, la multiplication de ce micro-organisme ne dure qu'une dizaine d'heures. Ceci va à l'encontre de différentes études signalant une forte multiplication des bactéries fécales et plus particulièrement *E. coli* en milieu tropical (Evison et James, 1973 ; Carillo et al., 1985). Les résultats montrent que les eaux lagunaires de surface ne sont donc pas favorables à la prolifération de telles espèces bactériennes.

Le comportement des bactéries est différent selon l'espèce étudiée. Ainsi, celui des 3 entérobactéries se différencie nettement de celui de *S. faecalis* et la décroissance observée chez ces bactéries lors d'incubations en eau filtrée et autoclavée souligne le rôle des paramètres physico-chimiques dans le contrôle de ces micro-organismes en milieu naturel.

#### \* Influences des caractéristiques physico-chimiques de l'eau.

Depuis les travaux de Gameson et Saxon (1967), le rayonnement solaire apparaît comme un des facteurs les plus efficaces dans la disparition des bactéries entériques. Selon Chamberlin et Mitchell (1978), ce rayonnement les rend plus sensibles aux agressions des prédateurs. Pour Pike et al. (1970) la lumière agit directement sur la viabilité de la cellule bactérienne; l'absorption de l'énergie lumineuse induirait des altérations létales du matériel génétique ou entraînerait la formation de superoxydes toxiques pour la cellule (Eisenstark, 1971).

Cependant, compte-tenu des conditions de mise en incubation *in vitro* des cultures bactériennes, l'effet bactéricide du rayonnement solaire ne peut pas être uniquement pris en compte dans cette étude. Nos résultats montrent que le comportement des cultures bactériennes varie selon les caractéristiques physico-chimiques des échantillons; il existe un ou plusieurs facteurs présents dans l'eau et dont les concentrations varient au cours de l'année.

Parmi les paramètres physico-chimiques de l'environnement aquatique, la salinité et le pH du milieu aquatique ont été initialement suspectés (Carlucci et Pramer, 1960) mais l'importance de ces paramètres dans la disparition des bactéries allochtones n'est restée qu'au stade d'une hypothèse controversée (Paoletti, 1964). L'effet bactéricide des sels métalliques est par contre évoqué par de nombreux auteurs et pour Jones (1967), c'est la toxicité de l'ensemble des métaux lourds présents dans l'eau de mer qui serait responsable de l'élimination des bactéries telluriques en milieu marin.

Dans le cas des eaux lagunaires, d'autres facteurs pourraient être envisagés tels que les composés chimiques bactéricides isolés dans le sol (Klein et Alexander, 1986). Ces composés pourraient en effet se retrouver dans les eaux lagunaires par lessivage des sols à la saison des pluies.



Cependant, Xu et al. (1982) remettent en question l'importance directe des facteurs physico-chimiques. Ces auteurs ont montré que la disparition des entérobactéries incubées en eau synthétique ne résultait en réalité que d'une inaptitude croissante des cellules bactériennes à se développer sur les milieux de culture sélectifs utilisés pour leur numération. Les paramètres physico-chimiques initialement évoqués comme responsables du processus auto-épurateur ne pourraient que stresser la cellule bactérienne l'empêchant de former des colonies sur un milieu de culture dans des conditions d'incubation sélectives.

Ces études soulignent néanmoins le caractère débilissant des paramètres physico-chimiques de l'eau et plus précisément de la teneur en chlorure de sodium sur la viabilité des bactéries. D'après les résultats de Xu et al. (1982), le nombre de cellules viables mais non cultivables est beaucoup plus important lors d'une incubation à 25 % de salinité que lors d'une incubation à 5 % de salinité. Ce fait avait par ailleurs déjà été signalé. Ainsi, Anderson et al. (1979) notent que l'augmentation de la salinité du milieu d'incubation affecte l'activité de la bêta-galactosidase d'E. coli et se répercute sur l'aptitude de ce micro-organisme à croître sur les milieux de culture sélectifs.

Ces travaux récents montrent que l'influence du chlorure de sodium sur la viabilité des bactéries est significative; elle pourrait résulter d'une osmolyse liée au flux de Na<sup>+</sup> entrant dans la cellule. Chez les bactéries dites marines, certains systèmes membranaires protégeraient la cellule de cette accumulation létale. Tsuchiya et Shinoda (1985) ont mis en évidence une pompe à Na<sup>+</sup> chez Vibrio parahaemolyticus qui avec l'énergie fournie par la respiration, permettrait l'extraction du Na<sup>+</sup> hors de la cellule. De plus, cette bactérie serait d'autant plus capable d'extraire le Na<sup>+</sup> qu'elle possède un large spectre d'activités enzymatiques et en particulier une activité chitinolytique pour alimenter sa pompe. Son isolement fréquent sur la chitine d'organismes marins (Kaneko et Colwell, 1975) pourrait par conséquent résulter de cette quête énergétique et constituerait un moyen de survie dans un environnement oligotrophe (Dawson et al., 1981).

Un telle pompe à Na<sup>+</sup> n'a pas encore été mise en évidence chez les entérobactéries. Elle pourrait y être absente ou moins efficace que chez V. parahaemolyticus et de ce fait, ces bactéries ne pourraient pas survivre dans le milieu marin ou saumâtre. Néanmoins, d'après Gauthier (comm. pers.), la préculture sur milieu de culture salé (Marine agar par exemple) permettrait à des entérobactéries de survivre dans l'eau de mer pendant un temps assez long (au moins 15 à 20 jours). Ceci laisse supposer la possibilité d'une induction de certains systèmes d'adaptation au milieu marin, en présence de NaCl et de matière organique. On peut aussi imaginer que cette préculture conduite à la sélection des taxons les plus halotolérants. Ces phénomènes pourraient d'autre part expliquer partiellement la phase de résistance que l'on observe après la phase de décroissance dans les cultures bactériennes mises en incubation.

Quoiqu'il en soit, cette adaptation nécessite obligatoirement une dépense énergétique supplémentaire que doit pouvoir satisfaire la cellule.

En effet, il est actuellement reconnu que la survie d'une bactérie hors de son biotope est conditionnée par son aptitude à tolérer son nouvel environnement et surtout à disposer de nutriment pour son métabolisme (Klein et Kasida, 1967 ; Morita, 1982). Dans le cas contraire, ne pouvant ni maintenir son homéostasie cellulaire, ni entretenir les mécanismes de réparation, la bactérie est condamnée à disparaître.

Différentes études tendent à conforter cette hypothèse. Ainsi, lors d'une incubation en eau oligotrophe, Zinke *et al.* (1980) ont pu observer qu'en fonction de la durée d'incubation, *E. coli* devenait de plus en plus sensible à l'action du lysozyme. Des altérations de l'enveloppe cellulaire d'*E. coli* ont pu être visualisées en microscopie électronique et cette sensibilité progressive au lysozyme pourrait donc résulter d'une désorganisation de la structure membranaire. Chez cette même espèce, Anderson *et al.* (1979) notent que les conséquences d'une privation nutritionnelle se répercutent sur l'activité de la bêta-galactosidase et sur l'aptitude de ce micro-organisme à croître sur les milieux de culture sélectifs.

On peut supposer que de telles conditions ne font que renforcer la sensibilité de la cellule bactérienne aux différents facteurs de l'environnement. En milieu marin, l'oligotrophie ou plus précisément l'indisponibilité des nutriments présents serait un facteur limitant encore plus la vitalité des bactéries allochtones. Autrement dit, une entérobactérie disparaîtrait d'autant plus vite du milieu marin que celui-ci est oligotrophe. Aucun facteur n'apparaît vraiment prépondérant et c'est donc plutôt la synergie de différents facteurs qui est responsable de la disparition de ces bactéries.

Comparativement aux bactéries Gram -, l'influence des paramètres physico-chimiques et en particulier la salinité ne semblent pas avoir un caractère déterminant chez *Streptococcus faecalis*, l'espèce persistant durant les 100 heures d'incubation en eau filtrée et autoclavée. Cette aptitude spécifique a déjà pu être observée lors d'incubations en eau d'égout filtrée (Sinclair et Alexander, 1984).

La persistance de *S. faecalis* pourrait révéler une certaine aptitude de ce micro-organisme à utiliser les substances nutritives présentes dans les échantillons autoclavés de même que la résistance au stress provoqué par les facteurs physico-chimiques d'incubation.

En fait, ce comportement est à rapprocher des aptitudes de cette bactérie à croître sur des milieux hostiles tels qu'un bouillon à 6,5 % de NaCl ou un milieu à pH 9,6. La présence d'une paroi chez cette bactérie pourrait favoriser cette résistance.

Il n'est donc pas évident que *S. faecalis* et les entérocoques en général soient aussi sensibles aux stress de l'environnement que les bactéries Gram - dans le milieu aquatique; à notre connaissance, aucune étude n'a pu mettre en évidence un état non cultivable de *S. faecalis*. On peut donc se demander si ces états cellulaires existent chez les bactéries Gram + et cette interrogation devrait faire l'objet d'investigations ultérieures.

Quels que soient les échantillons d'eau naturelleensemencés, *S. faecalis* disparaît de façon similaire comme le montre les valeurs des T90 (Tab. 17). Par conséquent, la disparition de *S. faecalis* dans les eaux lagunaires semble plutôt résulter de l'intervention de facteurs thermolabiles présents dans les 4 échantillonsensemencés. Le contrôle de ces bactéries pourrait donc dépendre d'un phénomène d'origine biologique.

#### \* Influence de la température.

Comparativement à d'autres études utilisant la même méthodologie (Lessard et Sieburth, 1983), l'ensemble des T90 observés ici apparaît plus faible et le rôle de la température élevée du milieu lagunaire doit donc être également envisagé. Son action directe sur la survie de bactéries entériques a fait l'objet de nombreux travaux (Orlob, 1956 ; Lessard et Sieburth, 1983) et ceux-ci ont clairement mis en évidence une diminution de la survie proportionnelle à l'augmentation de la température d'incubation.

Pour E. coli et les entérocoques, Lessard et Sieburth (1983) calculent une corrélation inverse significative entre les T90 respectifs et les températures d'incubation ( de 0 à 24°C ). En extrapolant leur droite de régression jusqu'à la température moyenne des eaux de lagune ( 29°C ), les T90 sont respectivement pour E. coli et les entérocoques, de 23,5 et 12,7 heures. Ces valeurs s'avèrent tout à fait comparables aux T90 obtenus lors des incubations en eaux lagunaires de même salinité.

D'après les pentes des droites de régression calculées par ces auteurs, il apparaît que la température n'agit pas avec la même intensité sur les différentes espèces bactériennes. Ainsi, les entérocoques présentent une sensibilité accrue à l'augmentation de la température.

L'influence de la température doit être reliée à l'activation thermique du métabolisme bactérien (Orlob, 1956 ; Bolter, 1982). Il en résulte un épuisement plus rapide des nutriments disponibles dans le milieu puis des réserves cellulaires ce qui entraînent la mort de la cellule.

A l'inverse, les basses températures en ralentissant les réactions métaboliques permettent de prolonger le temps de survie des cellules bactériennes (Hanes et al., 1965).

L'impact de la température élevée est donc dépendant du niveau d'eutrophisation du milieu récepteur. Graham et Sieburth (1973) ont ainsi pu montrer que l'accroissement de la température d'incubation de 15°C à 25°C ne pouvait permettre la croissance de S. typhi et E. coli que si le milieu artificiel d'incubation était complété avec 30 mg/l de trypticase. Une forte concentration de matière organique pourrait donc directement favoriser la vitalité bactérienne mais ces auteurs relient aussi cette croissance à l'atténuation de l'effet bactéricide des métaux lourds par chélation avec les peptones ajoutées.

Cependant, les résultats de cette étude réalisée en eau de mer synthétique très enrichie doivent être nuancés avant leur généralisation au milieu naturel. L'intervention de nombreux facteurs biotiques peut y être en effet envisagée et ceux-ci pourraient être également influencés par la température.

\* Influence des facteurs biotiques.

Lors de son rejet dans le milieu aquatique, la bactérie allochtone doit rivaliser avec la microflore autochtone pour pouvoir survivre et la compétition s'exerçant vis à vis des nutriments métabolisables détermine la dynamique des populations bactériennes.

Les incubations de S. faecalis sont à ce niveau révélatrices. En effet, les aptitudes de cette bactérie ont conduit à suspecter l'intervention d'un facteur biologique. Cependant, la présence simultanée d'un prédateur ou parasite dans les 4 échantillons d'eau semble peu probable; celui-ci aurait à supporter des variations très fortes de son biotope et aucun prédateur de ce type n'a pu être encore mis en évidence. De même que Sinclair et Alexander (1984), on doit donc plutôt considérer que la disparition de S. faecalis résulte des aptitudes limitées de cette bactérie à rivaliser avec la microflore autochtone.

En milieu tropical, la compétition bactérienne pour les substances nutritives présentes doit être d'autant plus intense que la concentration des populations autochtones est élevée. Dans les eaux de la baie de Biétri, Guiral (1984) dénombre avec le milieu d'Oppenheimer et Zobell 2216E jusqu'à  $10^7$  UFC/ml tandis que pour des températures d'eau avoisinant 30°C, Carmouze et Caumette (1985) notent des temps de doublement de 1 à 2 heures et des productions bactériennes de  $10^8$  à  $10^9$  UFC / ml.j.

Parallèlement, la température élevée de l'eau doit également influencer l'ensemble des facteurs biologiques épurateurs.

Mc Cambridge et Mc Meekin (1980) ont ainsi mis en évidence *in vitro* l'effet activateur de la température sur la multiplication et l'activité de protozoaires prédateurs d'E. coli et de S. typhi.

De même, on peut supposer qu'un tel milieu chaud et eutrophe favorise le développement du phytoplancton et, par conséquent, la production de substances antibactériennes par les algues. La lagune Ebrié est en effet caractérisée par l'existence d'une biomasse algale extrêmement élevée. Les effectifs oscillent couramment entre quelques milliers et quelques millions de cellules par litre et des développements de 100 à 200 millions de cellules par litre ont été observés (Maurer, 1978).

Ces effets indirects de la température pourraient donc également expliquer les faibles valeurs des T90 observées dans notre étude ainsi que les résultats opposés de certains auteurs qui négligent le rôle de ces activations dans le processus auto-épurateur (Hendricks et Morrisson, 1967 ; Gordon et Fliermans, 1978 ).

En milieu marin, l'importance des facteurs biologiques dans le processus auto-épurateur a fait l'objet de nombreuses publications signalant la diversité et la complexité de leur mode d'action (Aubert *et al.*, 1968 et 1981 ; Sieburth, 1964).

Pour le milieu lagunaire ivoirien, les différentes incubations réalisées avec E. coli en eau filtrée et/ou autoclavée (Fig. 21 et 22) révèlent la présence de tels facteurs biologiques. Dans l'échantillon le plus marin (Fig. 21), les différentes filtrations mettent en évidence une prédation par des organismes de taille comprise entre 0,2 et 0,8  $\mu\text{m}$  et cette disparition pourrait résulter de de l'intervention d'un micro-prédateur qui d'après la taille, correspondrait à Bdellovibrio (Stolp et Starr, 1963).

De même au cours de ces cultures, il a pu être fréquemment observé la présence de micro-organismes se développant au détriment des colonies d'E. coli. Ces dernières se trouvaient alors rapidement incapables de croître et "englouties" par ce prédateur.

Ces micro-organismes ont pu être isolés et d'après l'observation microscopique de leurs fructifications caractéristiques, ils ont pu être assimilés au genre Polyangium de la famille des Myxobacteriaceae (McCurdy, 1974). Ces bactéries sont fréquemment isolées à partir du sol ou dans les eaux de rivière et l'importance de leur fonction bactériolytique a été signalée par Raverdy (1973).

Cependant, en milieu océanique, l'isolement de ces bactéries est rare et à notre connaissance, seuls Roper et Marshall (1977) dans les eaux polluées australiennes ont pu isoler une espèce marine. L'efficacité de cette bactérie vis à vis d'E. coli a pu être vérifiée in vitro puisque l'introduction de Myxobacter dans une culture d'E. coli incubée en eau de mer stérile entraîne au bout de 30 h la disparition du coliforme (Roper et Marshall, 1977). De même que pour cette espèce, les souches isolées dans notre étude n'ont pu être cultivées sur les milieux proposés pour leur culture (Raverdy, 1973). Par contre, le milieu au desoxycholate de sodium (BioMérieux) utilisé pour la recherche des coliformes s'est révélé très satisfaisant pour l'isolement et la culture de cette espèce. Sur ce milieu de culture, des concentrations de  $10^2$  Myxobacter par ml ont pu être dénombrées, ce qui conduit à soupçonner l'intervention de ces micro-organismes dans l'épuration naturelle des eaux lagunaires ivoiriennes.

Nos essais mettent aussi en évidence l'action prépondérante d'agents thermolabiles et inférieurs à 0,2  $\mu\text{m}$ . D'après Jones (1967), cette nette prolongation de la survie pourrait résulter de l'inactivation de l'effet bactéricide des métaux lourds par précipitation lors de l'autoclavage.

On peut également soupçonner le rôle de facteurs biologiques thermosensibles. En effet, des microprédateurs tels que les bactériophages (Guélin, 1952 ; Carlucci et Pramer, 1960) et leur activité lytique pourrait très bien s'exprimer dans les eaux de lagune.

A cet égard, les étalements trop denses de culture d'E. coli incubé ont permis de constater très fréquemment l'apparition d'auréoles décolorées, rappelant d'après leur propagation centripète des plages de lyse dues à des bactériophages.

Enfin, de même qu'Anderson et al. (1983), on pourrait aussi soupçonner la présence d'ultra-microbactéries ( $< 0,2 \mu\text{m}$ ) isolées en milieu estuarien par Mc Donnell et Hood (1982) et dont l'influence se manifesterait au travers des phénomènes de compétition ou d'antibiose.

De nombreux auteurs suggèrent l'action prépondérante de substances présentant des propriétés bactéricides vis à vis des micro-organismes telluriques. Initialement soupçonnés par Nicati et Reitsch (1885) et De Giaxa (1889), le rôle et la nature de telles substances ont été étudiés, discutés et résumés par différents auteurs (Carlucci, Scarpino et Pramer, 1961 ; Aubert, Aubert et Gauthier, 1968 ; Sieburth, 1968). Elles peuvent être produites par des métazoaires, des algues supérieures et planctoniques ou encore par des bactéries marines.

En lagune Ebrié, parmi l'ensemble des espèces phytoplanctoniques identifiées par Maurer (1978) douze d'entre elles (Tab. 21) sont susceptibles d'être antibiotico-productrices d'après Aubert et al. (1981).

Leur pouvoir bactéricide résulterait principalement de la synthèse d'acides organiques (acides gras et acide acrylique ou précurseurs) dont les activités ont pu être mises en évidence sur de nombreuses espèces bactériennes (Aubert et al., 1981).

Familles	Espèces phytoplanctoniques	Nature chimique	%
DIATOMÉES :	<i>Asterionella japonica</i>	ac. gras, polysaccharides	-
	<i>Chaetoceros sp.</i>	ac. gras, polysaccharides	(12-15)
	<i>Nitzschia sp.</i>	ac. gras	( 6-23)
	<i>Skeletonema costatum</i>	ac. acrylique ou précurseur	-
	<i>Thalassiosira sp.</i>	ac. gras	(16-18)
DINOFLAGELLES :	<i>Gyrodinium sp.</i>	ac. acrylique ou précurseur	(15-21)
	<i>Prorocentrum micans.</i>	hydrocarbures, terpènes	(16-23)
CHLOROPHYCEES :	<i>Tetraselmis sp.</i>	ac. gras	( 8-23)
CYANOPHYCEES :	<i>Lyngbia sp.</i>	tanins, terpènes	(12-16)
	<i>Oscillatoria sp.</i>	ac. acrylique, précurseurs	( 8-15)

Tableau 21 : Liste des espèces phytoplanctoniques antibiotico-productrices rencontrées en lagune Ebrié (mai-octobre 1976) et nature de la substance bactéricide. D'après Maurer (1978) et Aubert et al., 1981). La gamme de salinité de la période d'isolement est entre parenthèses.

#### IV.3.3. Survie bactérienne dans les eaux de l'hypolimnion des zones stratifiées.

La survie a été estimée par des incubations réalisées *in vitro* mais dans des conditions équivalentes à celles caractérisant l'environnement de l'hypolimnion. *E. coli* y survit 2 fois plus longtemps qu'en surface avec un T90 de 40,5 h tandis que les vitalités de *S. faecalis* et *C. perfringens* ne présentent pas de différence entre les 2 niveaux.

Dans le cas de *C. perfringens*, nous avons pu observer *in situ* la présence de *Clostridium* sous forme végétative. En sédimentant dans l'hypolimnion anoxique, *C. perfringens* ne serait pas capable de s'y multiplier, mais ces bactéries pourraient rester plus longtemps sous une forme végétative alors que dans les eaux de surface oxygénée, elles sont conduites à sporuler pour survivre.

Pour *E. coli*, la prolongation de vitalité observée pourrait résulter des caractéristiques anoxiques et aphotiques de l'hypolimnion qui limitent l'intervention des facteurs épurateurs et en particulier la production de substances inhibitrices par les organismes photosynthétiques. En plus du manque d'oxygène, la présence de sulfure à des fortes concentrations pourrait affecter les organismes zooplanctoniques, prédateurs potentiels d'*E. coli*, et justifier de ce fait, leur absence dans ces zones (Caumette *et al.*, 1983 ; Pagano et St Jean, comm. pers. ).

A cet égard, Vago (1974) a montré que la tolérance des organismes zooplanctoniques à l' $H_2S$  était inversement proportionnelle à la température et la salinité. D'après Aldeman et Smith (1972), la toxicité de l' $H_2S$  résulterait de sa complexation avec des métaux entraînant la formation de composés inhibiteurs de la chaîne respiratoire. On peut donc aussi supposer que cette complexation des métaux lourds tend à limiter leur effet bactéricide suspecté par Jones (1967).

Enfin, l'hypolimnion de la station étudiée se caractérise par une forte sédimentation de matière organique. Celle-ci en chélatant les métaux lourds pourrait également limiter leur action bactéricide (Graham et Sieburth, 1973). De même, d'après Roper et Marshall (1974), les phénomènes d'adsorption sur les colloïdes en suspension confèreraient à *E. coli* une protection vis à vis des bactériophages et autres prédateurs.

L'ensemble de ces caractéristiques de l'hypolimnion concourt donc à limiter l'expression des facteurs auto-épurateurs qui peuvent s'exprimer en surface vis à vis d'*E. coli*. Il faut d'ailleurs remarquer que le T90 d'*E. coli* observé dans cette étude est tout à fait comparable à celui déduit lors d'une incubation d'*E. coli* en eau filtrée et autoclavée de même salinité (Tab. 18).

Parallèlement à ces effets interférant avec les phénomènes auto-épurateurs, la matière organique accumulée dans ces zones pourraient directement favoriser la vitalité d'*E. coli*. Il est également possible que le type de nutriments présents soit différent de ceux de surface et plus facilement métabolisable par la bactérie (Gerba et McLeod, 1976).

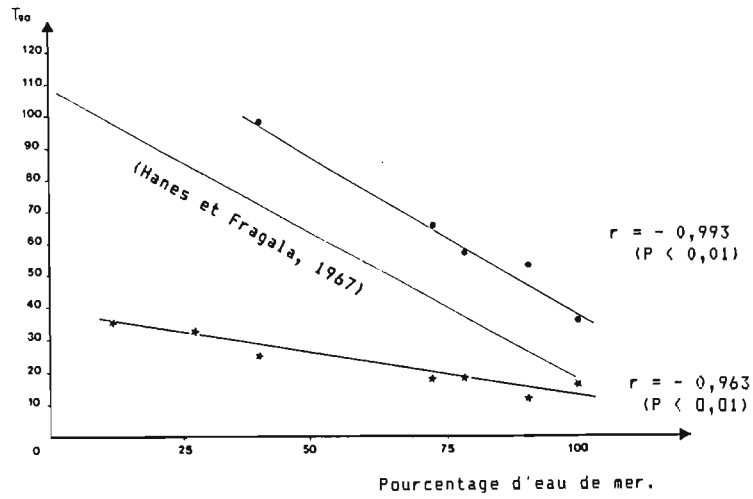


Figure 28 : Variation du T<sub>90</sub> d'*Escherichia coli* incubé en eau naturelle (★—★) et en eau filtrée et autoclavée (●—●) en fonction du pourcentage d'eau de mer.

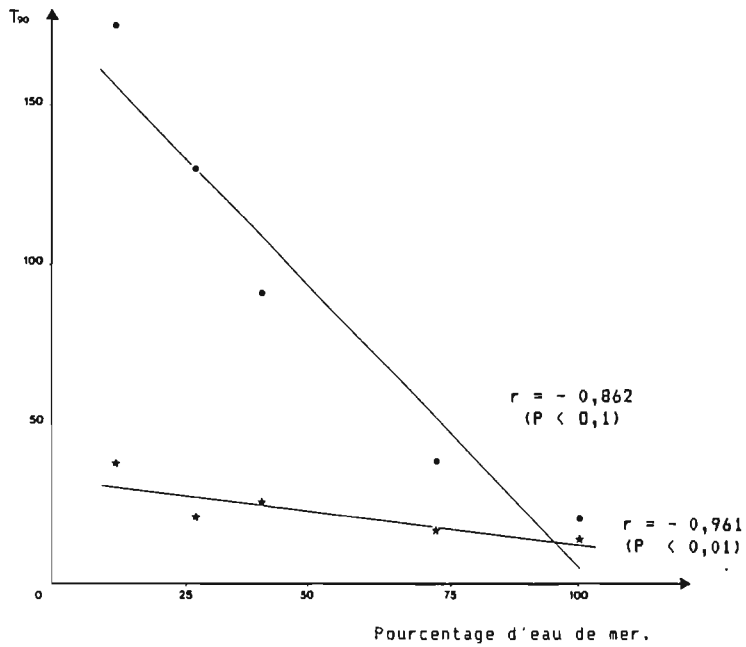


Figure 29 : Variation du T<sub>90</sub> de *Salmonella typhi* incubée en eau naturelle (★—★) et en eau filtrée et autoclavée (●—●) en fonction du pourcentage d'eau de mer.

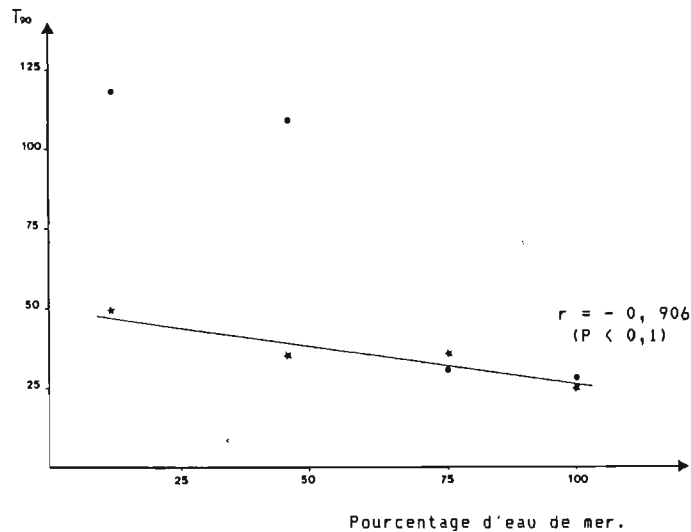


Figure 30 : Variation du T<sub>90</sub> de *Shigella dysenteriae* incubée en eau naturelle (★—★) et en eau filtrée et autoclavée (●—●) en fonction du pourcentage d'eau de mer.



Par conséquent et même si aucune multiplication des trois bactéries incubées n'a pu être observée *in vitro*, la prolongation de la survie d'*E. coli* et la persistance de cellules végétatives de *C. perfringens* dans l'hypolimnion soulignent les risques liés à une eutrophisation excessive. Une telle pollution organique en limitant l'intervention auto-épuratrice de processus biologiques voire la contribution de certains facteurs physico-chimiques peut donc influencer le comportement des bactéries pathogènes. Il pourrait en être de même avec une pollution chimique qui intoxiquerait les agents biologiques. Les rejets organiques et chimiques, outre les pollutions qu'elles constituent peuvent par conséquent conduire à exacerber les risques liés à une contamination microbienne.

Bien que limitées ( Baies de Biétri et de Marcory ), ces zones eutrophes et anoxiques peuvent devenir de véritables réservoirs à bactéries pathogènes et leur remise en suspension lors de la destratification de la colonne d'eau pourrait entraîner leur dissémination. De plus, on peut suspecter que la remontée brutale de sels nutritifs associée à ce phénomène holomictique puisse favoriser, au moins dans un premier temps, la vitalité de ces micro-organismes comme elle favorise celle des bactéries autochtones dans les eaux de surface (Gerba et McLeod, 1976 ; Carmouze et Caumette, 1985).

#### VI.3.4. Influences des variations hydroclimatiques.

L'alternance saisonnière des influences marines et continentales fait que la qualité hydrobiologique des eaux lagunaires est variable. Au cours de la saison sèche, l'influence marine est maximale, puis elle est progressivement contrebalancée par les pluies et les crues fluviales. Parallèlement à la dessalure des eaux, on note une augmentation des concentrations en sels nutritifs. Les eaux lagunaires sont alors enrichies par les apports nutritifs d'origine météoriques et hydrologiques (Lemasson et Pagès, 1982 ; Dufour et Lemasson, 1985).

Bien que nos données résultent d'expérimentations réalisées *in vitro*, ces variations hydrobioclimatiques pourraient influencer les comportements d'*E. coli*, de *S. typhi* et *S. dysenteriae* dans les eaux lagunaires. Par contre, elles n'affecteraient pas ceux de *S. faecalis* qui restent très limités quelque soit la saison.

L'évolution de vitalité des bactéries Gram - reflèterait donc la variabilité saisonnière des capacités auto-épuratrices du milieu lagunaire. Les figures 28, 29 et 30 témoignent de l'importance des fluctuations hydrobioclimatiques sur le comportement des différentes espèces incubées en eau naturelle ou en eau filtrée et autoclavée.

Les variations respectives des T90 sont exprimées en fonction des pourcentages d'eau de mer présents en lagune puisqu'en toute rigueur, on ne peut pas considérer la salinité comme l'unique facteur de ce contrôle. Ces représentations mettent en évidence des corrélations significatives entre les T90 et les pourcentages d'eau marine que ce soit lors d'incubations en eau naturelle ou en eau filtrée et autoclavée.

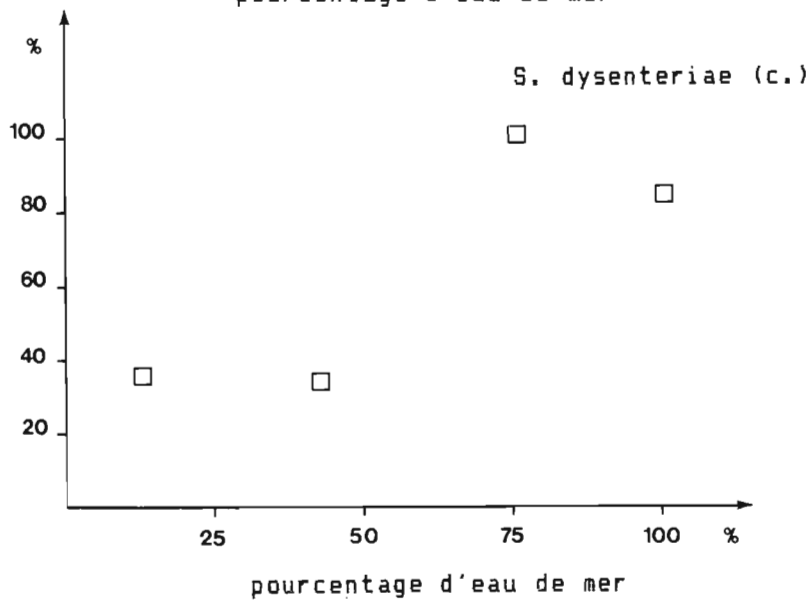
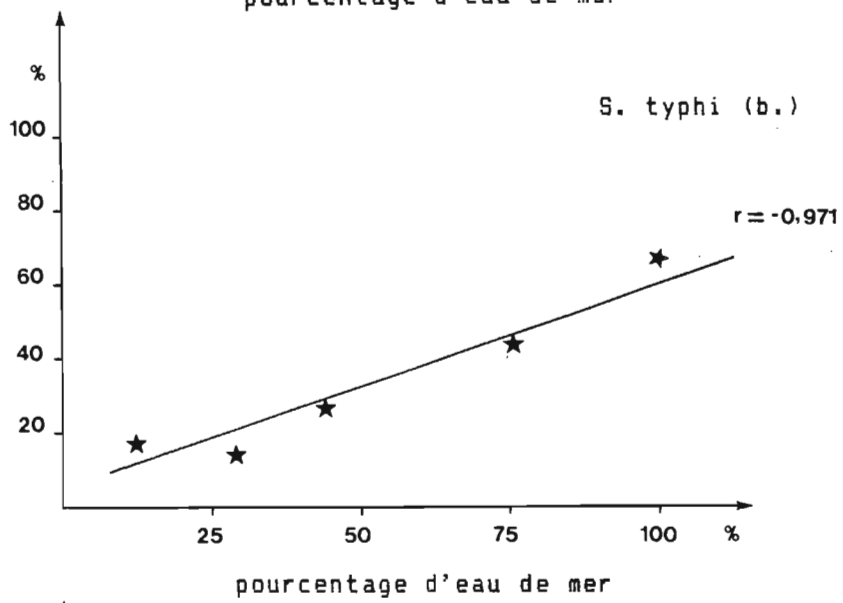
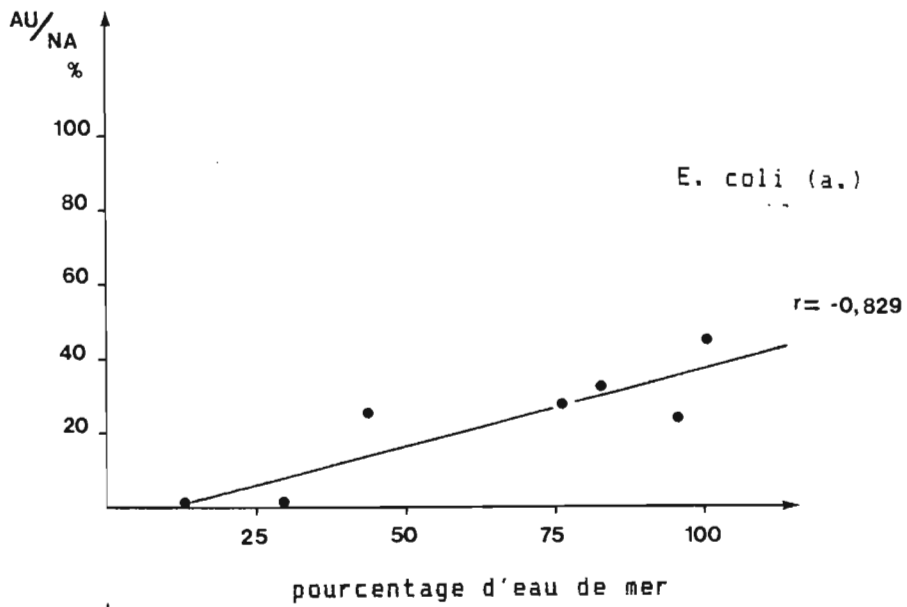


Figure 31 : Variation du rapport des pentes respectives des droites de régression obtenues lors des incubations en eau autoclavée (AU) et en eau naturelle (NA) d'*Escherichia coli* (a.), de *Streptococcus faecalis* (b.) et *Shigella dysenteriae* (c.) en fonction du pourcentage d'eau de mer présente dans l'échantillon.

C'est lorsque l'intrusion marine est maximale que sont observées les durées de survie les plus courtes et les T90 augmentent lorsque le pourcentage d'eau de mer diminue. Ceci conduit à soupçonner le rôle déterminant du milieu océanique dans le contrôle de ces micro-organismes. Cette influence marine sur la vitalité des bactéries avait déjà été signalée par Hanes et Fragala (1967).

En effet, en incubant *in vitro* et à 20°C, 30 ml d'eau d'égout dans différentes dilutions d'eau de mer, ces auteurs observent une corrélation significative ( $P < 0.05$ ) entre le taux de survie d'*E. coli* et le pourcentage d'eau de mer présent dans le microcosme d'incubation. En comparant ces observations à nos résultats, on constate que la pente de leur droite ( $a = -1.01$ ) est équivalente à celle calculée lors de nos incubations en eau filtrée et autoclavée ( $a = -0.98$ ) (Fig. 28).

Cette similitude est aussi à rapprocher des travaux de Carlucci et Pramer (1960) qui, en incubant *E. coli* dans de l'eau de mer différemment diluée avec de l'eau désionisée, observent une corrélation négative entre le pourcentage de survie et la concentration d'eau de mer du milieu d'incubation. De 25 à 100% d'eau de mer, la pente de cette droite de régression est de -1,08 ; cette valeur est également semblable à celle observée avec nos échantillons.

Ces comparaisons soulignent par conséquent le rôle prépondérant des paramètres physico-chimiques dans ces variations du comportement des entérobactéries incubées *in vitro* et l'influence de la concentration saline de l'eau de mer doit être significative vis à vis de ce phénomène.

Le retrait des eaux marines affecterait donc directement le comportement des entérobactéries rejetées dans la zone estuarienne. De ce fait, la vitalité de ces bactéries serait prolongée à la saison des pluies et des crues et ce, d'autant plus que les pluies et les crues sont une source d'enrichissement des eaux lagunaires en sels nutritifs; comparativement à la saison d'étiage, les concentrations d'azote total doublent à la saison des pluies pour atteindre une valeur moyenne de 50  $\mu\text{atg/l}$  et les pluies contiennent en moyenne 35 et 3,5  $\mu\text{atg/l}$  d'azote minéral dissous et de phosphore minéral dissous, et 68  $\mu\text{atg/l}$  d'azote organique dissous (Lemasson et Pagès, 1982 ; Dufour et Lemasson, 1985).

Le rapport AU/NA, soit le rapport des pentes des droites de régression respectivement calculées lors d'incubations en eau filtrée et autoclavée (AU), et en eau naturelle a été calculé afin de préciser les composantes du pouvoir épurateur des eaux; ce rapport exprimé en % permet de traduire l'importance relative de la contribution des facteurs biotiques (thermolabiles) et abiotiques (non thermolabiles) dans la disparition des bactéries en culture. Le rapport AU/NA est significativement corrélé avec le pourcentage d'eau de mer pour *E. coli* ( $P < 0,05$ ), *S. typhi* ( $P < 0,01$ ) et à un degré moindre pour *S. dysenteriae* (Fig. 31).

Ainsi, plus le pourcentage d'eau de mer est élevé, plus la contribution des facteurs abiotiques (non thermolabiles) est grande. Pour *S. typhi*, l'influence de ces facteurs en eau de mer est majoritaire et cette prédominance sur les facteurs biotiques se maintient jusqu'à une concentration de 75% d'eau marine. Par contre pour *E. coli*, la contribution des facteurs biotiques (thermolabiles) prédomine même dans les eaux les plus marines.

En réalité, la thermosensibilité des métaux lourds de même que la dénaturation thermique de la réserve trophique ne permettent pas de distinguer nettement la nature biologique ou physico-chimique des différents facteurs et par conséquent, limitent l'interprétation des variations des rapports AU/NA.

Néanmoins, il est clair qu'au fur et à mesure de la régression des eaux marines, l'influence des facteurs physico-chimiques thermostables diminue. Ceux-ci ne sont alors que partiellement suppléés par des agents biologiques (thermolabiles). Ainsi, lorsque les eaux sont les plus douces, les capacités d'auto-épuration du milieu lagunaire reposent entièrement sur les facteurs biologiques thermolabiles; ceci est confirmé par la croissance d'*E. coli* en eau filtrée et autoclavée (Fig. 17).

Au cours de cette période, la prédominance du contrôle biologique pourrait s'avérer d'autant plus significative que les eaux lagunaires sont alors plus eutrophes (Lemasson et Pagès, 1982 ; Dufour et Lemasson, 1985). De même que Moebus (1972), on peut donc supposer que les variations hydro-climatiques de l'état d'eutrophisation du milieu lagunaire conditionnent les fluctuations saisonnières de l'activité antibactérienne d'origine biologique. Inversement, l'intrusion d'eau marine oligotrophe durant la saison sèche en diluant les eaux lagunaires conduit à limiter l'expression des phénomènes biologiques et par conséquent permet de mettre en relief la participation des paramètres physico-chimiques.

Il apparaît donc que le pouvoir auto-épurateur des eaux lagunaires au niveau d'Abidjan résulte de la synergie de facteurs biotiques et abiotiques dont les origines et les interactions sont directement conditionnées par l'hydroclimat du bassin lagunaire.

Cependant, les fluctuations saisonnières de celui-ci ne s'expriment pas de manière identique sur la vitalité des différentes bactéries entériques (Fig. 32).

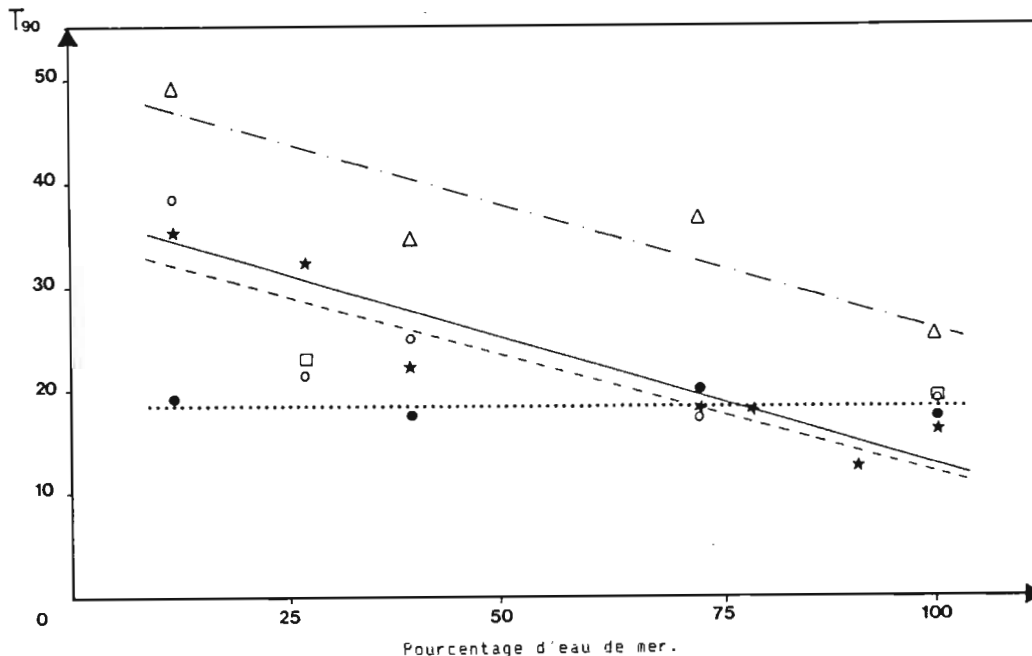


Figure 32 : Variations des différents T90 en fonction du pourcentage d'eau de mer (★ : *E. coli* ; ○ : *S. typhi* ; △ : *S. dysenteriae* ; ● : *S. faecalis* ; □ : *P. aeruginosa*).

Ainsi, *S. dysenteriae* survit nettement plus longtemps que toutes les autres bactéries étudiées quelle que soit la concentration en eau de mer. Mc Feters et al. (1974) avaient déjà noté la vitalité supérieure des *Shigella* en eau douce par rapport aux autres bactéries entériques. D'après notre étude, cette meilleure survie se confirme aussi en milieu saumâtre et marin. Cette constatation se révèle primordiale puisque le choix des bio-indicateurs repose sur la similitude de leurs aptitudes de survie avec celles de micro-organismes pathogènes. Ni *E. coli*, ni *S. faecalis* ne satisfont donc à cette condition vis à vis des *Shigella*.

Les aptitudes de survie d'*E. coli* sont légèrement supérieures à celles de *S. typhi* et évoluent de manière identique. De ce fait, *E. coli* se révèle un indicateur fidèle de la présence de *Salmonella* confirmant les appréciations de Mc Cambridge et Mc Meekin (1980) en milieu estuarien.

De même, les vitalités de *P. aeruginosa* et *S. typhi* sont tout à fait similaires pour les 2 incubations communes réalisées. Cependant, la recherche de *P. aeruginosa* en tant que témoin de la présence de *Salmonella* ne semble pas présenter d'intérêt supplémentaire à celle d'*E. coli*. Par contre, *S. faecalis* ne peut témoigner de la présence de salmonelles que pendant la saison sèche puisque *S. typhi* survit mieux que *S. faecalis* dès que l'influence marine diminue (< 70 % d'eau de mer).

Cette dernière observation souligne donc la nécessité de prendre en compte les fluctuations saisonnières des vitalités bactériennes respectives dans le choix des bio-indicateurs en milieu lagunaire.

D'après le comportement des entérocoques dans les eaux estuariennes et marines, de nombreux auteurs (Hanes et Fragala, 1967 ; Lessard et Sieburth, 1983) recommandent la recherche de ce groupe bactérien. Notre étude réduit la validité de ces appréciations pour ce milieu aquatique. La survie de *S. faecalis* reste constamment faible et l'absence de cette bactérie ne peut pas permettre de conclure à l'absence de micro-organismes pathogènes tels que les *Salmonella*. Cette caractéristique limite donc l'intérêt de son dénombrement dans les eaux lagunaires ivoiriennes. Cette inadéquation des entérocoques pour les milieux tropicaux avait déjà été signalée par Evison et James (1975); elle pourrait résulter de la plus grande sensibilité de ce groupe bactérien à l'augmentation de température (Lessard et Sieburth, 1983).

A l'inverse d'*E. coli* et de *S. faecalis*, *C. perfringens* supporte mieux les variations physico-chimiques du milieu aquatique (Hirn et al., 1980). Aucune décroissance n'est observée durant les 100 premières heures d'incubation (Fig. 25) et grâce à sa forme sporulée, il persiste dans l'environnement plus longtemps que les micro-organismes pathogènes testés. D'après Oragui et Mara (1983), le T90 de *C. perfringens* est d'environ 50 jours pour une incubation en eau de rivière à 30°C.

Les incubations réalisées au cours de cette étude ont permis de constater que cette bactérie ne se multipliait ni dans les eaux de surface, ni dans les sédiments en suspension anoxiques. *C. perfringens* s'avère donc un excellent témoin de contamination ancienne. Compte tenu de sa distribution ubiquiste et de ses caractéristiques auto-écologiques, son unique détection reste néanmoins difficile à interpréter, mais sa recherche associée à celle d'*E. coli* devrait permettre une évaluation correcte de la contamination fécale du milieu lagunaire ivoirien.

Enfin, le choix d'*E. coli* en tant qu'indicateur de pollution récente de ce milieu lagunaire tropical va à l'encontre de différentes études signalant la multiplication de coliformes fécaux dans des eaux tropicales (Evison et James, 1973 ; Carillo *et al.*, 1986). Carillo *et al.* (1986) observent *in situ* la croissance d'*E. coli* dans les eaux douces d'une rivière porto-ricaine et réfute le choix de cette bactérie en tant que bioindicateur en milieu tropical. Pour le milieu ivoirien au niveau d'Abidjan, la multiplication d'*E. coli* est restée très limitée (< 10h) et cette étude souligne l'importance de prendre aussi en compte la spécificité de chaque écosystème tropical.

#### IV.4. Conclusion.

La survie de bactéries pathogènes rejetées dans l'environnement aquatique reste un sujet de recherche privilégié compte tenu des diverses implications sanitaires qui en résultent. Cependant, malgré de nombreuses épidémies d'origine hydrique qui sévissent encore dans les pays tropicaux, peu d'études se consacrent à la survie des micro-organismes responsables de ces affections. Cette absence a motivé notre étude sur la survie de bactéries pathogènes dans les eaux baignant la ville d'Abidjan.

Si la méthodologie classique utilisée a limité l'évaluation réelle de la survie des bactéries rejetées dans la lagune, elle a cependant permis de constater qu'aucune croissance significative n'avait lieu que ce soit dans les échantillons de surface ou de fond. Les eaux lagunaires dans la zone estuarienne ne permettraient pas la prolifération d'*Escherichia coli*, de *Salmonella typhi*, de *Shigella dysenteriae* ou encore de *Streptococcus faecalis*. Au contraire, les eaux présenteraient certaines caractéristiques physico-chimiques et biologiques dont l'action synergique limiterait la vitalité des bactéries entériques.

L'intensité de la contribution des paramètres physico-chimiques au processus auto-épurateur d'un milieu aquatique est difficile à apprécier (Xu *et al.*, 1982). Néanmoins, cette étude montre que les variations saisonnières de l'influence marine sont à l'origine des différences de comportement des entérobactéries; ceci souligne l'influence des concentrations salines de l'eau de mer sur les aptitudes de culture d'*E. coli*, *S. typhi* et *S. dysenteriae*. Les teneurs en chlorure de Sodium et en métaux lourds sont le plus probablement à l'origine de ce comportement. La réponse à cette hypothèse passe par la connaissance des mécanismes moléculaires permettant aux bactéries autochtones des milieux marins et saumâtres de supporter les différences de composition ionique de part et d'autre de leur membrane. D'après nos incubations, les bactéries à Gram- seraient plus sensibles à la composition ionique de l'eau qu'une bactérie à Gram+ comme *S. faecalis*. En caractérisant "les gènes marins" qui confèrent aux bactéries la capacité voire la préférence à vivre dans un environnement marin (Bertrand et Larsen, comm. pers.), les progrès de la biologie moléculaire devraient donc également profiter à la meilleure compréhension du processus d'auto-épuration des eaux de mer.

D'autre part, dans les eaux lagunaires ivoiriennes, cette sensibilité à la composition ionique des eaux doit être amplifiée par la température élevée et surtout par les variations saisonnières du niveau d'eutrophisation. Globalement, les saisons des pluies et des crues peuvent donc être considérées comme plus favorables à la survie de entérobactéries car les eaux lagunaires sont alors plus douces et plus eutrophes. Ces périodes pourraient par conséquent être plus propices à des flambées épidémiques d'infections causées par ces bactéries.

Pour les mêmes raisons, les zones plus continentales de la lagune sont susceptibles d'être plus favorables à la survie de bactéries pathogènes et de ce fait, à leur transmission.

Néanmoins, l'eutrophie des eaux lagunaires permet la multiplication d'agents biologiques qui contribuent par prédation, antibiose ou encore par compétition à limiter le développement des bactéries allochtones.

L'implication de phénomènes d'origine biologique est plus facile à mettre en évidence. Pour les incubations d'E. coli, il a pu être observé une prédominance du contrôle exercé par des substances thermosensibles et bactéricides ainsi qu'une prédation qui pourrait résulter de l'intervention de micro-prédateurs tels que Bdellovibrio ou Myxobacter. L'étude de ces myxobactéries telles que Polyangium méritera une investigation plus approfondie car celles-ci sont peu étudiées et leur présence dans des eaux lagunaires est signalée pour la première fois. Par contre, la disparition de S. faecalis résulterait plutôt de son incapacité à rivaliser avec la microflore autochtone pour utiliser les nutriments disponibles dans l'eau.

Soumis à d'importants rejets eutrophisants, les eaux lagunaires abritent donc un ensemble de populations bactériennes, phyto et zooplanctoniques qui par leurs activités bactéricide et prédatrice entraînent la disparition des bactéries allochtones.

Cependant, la pollution organique a atteint une telle intensité que l'hypolimnion de certaines baies confinées est devenu hypereutrophe et anoxique avec production d'hydrogène sulfuré. Dans de telles conditions, il a pu être observé une meilleure aptitude de culture d'E. coli ainsi que la persistance de C. perfringens sous la forme végétative. Ces observations soulignent par conséquent les risques liés à une eutrophisation excessive des eaux. Les caractéristiques aphotiques et anoxiques limitant l'expression de phénomènes auto-épurateurs, ces zones hypereutrophes peuvent constituer des réservoirs de bactéries pathogènes. Ces suspicions sont d'autant plus importantes que la destratification de la colonne d'eau permet le brassage des eaux ce qui pourrait favoriser la dissémination de ces bactéries.

De même, il est important de s'inquiéter de l'accroissement de la pollution chimique dans les eaux lagunaires dans la mesure où celle-ci peut intoxiquer les agents biologiques qui interviennent dans l'auto-épuration des eaux. Les rejets organiques et chimiques, outre les agressions qu'elles constituent, peuvent conduire à exacerber les risques liés à une contamination microbienne; cette constatation souligne par conséquent l'intérêt d'une approche globale de l'assainissement des eaux.

CHAPITRE V : EVOLUTION DE LA CONTAMINATION MICROBIENNE  
DES EAUX LAGUNAIRES AU COURS D'UN CYCLE ANNUEL





Parmi l'ensemble des agressions polluantes subies par le milieu lagunaire au niveau d'Abidjan, la pollution microbienne constitue une des agressions les plus préoccupantes.

En Côte d'Ivoire, les salmonelloses et en particulier la fièvre typhoïde sévissent à l'état endémique (Le Noc et Orio, 1972 ; Gallais et al., 1983). Sur la base d'enquêtes hospitalières, un éventail de sérotypes peut être incriminé mais Salmonella typhi paraît prévaloir puisqu'elle représente près de 50% des souches isolées (Le Noc et Orio, 1972). C'est au niveau d'Abidjan que sont recrutés la majorité des cas et les quartiers populeux et insalubres sont les plus atteints (Gallais et al., 1983). Le taux de létalité est de 4% et le relais hydrique bien que probable n'a pas pu être démontré.

D'autre part, la brutale irruption du choléra en Afrique Noire a marqué une étape importante dans l'histoire de la septième pandémie. En 1970, le choléra fut signalé pour la première fois dans les zones côtières du golfe de Guinée. Onze pays d'Afrique Occidentale (+ 7 en 1971) furent atteints avec 150 000 cas et 20 000 décès (Felix, 1971).

S'installant d'emblée dans la région lagunaire, la vague épidémique a atteint la Côte d'Ivoire au mois d'octobre 1970 (Bourgeade et al., 1973). Le Vibrio cholerae El Tor sérotype Ogawa fut principalement mis en cause (Bourgeade et al., 1973). Pendant la période épidémique, le vibron cholérique fut régulièrement isolé des eaux lagunaires baignant les villages atteints (Duchassin et al., 1973). Depuis, cette affection semble se maintenir sous une forme endémo-sporadique dans les régions lagunaires (Duchassin et al., 1973 ; Dosso et al., 1983).

Parallèlement, de nombreux syndromes cholériformes causées par des bactéries halophiles (Vibrio parahaemolyticus ; Aeromonas hydrophila) sont signalés dans les régions lagunaires du golfe de Guinée (Bockemühl et Triemer, 1974 ; Dosso et al., 1984).

Devant ces menaces épidémiologiques et compte tenu de ses nombreuses vocations socio-économiques, la lagune Ebrié méritait la mise en place d'un programme d'évaluation de sa qualité microbiologique. Cette constatation est à l'origine de cette étude qui se limite cependant à la région estuarienne plus particulièrement polluée par les rejets domestiques et industriels de la ville d'Abidjan.

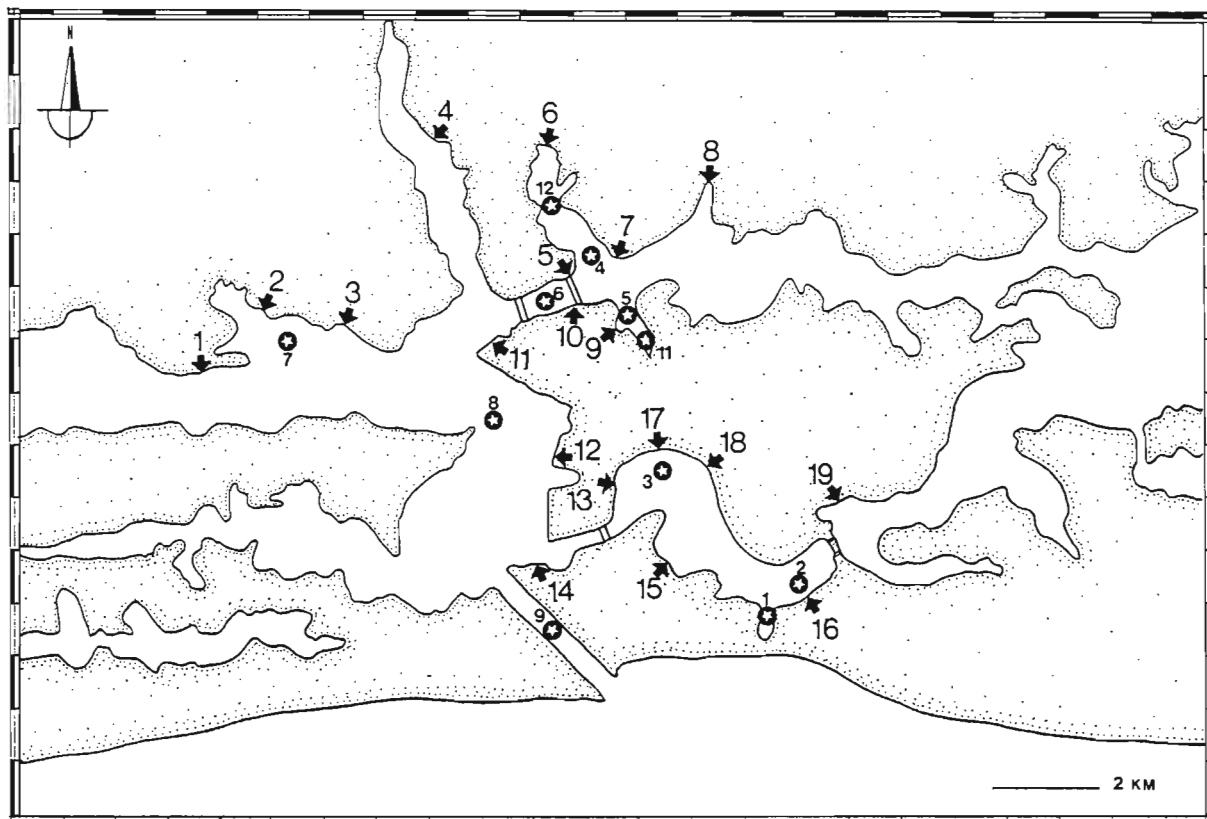


Figure 33: La lagune Ebrié au niveau d'Abidjan avec les stations de prélèvements et les principaux points de rejet suivant (in Marchand et Martin, 1985).

- 1 - Rejets urbains de Yopougon et industriels (Uniwax)
- 2 - Rejets urbains du quartier Séminaire
- 3 - Rejets urbains du quartier Yopougon-santé
- 4 - Rejets urbains du quartier d'Adjamé
- 5 - Point d'aboutissement actuel du 1<sup>er</sup> collecteur principal
- 6 - Rejets urbains du quartier de l'Indénié
- 7 - Rejets urbains du quartier de Blokosso
- 8 - Rejets urbains du quartier de la Riviera
- 9 - Rejets urbains du réseau de Treichville
- 10 - Rejets à dominante industrielle
- 11 - " " "
- 12 - " " "
- 13 - Rejets de l'usine Blohorn
- 14 - Rejets industriels (Rhône-Poulenc, Shell-chimie, Siveng)
- 15 - Rejets industriels (SIR, Palmindustrie)
- 16 - Rejets à dominante industrielle + abattoirs
- 17 - Point d'aboutissement actuel du 2<sup>ème</sup> collecteur principal
- 18 - Rejets à dominante industrielle
- 19 - Rejets urbains et industriels du quartier Koumassi

## V.1. Matériel et méthodes.

### V.1.1. Echantillonnage.

Des échantillons ont été prélevés à onze stations du 27/01 au 27/12/1985. Ces stations étaient situées dans la région lagunaire d'Abidjan (Fig. 33). Les 9 premières ont été suivies 21 fois tandis que pour les stations 11 et 12 l'échantillonnage n'a débuté qu'à partir du 16/04/1985.

Les principaux rejets polluants sont également localisés et précisés figure 33.

Le choix de l'ensemble de ces stations a été principalement conditionné par le fort niveau de contamination préalablement détecté lors d'une étude réalisée en 1984 (Lanusse et Djédjé, résultats non publiés).

La profondeur des stations ainsi que le type d'échantillon prélevé en profondeur sont définis tableau 22.

---

Station	profondeur (m)	type d'échantillon
1	12	(sédiments en suspension)
2	2	" "
3	2	" "
4	6	eau
5	3	(sédiments en suspension)
6	11	eau
7	5	eau
8	12	" "
9	13	" "
11	2	(sédiments en suspension)
12	5	" "

---

Tableau 22 : Profondeur des stations et type d'échantillon prélevé en profondeur.

La complexité du réseau lagunaire et de son hydrodynamique ne permettant pas de connaître précisément le retard de l'onde de marée pénétrant en lagune, les sorties de prélèvement ont dû être programmées entre 10 et 14 heures et ce, indépendamment des heures et coefficients de marée.

Cependant, afin de préciser l'importance des fluctuations saisonnières du degré de contamination, l'évaluation des autres sources de variabilité liée au protocole expérimental a été entreprise. Plusieurs cycles de 24 heures avec prélèvements horaires ont été réalisés à différentes stations et saisons hydroclimatiques. De même, la variabilité liée à l'échantillonnage et celle liée à la méthodologie ont été déterminées respectivement par l'analyse d'échantillons prélevés toutes les minutes (10 fois) à la surface d'un point fixe et par l'analyse répétée (10 fois) d'un même échantillon.

### V.1.2. Méthodologie.

Au cours de ce programme, 2 sortes d'échantillons ont été prélevés: l'eau de surface (environ les 20 premiers centimètres de la colonne d'eau) et l'eau du fond (environ les 50 derniers centimètres) généralement chargée de sédiment en suspension.

En surface, les paramètres suivants ont été analysés : température, salinité, oxygène dissous, pH, turbidité (Disque de Secchi), chlorophylle et phaeopigments, sels nutritifs (NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub>). En profondeur, seuls la température, la salinité, l'oxygène dissous et le pH ont été mesurés.

Aux 2 niveaux, les analyses bactériologiques ont permis de dénombrer les *Escherichia coli*, les entérocoques, les *Clostridium perfringens*, et les *Pseudomonas aeruginosa* (uniquement en surface) ainsi que d'isoler les *Salmonella*, les *Shigella* et les *Vibrio*. Ces 3 dernières analyses ont été effectuées par le laboratoire de microbiologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (Cocody, Abidjan).

#### \* Paramètres physiques:

##### - Mesure de la température.

La température a été mesurée à la surface des eaux et des sédiments à l'aide d'un thermomètre au 1/10 ième de degré ou par immersion d'une sonde de température (YSI).

##### - Mesure de la salinité.

La salinité a été mesurée conjointement avec la température par immersion d'une sonde (YSI).

##### - Mesure de l'oxygène dissous.

L'oxygène dissous a été mesuré à l'aide d'un oxymètre de terrain (YSI) après étalonnage de la température et de la salinité.

##### - Mesure du pH.

Les mesures du pH ont été réalisées à l'aide d'un pH-mètre Knick Portatest.

##### - Mesure de la turbidité.

La turbidité des eaux de surface a été évaluée à l'aide d'un disque de Secchi par la mesure de la profondeur d'immersion entraînant sa disparition.

#### \* Paramètres chimiques et biologiques:

##### - Prélèvement et conservation des échantillons.

Immédiatement après leurs prélèvements réalisés à la bouteille Niskin, les échantillons ont été filtrés sur une soie de 60 µm puis sur un filtre GF/C (Wathman), sauf pour NH<sub>4</sub>. L'eau a été recueillie dans des piluliers en verre rincés avec l'échantillon filtré puis congelée à -30°C avant l'analyse des sels nutritifs.

Pour le dosage des pigments chlorophylliens, le prélèvement et les filtrations ont été effectués de la même manière. Dans ce cas, le filtre a été conservé à +4°C et à l'obscurité. Avant la filtration, quelques millilitres d'une suspension de carbonate de Magnésium à 1 % ont été déposés sur le filtre afin d'améliorer la rétention et de prévenir une altération de la chlorophylle (CNEXO, 1983).

- Analyse des éléments nutritifs minéraux dissous ( NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>, PO<sub>4</sub> ).

Les composés azotés minéraux (ions ammonium, nitrite et nitrate) et les ions phosphates ont été dosés automatiquement avec un autoanalyseur Technicon AA 2 et selon les modalités opératoires préconisées par Strickland et Parsons (1968) :

L'ammoniaque est préalablement oxydé en nitrite par l'hypochlorite en solution alcaline ; le nitrate est réduit en nitrite par passage de l'échantillon au travers d'une colonne contenant un amalgame de Cadmium. Le dosage final des nitrites est basé sur la diazotation de l'acide sulfanilique et la formation d'un complexe coloré avec la N(1-naphtyl) éthylène diamine. L'intensité de la couleur est fonction de la concentration en nitrites et la lecture est réalisée sur un spectrophotomètre à 540 nm. Les concentrations en nitrate ou ammoniaque sont calculées par différence entre la valeur totale (nitrites + nitrates, nitrites + ammoniaque) et la valeur relative aux nitrites seuls. Les phosphates forment un complexe bleu avec le paramolybdate d'ammonium et le tartrate d'antimoine et de potassium. La lecture de l'intensité de la coloration est effectuée au spectrophotomètre à 690 nm. Les résultats obtenus sont rapportés à une courbe étalon réalisée avec une solution standard de phosphate dihydrogéné.

- Dosage de la chlorophylle a et des phaeopigments.

Les pigments chlorophylliens (Chlorophylle a et phaeopigments) ont été dosés en spectrophotométrie selon la méthode de Lorenzen (CNEXO, 1983). Cette méthode permet d'estimer la concentration en phéopigments, produits de dégradation de la chlorophylle.

Les échantillons sont filtrés sur des membranes en fibre de verre (Wathman GF/C), après préfiltration à 60 µm. Le filtre est ensuite broyé (broyeur de Potter) et l'extrait acétonique transvasé dans un tube à centrifuger. Après 10 mn de centrifugation à 4000 tr/mn, les mesures spectrophotométriques du surnageant peuvent être réalisées. L'absorbance de l'extrait pigmentaire est mesurée à 665 nm avant, puis après acidification, soit en hydrolysant toute la chlorophylle en phéopigment.

\* Analyses bactériologiques.

Les eaux de surface et de profondeur ont été prélevées soit directement, soit à l'aide d'une bouteille Niskin abondamment rincée à chaque fois par l'échantillon à analyser. Recueillis dans des flacons stériles, les échantillons ont été analysés ou mis en incubation dans les 6 heures suivant leur prélèvement. Pour les sédiments en suspension, les échantillons ont été traités aux ultra-sons pendant 10 minutes avant leurs analyses.

- Dénombrements des *Escherichia coli*, des entérocoques, des *Clostridium perfringens* et des *Pseudomonas aeruginosa*.

Selon le degré de contamination fécale suspecté, les échantillons ont été soit concentrés par filtration sur des membranes stériles de porosité 0,45 µm et 47 mm de diamètre (Millipore ou Sartorius), soit directement ensemencés après éventuellement une dilution décimale dans un milieu de dilution stérile (tampon phosphate pH 7,2 - Composition en annexe 1).

Les techniques d'ensemencement différant selon le micro-organisme recherché sont résumées tableau 23 .

	Filtration s/membrane	Ensemencement en surface	Incorporation en gélose profonde
<i>E. coli</i>	+	+	
Entérocoques	+	+	
<i>C. perfringens</i>			+
<i>P. aeruginosa</i>	+	+	

Tableau 23 : Techniques utilisées pour l'ensemencement des différentes espèces bactériennes.

+ *Escherichia coli*

Le choix de la méthodologie la plus spécifique n'a pu tenir compte que partiellement des recommandations présentées dans le chapitre III. Pour des raisons de délai d'approvisionnement, la gélose Lactose au desoxycholate (BioMérieux) a été préférée. Les boîtes de Petri ensemencées ont été incubées à 44°C durant une vingtaine d'heures à la suite d'une pré-incubation de 2 h à 37°C. Ce milieu présente une spécificité de 73,5 % vis à vis des *E. coli* (cf: Chap.III). Sur ce milieu, *E. coli* se développe sous la forme caractéristique de colonies rouges de 1 à 2 mm de diamètre. Les colonies suspectes ont été testées à 44°C avec le tube T.M.B (Tryptone Mannitol Broth) de Pugsley et al. (1976).

+ Entérocoques.

La gélose D.coccosel (BioMérieux) a été utilisée pour l'isolement des entérocoques. La température de 44°C a été choisie pour favoriser sélectivement l'incubation des entérocoques (Tosti et Volterra, 1984). Ceux-ci se présentent sous la forme de petites colonies translucides entourées d'un halo noir. Les colonies suspectes ont été testées vis à vis de la catalase qui est généralement absente chez les entérocoques. Une goutte d'eau oxygénée (10 Vol.) est déposée sur la colonie et l'absence d'effervescence instantanée témoigne de l'absence de catalase.

+ Clostridium perfringens.

La recherche de Clostridium perfringens a été effectuée avec la gélose au tryptone, sulfite et néomycine (BioMérieux). Le milieu a été coulé en tubes à raison de 15 ml par tube puis stérilisé par autoclavage (118°C, 15mn).

Avant l'ensemencement, chaque tube a été régénéré au bain-marie pour liquéfier l'agar et pour éliminer l'oxygène dissous. L'agar maintenu en surfusion à 45°C, les tubes ont été ensemencés par l'échantillon dilué ou non. L'incubation a été réalisée à 46°C pendant 24 h. L'apparition de colonies de couleur noire traduit la présence de C. perfringens et cette méthode permet une numération des C. perfringens totaux (cellules végétatives + spores).

+ Pseudomonas aeruginosa.

Pseudomonas aeruginosa a été dénombré sur le milieu mPA-L dont l'intérêt et la spécificité ont été évalués précédemment (Chap.III). Les boîtes de Petri sont incubées à 41,5°C pendant 72 h. Les colonies de couleur marron-verte et présentant une auréole de lyse sont assignées à P. aeruginosa. La caséinolyse a permis la confirmation des colonies suspectes (Brown et Foster, 1970).

- Recherche directe des Escherichia coli entéropathogènes.

La méthode est celle décrite par Munro et Bianchi (1984). Un volume donné d'échantillon d'eau lagunaire est préfiltré sur 60 µm, fixé au formaldéhyde (10%) puis homogénéisé par passage dans un bain à ultra-sons pendant 5 mn. L'échantillon est alors filtré sur une membrane Nucléopore de 0,2 µm de porosité et de 25 mm de diamètre, préalablement coloré en noir par trempage dans un bain d'Irgalan black (Giba Geigy) (2 g/l d'eau à 2 % d'acide acétique). Une meilleure répartition des cellules sur le filtre est obtenue par l'utilisation d'un sous-filtre (Millipore de 0,2 µm de porosité et 25 mm de diamètre). Le filtre est ensuite rincé trois fois avec 5 ml d'eau physiologique tamponnée (Solution concentrée dix fois ; NaCl : 80g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 12H<sub>2</sub>O : 32,926g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1,088g ; H<sub>2</sub>O distillée : 1000 ml).

Après filtration sous vide de l'échantillon, 1 ml de gélatine (2% dans l'eau physiologique tamponnée, hydrolysée à pH 11 et 120°C pendant 15mn, puis neutralisée) est ajouté pour neutraliser les sites ioniques et réduire la "background fluorescence". Après 20 minutes, l'excès de gélatine est éliminé par trois rinçages avec 5 ml d'eau physiologique tamponnée. Deux ml de mélange nonavalent de globulines fluorescences anti-Escherichia coli (Institut Pasteur Production), diluées au 1/20 ième sont ensuite mis en contact avec le filtre pendant 20 à 30 minutes. Trois rinçages sont encore effectués et après un bain du filtre pendant dix minutes dans l'eau physiologique tamponnée, celui-ci est séché puis monté entre lame et lamelle. L'observation se fait alors au microscope sous lumière ultra-violette.

- Isolement des Salmonella, des Shigella, des Aeromonas et des Vibrio. (Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan)

Ces bactéries ont été recherchées par enrichissement des échantillons dans un bouillon au sélénite (Inst. Pasteur) pour les Salmonella, Shigella et Aeromonas et un bouillon peptoné alcalin et salé (1 % de NaCl) pour les Vibrio.

Après une incubation de 24 à 48 h à 30°C, les bouillons d'enrichissement ont été cultivés respectivement sur gélose S.S (Inst. Pasteur) pour les Salmonella, les Shigella et les Aeromonas ou sur le milieu T.C.B.S. (Inst. Pasteur) pour les Vibrio. Cinq colonies caractéristiques pour chaque échantillon et chaque milieu ont été alors identifiées avec les galeries API 20E et sérotypées avec des immunosérums (Inst. Pasteur).

Le diagnostic d'espèces des souches d'Aeromonas a été déterminé d'après les tests suivants (Popoff et Véron, 1976) (Tab. 24) ;

- réaction de Voges-Proskauer,
- croissance en présence de KCN (milieu de Moëller additionné de KCN),
- hydrolyse de l'esculine (gélose à l'esculine incubée 48 h à 37°C),
- fermentation de l'arabinose,
- production de gaz par fermentation du glucose.

Tests	VP	KCN	Esculine	Arabinose	Gaz
<u>A. hydrophila</u>	+	+	+	+	+
<u>A. caviae</u>	-	-	+	+	-
<u>A. sobria</u>	+/-	-	-	-	+/-

Tableau 24 : Principaux caractères permettant de différencier les espèces d'Aeromonas.

\* Interprétation statistique.

- Ajustement à une loi de distribution.

La normalisation des données bactériologiques a été obtenue par transformation logarithmique des concentrations exprimées pour 100 ml:

$$X = \text{Log} ( x + 1 ).$$

Pour les tests de normalité sur papier Probit, les fréquences cumulées  $F(X_i)$ , associées à chaque dénombrement ont été calculées avec la formule suivante (Daget, 1976) :

$$F(X_i) = i/n+1 \times 100 \quad (\text{en } \%)$$

avec  $i$ : rang du dénombrement  $X$  considéré.  
 $n$ : nombre total d'observations.



D'après le tracé anamorphique sur papier Probit, la moyenne et l'écart-type ont pu être alors déterminés :

moyenne = Log X50  
écart-type = Log X84 - Log X50 = Log X50 - Log X16  
avec X84, X50, X16, correspondant aux concentrations bactériennes qui ne sont pas dépassées respectivement dans les 84%, 50% et 16% des cas.

La détermination mathématique de ces paramètres a également été réalisée (Daget, 1976) après résolution de l'équation des Probits :

$$X_i = a \times P(k_i) + b$$
avec  $X_i$  : concentration bactérienne au rang  $i$  (en Log / 100 ml).  
 $P(k_i)$  : valeur Probit du dénombrement  $X_i$ .

La moyenne et l'écart-type sont alors respectivement :  
moyenne =  $5 \times a + b$   
écart-type =  $a$

- Signification des variations saisonnières.

La signification des variations saisonnières a été évaluée par la comparaison des moyennes de chacune des distributions bactériennes calculées à chaque saison (Test de Student, Dagnélie, 1970).

$$t \text{ obs.} = \frac{|m_1 - m_2|}{\sqrt{\frac{N_1 s_1^2 + N_2 s_2^2}{N_1 + N_2 + 2} \left( \frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}}$$

avec  $N_1 + N_2 - 2$  degrés de liberté

L'hypothèse nulle est rejetée au risque  $\alpha$  lorsque  $t \text{ obs.} > t_{1-\alpha}$

Le recours à ce test paramétrique nécessite la normalité des données mais aussi l'égalité des 2 variances. Celle-ci a été appréciée par le test de F.

$$F_{\text{obs.}} = \frac{s^2_{\text{max.}}}{s^2_{\text{min.}}}$$

L'égalité des variances est rejetée au risque  $\alpha$  lorsque  $F_{\text{obs.}} > F$  lu dans la table de distribution F (Dagnélie, 1970).

Pour des populations de variances inégales et lorsque les effectifs sont suffisamment élevés ( $> 30$ ), la méthode de Student-Fisher peut être modifiée en tenant compte du principe de l'erreur-standart (Dagnélie, 1970). Le test bilatéral d'égalité des 2 moyennes se réalise alors en calculant le rapport :

$$U \text{ obs.} = \frac{|m_1 - m_2|}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}}$$

et en le comparant à la valeur  $U_{1-\alpha}$  de la distribution normale réduite. Le rejet de l'hypothèse nulle correspond à la condition  $U \text{ obs.} > U_{1-\alpha}$

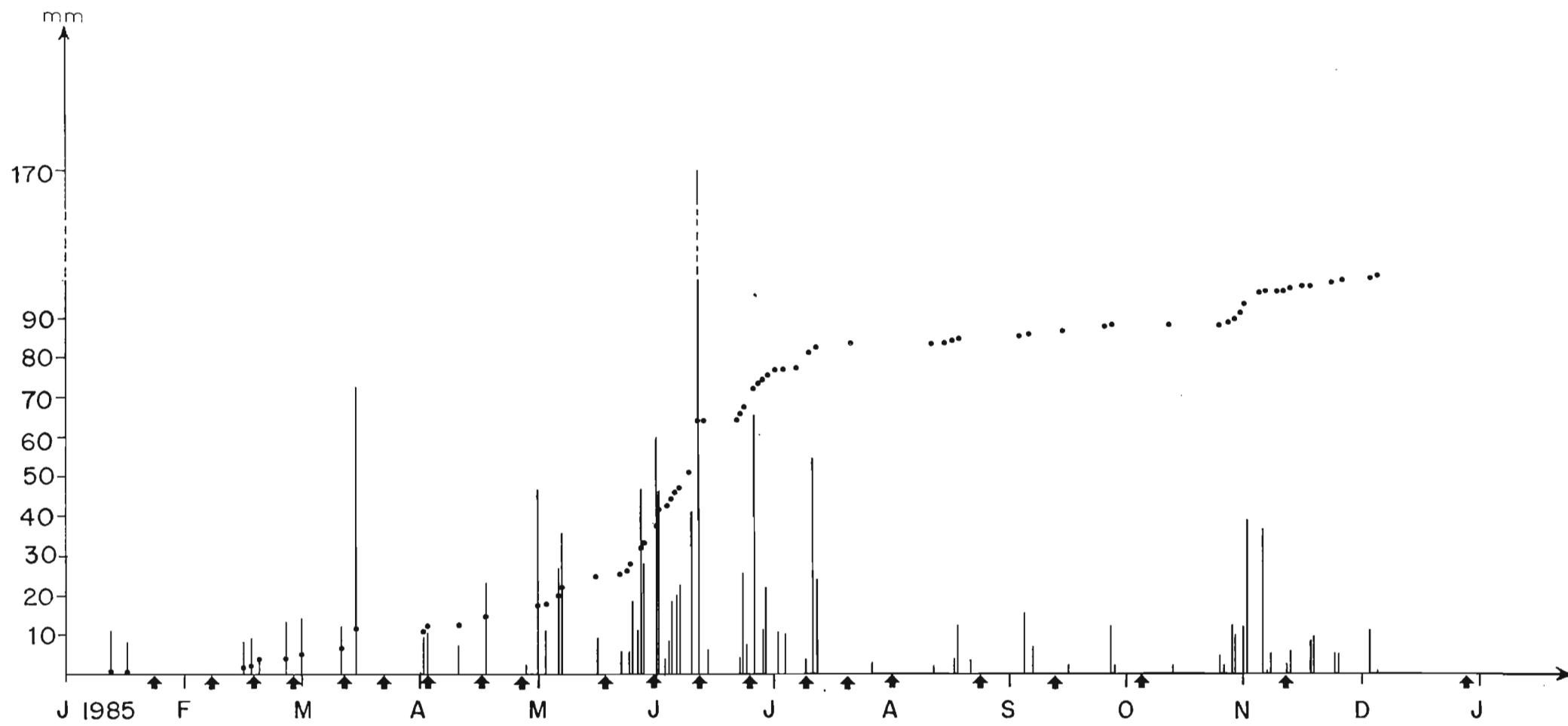


Figure 34 : Pluviométrie journalière en millimètres (mm) et en % cumulé (•) au niveau d'Abidjan durant l'année 1985 (données de l'ASECNA à l'aéroport d'Abidjan). Les flèches correspondent aux campagnes de prélèvement.

## V.2. Résultats hydrobioclimatiques.

### V.2.1. Caractéristiques climatiques et hydrologiques.

Les relevés journaliers pluviométriques de l'année 1985 effectués à l'aéroport d'Abidjan par l'A.S.E.C.N.A. (Agence pour la sécurité de la navigation aérienne en Afrique et à Madagascar) sont représentés figure 34. Au cours de l'année, le total des précipitations s'élève à 1220 mm dont environ 60% sont tombés entre le mois de mai et le mois de juin. La représentation en fréquence cumulée permet de délimiter cette période et de définir schématiquement 3 saisons hydroclimatiques:

- une saison sèche qui s'étale de janvier jusqu' à la mi-mai,
- une saison des pluies qui dure jusqu'à la mi-juillet,
- et enfin une deuxième saison sèche qui compte-tenu de l'hydrologie du bassin lagunaire, correspond aussi à la saison des crues des fleuves de régime tropical.

Cette dernière saison débute avec l'arrivée des eaux charriées par le fleuve Comoé et se poursuit jusqu' à la fin de l'année avec les crues secondaires des rivières guinéennes Agneby et Mé. En 1985, d'après les données hydrologiques du D.R.E.S (Division des ressources en eaux de surface), la moyenne des débits moyens journaliers du fleuve Comoé serait passée de 1,1 mètres-cubes/seconde en mars à 777 m<sup>3</sup>/s en septembre et la crue principale aurait eu lieu à la fin du mois d'août .

Au cours des sorties, l'influence du vent n' est pas apparue primordiale et n'a pas fait l'objet de relevés systématiques. Entre janvier et mars, il souffle un vent sec de secteur N.E (harmattan) mais de manière générale, les vents de secteur S. et S.W sont dominants au niveau d'Abidjan.

Le rayonnement solaire est modéré pour la latitude avec une moyenne quotidienne de 1400 J/cm<sup>2</sup>. Il présente également une évolution saisonnière (Fig. 35). Les valeurs les plus faibles sont observées pendant les mois de juin, juillet, août et septembre.

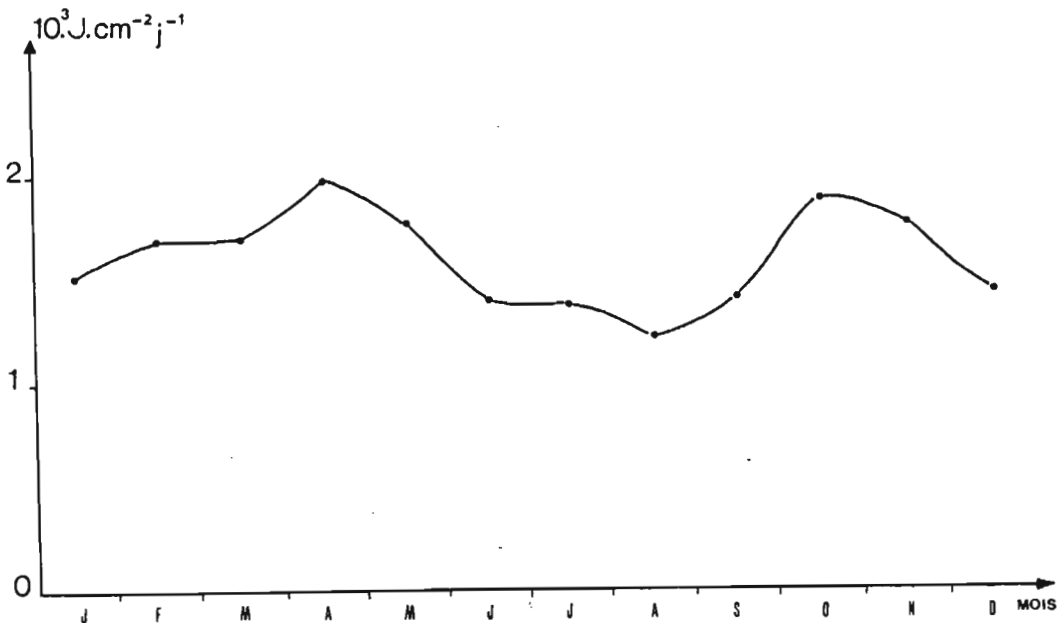


Figure 35 : Evolution saisonnière du rayonnement à Abidjan durant l'année 1985 (données de la station climatique de l'ORSTOM, Adiopodoumé).

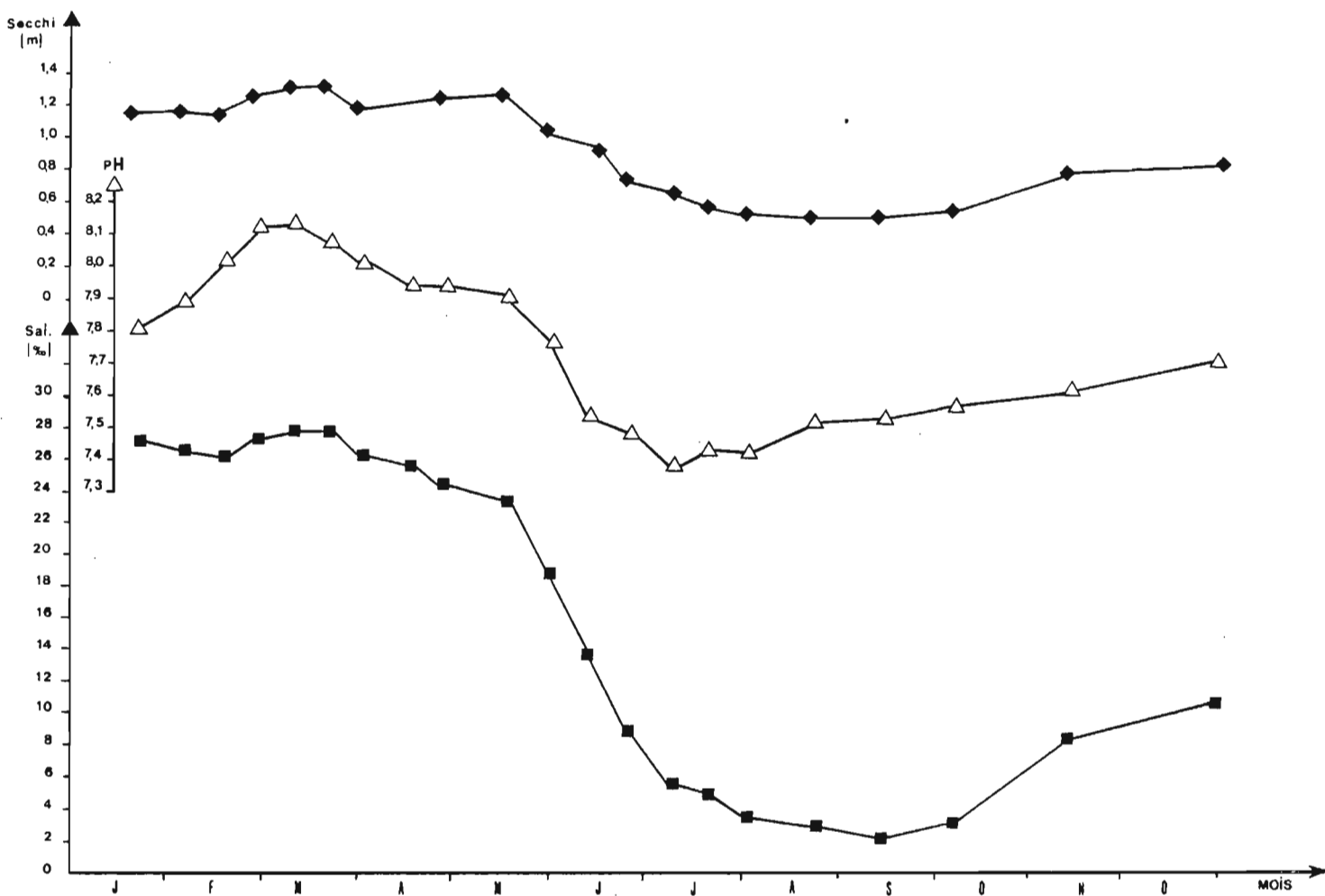


Figure 36 : Evolution saisonnière de la salinité (■—■), du pH (△—△) et de la turbidité (◆—◆) dans les eaux de surface pour l'ensemble des stations de prélèvement. Représentation en moyenne mobile.

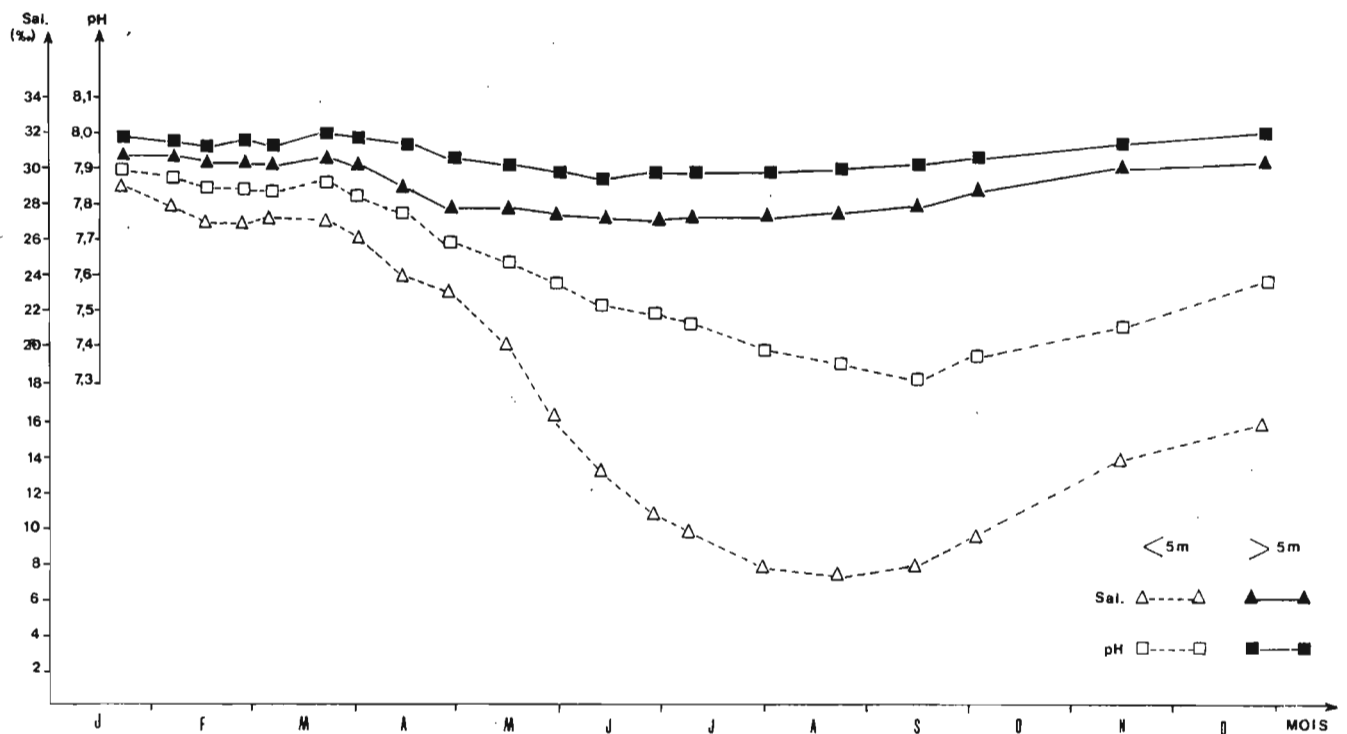


Figure 37 : Evolution saisonnière de la salinité (□--■), du pH (△--▲) dans les eaux prélevées en profondeur (< et > 5 m) pour l'ensemble des stations de prélèvement. Représentation en moyenne mobile.

### V.2.2. Caractéristiques hydrobiologiques.

Au niveau des eaux de surface, la température se maintient tout au long de l'année autour de 29°C tandis que la salinité, le pH et la turbidité (disque de Secchi) fluctuent nettement et corrélativement (Fig. 36). Les évolutions saisonnières de ces paramètres sont représentées en moyenne mobile, soit la moyenne de 3 valeurs consécutives (au temps  $t-1$  ;  $t$  ;  $t+1$ ) qui elles-mêmes, correspondent à la moyenne de l'ensemble des mesures effectuées aux différentes stations échantillonnées à chaque sortie.

Durant la saison sèche, la salinité, le pH et la transparence de l'eau présentent leurs valeurs maximales. A partir de la mi-juin, les valeurs décroissent nettement et se maintiennent à un niveau très faible avec les pluies locales et surtout avec les crues fluviales. A la fin de ces crues, l'influence océanique redevient prédominante et les caractéristiques physico-chimiques des eaux de surface témoignent de nouveau de l'intrusion d'eau marine dans la lagune.

A l'interface eau-sédiment, les caractéristiques physico-chimiques sont principalement conditionnées par la profondeur de la station.

Dans les stations peu profondes (entre 4 et 5 m ; Stations : 2,3,5,7,11,12), les paramètres physico-chimiques des 2 niveaux fluctuent corrélativement, par contre les eaux plus profondes (Stations : 1,4,6,8,9) ont des valeurs relativement constantes au cours de l'année, avec une salinité moyenne de 29 ‰. (Fig. 37).

Les paramètres statistiques des différents facteurs physico-chimiques et biologiques sont regroupés (tableau 25).

Les moyennes des pigments chlorophylliens et des éléments nutritifs minéraux dissous sont élevées et témoignent du fort degré d'eutrophication des eaux de surface. D'autre part, les fortes valeurs des coefficients de variation démontrent l'importance des fluctuations spatio-temporelles.

Pour les eaux de surface et de faible profondeur, les coefficients de variation de la salinité et du pH sont semblables et traduisent le comportement homogène de la colonne d'eau des stations peu profondes. Les moyennes de ces 2 paramètres sont néanmoins légèrement plus fortes dans les eaux du fond.

Par contre, l'hypolimnion des stations plus profondes (Stations: 1,4,6,8,9) présente un comportement totalement différent. La salinité et le pH sont nettement plus élevés et fluctuent beaucoup moins comme l'attestent les coefficients de variation.

Ainsi, durant la saison des crues, la dessalure de surface résultant de l'écoulement des eaux fluviales n'atteint pas les eaux du fond des zones profondes. Cette différence de comportement entre les 2 niveaux est à l'origine d'une halocline saisonnière qui entraîne une stratification par densité de la colonne d'eau.

	Unité	N	m	s	CV %
<b>SURFACE</b>					
Température	*C	207	28,80	1,13	3,90
Salinité	‰	217	15,95	10,65	66,80
Secchi	m	217	0,95	0,50	52,45
pH	-	217	7,75	0,40	5,25
Chlorophylle a.	µg/l	152	32,60	29,75	91,20
Chl.a + pigments	µg/l	152	41,00	35,65	86,80
NO2	µM	76	1,20	1,55	127,50
NO3	µM	76	4,30	5,30	122,60
NH4	µM	76	5,80	18,75	324,20
PO4	µM	76	1,20	1,10	87,20
<b>FOND</b>					
<u>Profondeur ≤ 5m</u>					
Salinité	‰	112	17,80	8,95	50,30
pH	-	112	7,80	0,24	3,07
<u>Profondeur &gt; 5m</u>					
Salinité	‰	105	29,05	2,95	10,15
pH	-	105	7,92	0,19	2,40

**Tableau 25 :** Moyennes (m), écart-types (s) et coefficients de variation (CV) des N analyses bio-physico-chimiques effectuées dans les eaux de surface et de profondeur des 11 stations.

La distribution verticale de la salinité, de la température et de l'oxygène représente cet état stratifié au niveau de la station 1 en baie de Biétri (Fig. 38a ). Dans la tranche des 4 premiers mètres, la salinité reste inférieure à 10‰, avant de croître progressivement jusqu'à 30‰ à 10 m. Corrélativement, ce gradient vertical engendre une faible thermocline et une oxycline nettement plus caractéristique.

Cette dernière est néanmoins plus ou moins marquée selon le degré de confinement de l'hypolimnion et l'importance des apports organiques y sédimentant. En baie de Biétri (St.1), les rejets sont très importants et les écarts entre les teneurs en oxygène des 2 niveaux sont les plus marqués. A partir de 5 mètres, les eaux sont anoxiques et riches en hydrogène sulfuré. Les analyses n'ont pas été effectuées au cours de ce programme mais des concentrations de 12 mM ont pu être mesurées par Caumette (1985).

Comparativement à la baie de Biétri, les stations du chenal central (Stations 6, 8, 9) sont beaucoup plus ouvertes et de ce fait, leur hypolimnion moins confiné n'est pas le siège d'une sulfato-réduction.

Lorsque l'influence marine redevient prédominante, l'halocline disparaît progressivement. L'état de stratification est moins marqué et les mélanges sur toute la colonne d'eau sont à nouveau facilités (période holomictique : Fig. 38b). On observe toujours une oxycline mais l'oxygène diffuse plus profondément, jusqu'à 7 mètres dans la colonne d'eau.

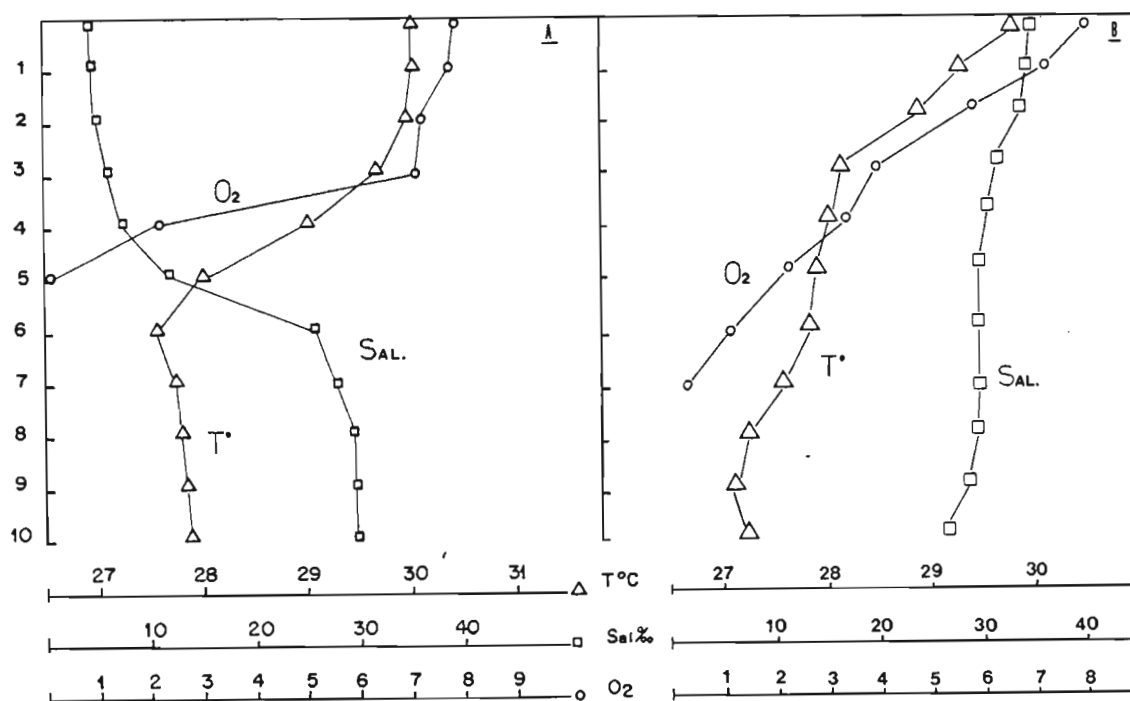


Figure 38 : Caractéristiques physico-chimiques de la colonne d'eau en baie de Biétri pendant la période de stratification (A) et la période holomictique (B).

SURFACE	détermination graphique.						eq. de la droite de régression	détermination mathématique.				
	m	10 <sup>m</sup>	s	C.V %	Int.de confiance (95%)			N	r	m	10 <sup>m</sup>	s
E.coli	3,90	7940	0,75	19	4890 - 14090		X = 0,745 x P(k) + 0,857	34	0,995	3,811	6470	0,745
Entérocoques	2,85	710	1,00	35	325 - 1530		X = 0,933 x P(k) - 1,782	39	0,997	2,884	770	0,933
C.perfringens	2,80	630	0,65	23	380 - 1040		X = 0,653 x P(k) - 0,452	32	0,996	2,815	650	0,653
P.aeruginosa	2,15	140	0,65	30	85 - 235		X = 0,722 x P(k) - 1,509	24	0,989	2,103	125	0,722
FOND												
E.coli	3,50	3160	0,95	27	1500 - 6560		X = 0,915 x P(k) - 1,164	43	0,995	3,410	2570	0,915
Entérocoques	3,25	1780	1,00	30	810 - 3840		X = 1,070 x P(k) - 2,230	43	0,992	3,121	1320	1,070
C.perfringens	3,35	2240	1,15	34	910 - 5430		X = 1,038 x P(k) - 1,944	45	0,994	3,248	1770	1,038

m : moyenne, s : écart- type, CV : coefficient de variation, r : coefficient de régression.

Tableau 26 : Résultats des déterminations graphique et mathématique des paramètres statistiques des différentes distributions bactériennes dénombrées dans les eaux de surface ou du fond.



#### V.4. Résultats bactériologiques.

##### V.4.1. Ajustement à la loi de distribution normale.

Les eaux lagunaires sont fortement contaminées par *Escherichia coli*, les entérocoques, *Clostridium perfringens* et *Pseudomonas aeruginosa* qui ont été dénombrés à chaque sortie. Chacune de ces distributions annuelle a été ajustée à une loi de distribution théorique.

La transformation logarithmique a permis de normaliser la distribution annuelle de chacune des populations bactériennes de l'ensemble des stations comme en témoigne les tracés anamorphiques sur papier Probit de la distribution des *E. coli* en surface et en profondeur (Fig. 39 et 40). Les tracés anamorphiques des autres distributions sont présentés en annexe 2.

La moyenne et l'écart-type de chacune de ces distributions ont pu également être déterminés graphiquement (avec la moyenne =  $\text{Log } X_{50\%}$  et l'écart-type =  $\text{Log } X_{84\%} - \text{Log } X_{50\%}$ ).

Quel que soit le mode de détermination géométrique ou mathématique, moyennes et écart-types sont équivalents et les valeurs des coefficients de corrélation témoignent de la validité de la transformation et du test graphique de normalité (Tab. 26).

Les moyennes annuelles de chacune des distributions bactériennes en surface sont les suivantes ; 7940 UFC/100ml pour *E. coli*, 710 UFC/100ml pour les entérocoques, 630 UFC/100ml pour *C. perfringens*. Pour ces 2 derniers micro-organismes, les moyennes sont nettement plus fortes en profondeur qu'en surface.

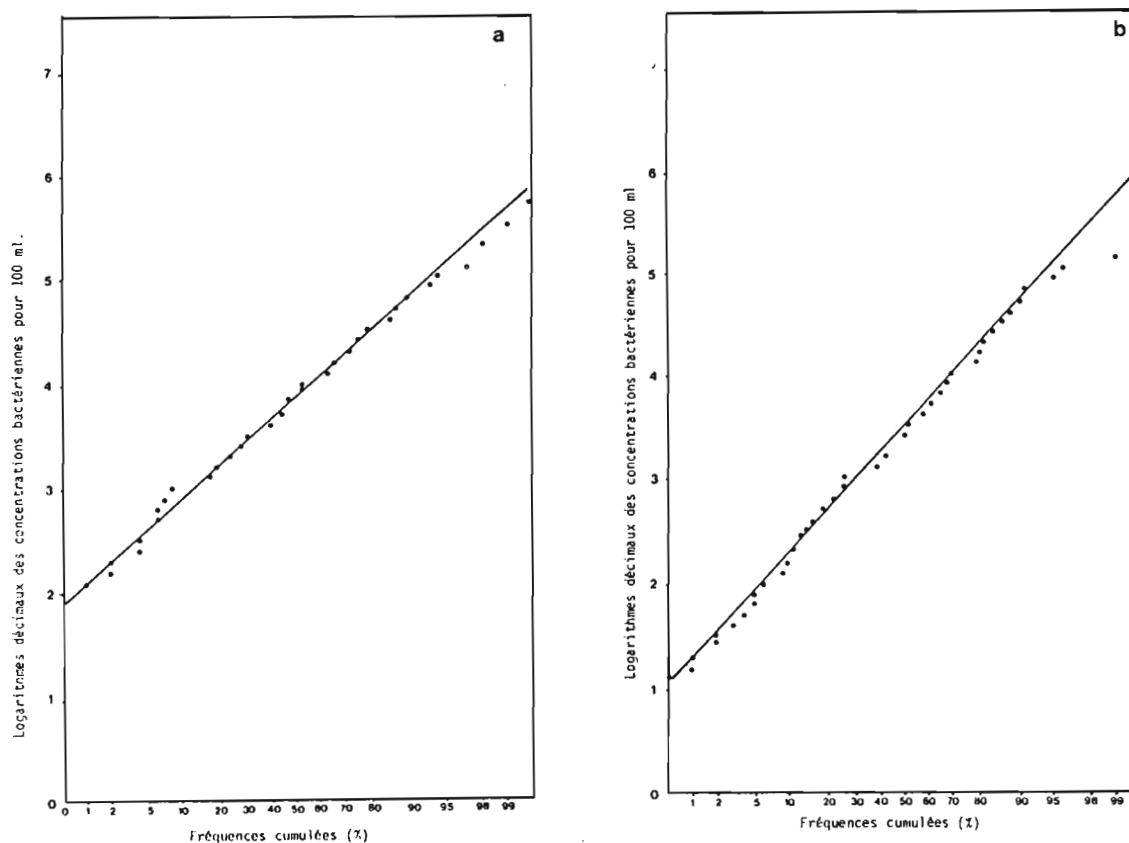


Fig. 39 et 40 : Test de normalité de la distribution des *Escherichia coli* dénombrés dans les eaux de surface (a.) et du fond (b.) représentée sur papier Probit.

SURFACE	N	E. coli	Entérocoques	C. perfringens	N	P. aeruginosa
E. coli	217	1,00			217	
Entérocoques	217	0,83 **	1,00		217	
C. perfringens	217	0,69 **	0,90 **	1,00	217	
P. aeruginosa	100	0,82 **	0,71 **	0,53 **	217	1,00
Salinité	217	-0,35 **	-0,16	-0,08	217	-0,13
pH	213	-0,21 *	-0,11	-0,03	217	-0,12
Turbidité	214	-0,51 **	-0,48 **	-0,36 **	217	-0,38 **
Chlorophylle a	152	0,21 *	0,32 *	-0,31 *	217	0,12
Chl. a + phéopigments	152	0,24 *	0,34 *	-0,32 *	217	0,13
NO2-N	76	0,38 **	0,28 *	0,36 **	76	0,41 **
NO3-N	76	0,36 **	0,25 *	0,36 **	76	0,41 **
NH4-N	76	0,36 **	0,56 **	0,29 **	76	0,31 *
N tot.min. dissous	76	0,45 **	0,60 **	0,37 **	76	0,43 **
PO4-P	76	0,25 *	0,48 **	0,28 *	76	-0,04

\*\* : P < 0,001      \* : P < 0,01

**Tableau 27 :** Matrice de corrélation entre les différentes distributions bactériennes et avec les différents paramètres physico-chimiques et biologiques dans les N échantillons d'eau de surface.

Grâce à ces ajustements à une distribution normale, les matrices de corrélation des 4 bactéries entre elles et avec les différents paramètres physico-chimiques et biologiques ont pu être calculées (Tab. 27 et 28).

Ainsi, pour les 2 niveaux, on observe de très bonnes corrélations entre les différents dénombrements bactériens et ceci précise l'origine commune de cette pollution fécale. En surface, seul *E. coli* est significativement corrélé (corrélation négative) avec la salinité ( $P < 0,001$ ) et le pH ( $P < 0,01$ ). Par contre, les 4 types de bactéries présentent des corrélations significatives avec les valeurs de la turbidité.

Excepté *P. aeruginosa*, les 3 autres bactéries sont corrélées avec les pigments chlorophylliens. Enfin, au niveau des sels nutritifs, on observe des corrélations très significatives entre les 4 types de bactéries et l'azote minéral total dissous ainsi que des différences vis à vis du P04 qui n'est pas du tout corrélé avec *P. aeruginosa*.

En profondeur, les bactéries présentent des corrélations significatives avec la salinité (corrélation négative). Par contre, seuls *E. coli* et les entérocoques sont corrélés avec les valeurs de pH (Tab. 28).

D'autre part, les concentrations des différents types bactériens observées dans les échantillons du fond fluctuent corrélativement ( $P < 0,001$ ) avec leurs concentrations respectives dans les eaux de surface.

FOND		N	E. coli	Entérocoques	C. perfringens
E. coli	Surf.	217	0,69 **	-	-
Entérocoques	Surf.	217	-	0,60 **	-
C. perfringens	Surf.	217	-	0,48 **	0,54 **
E. coli		217	1,00		
Entérocoques		217	0,83 **	1,00	
C. perfringens		217	0,69 **	0,87 **	1,00
Salinité		217	-0,57 **	-0,38 **	-0,26
pH		217	-0,61 **	-0,50 **	-0,42 **

\*\* :  $P < 0,001$  \* :  $P < 0,01$

Tableau 28 : Matrice de corrélation entre les différentes distributions bactériennes et avec les différents paramètres physico-chimiques et biologiques dans les N échantillons d'eau du fond.

Station.	Période.	Nbre de prélèvements	E. coli				Entérocoques				C. perfringens			
			EC50	EC90	s	C.VI	ENT50	ENT90	s	C.VI	CP50	CP90	s	C.VI
1	du 22/01 au 27/12	21	4,00	4,85	0,70	17,5%	2,80	3,70	0,60	21,5%	3,35	4,25	0,85	25,5%
2	du 22/01 au 27/12	21	4,25	5,15	0,70	16,5%	3,65	4,50	0,70	19,0%	2,85	3,70	0,70	24,5%
3	du 22/01 au 27/12	21	4,50	5,50	0,75	16,5%	4,20	5,15	0,70	16,5%	3,40	4,00	0,50	15,0%
4	du 22/01 au 27/12	21	3,80	4,60	0,70	18,5%	3,25	4,00	0,65	31,0%	3,10	3,55	0,45	14,5%
5	du 22/01 au 27/12	21	3,90	4,90	0,70	18,0%	2,70	3,80	0,85	31,5%	2,60	3,25	0,50	19,0%
6	du 22/01 au 27/12	21	3,40	4,35	0,75	22,0%	2,35	3,30	0,75	32,0%	2,40	2,80	0,35	15,0%
7	du 22/01 au 27/12	21	4,10	5,15	0,80	19,5%	2,80	3,75	0,80	28,5%	2,85	3,70	0,65	23,0%
8	du 22/01 au 27/12	21	3,30	4,35	0,85	26,0%	2,10	3,15	0,85	40,5%	2,30	3,05	0,50	22,0%
9	du 22/01 au 27/12	21	3,00	4,00	0,80	26,5%	1,70	2,30	0,50	29,5%	2,05	2,60	0,45	22,0%
11	du 16/04 au 27/12	14	4,50	5,10	0,50	11,0%	3,60	4,85	1,00	28,0%	3,00	4,85	0,65	22,0%
12	du 16/04 au 27/12	14	4,05	4,85	0,60	15,0%	3,40	4,15	0,65	19,0%	2,70	3,50	0,60	22,0%

Tableau 29 : Evaluation statistique de la qualité microbiologique des eaux de surface de chaque station.  
 EC : *E. coli* ; ENT : Entérocoques ; CP : *C. perfringens*

avec XX50 et XX90 : concentrations bactériennes qui ne sont pas dépassées respectivement dans les 50 et 90 % des cas de chaque distribution, s : écart-type, C.V % : coefficient de variation.

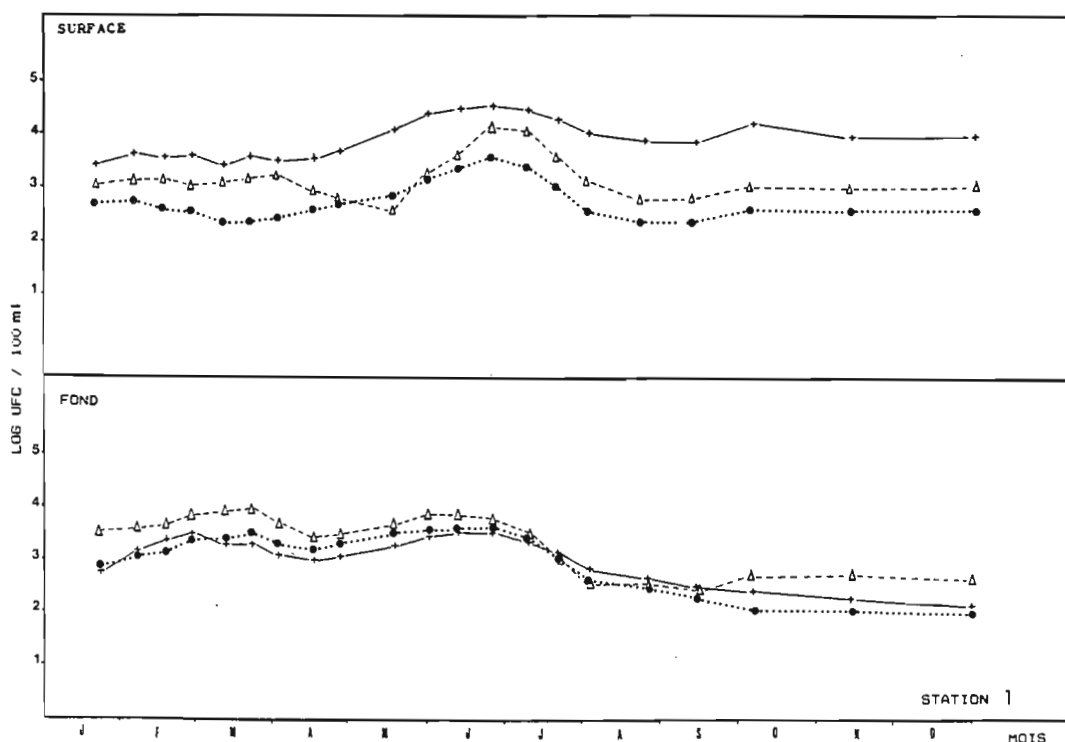


Figure 41 : Evolution saisonnière des concentrations d'*Escherichia coli* (+—+), des entérocoques (●---●) et des *Clostridium perfringens* (△---△) en surface et en profondeur de la station 1. (Représentation en moyenne mobile).

#### V.4.2. Détermination des paramètres statistiques de la qualité microbiologique des eaux de surface de chaque station.

De même que précédemment, la transformation logarithmique a permis d'ajuster chacune des distributions annuelles à une loi de distribution normale. Les paramètres statistiques de la qualité microbiologique définie lors du projet MED.POL phase II (OMS/PNUE, 1983 ; Programme OMS/PNUE de surveillance de la qualité des eaux méditerranéennes) ont été déterminés graphiquement sur papier Probit à chaque station et pour chaque distribution bactérienne dans les eaux de surface

Les concentrations logarithmiques correspondant aux fréquences cumulées X50% et X90% ainsi que les écart-types de ces distributions sont présentées tableau 29.

Ces paramètres précisent à chaque station, le degré de contamination par chacun des micro-organismes. La contamination par *E. coli* s'avère la plus élevée avec des moyennes logarithmiques variant de 3 (station 9) à 4,5 (stations 3 et 11). Globalement, le degré de contamination se révèle conforme à la localisation des stations par rapport aux principaux points de rejet. Les 3 stations échantillonnées dans la baie de Biétri sont ainsi parmi les plus polluées.

Les coefficients de variation des distributions bactériennes à chaque station sont également révélateurs. Ils traduisent la variabilité temporelle de chaque distribution et de ce fait, témoignent de l'état de confinement de chaque station. Les baies fermées de Marcoray et Cocody (St. 11 et 12) ont un renouvellement des eaux très limité et les coefficients de variation des différentes distributions bactériennes sont très faibles.

La moyenne des 3 coefficients de variation (Tab. 29) permet ainsi de classer les stations selon leur degré de confinement. Par ordre croissant de celui-ci, le classement des stations est le suivant :

8 < 9 < 7 < 6 < 5 < 1 < 4 < 2 < 11 < 12 < 3.

Ce classement est également en accord avec la localisation des points de prélèvement et les stations du chenal central (8,9,7,6) sont les plus sensibles aux mouvements des eaux.

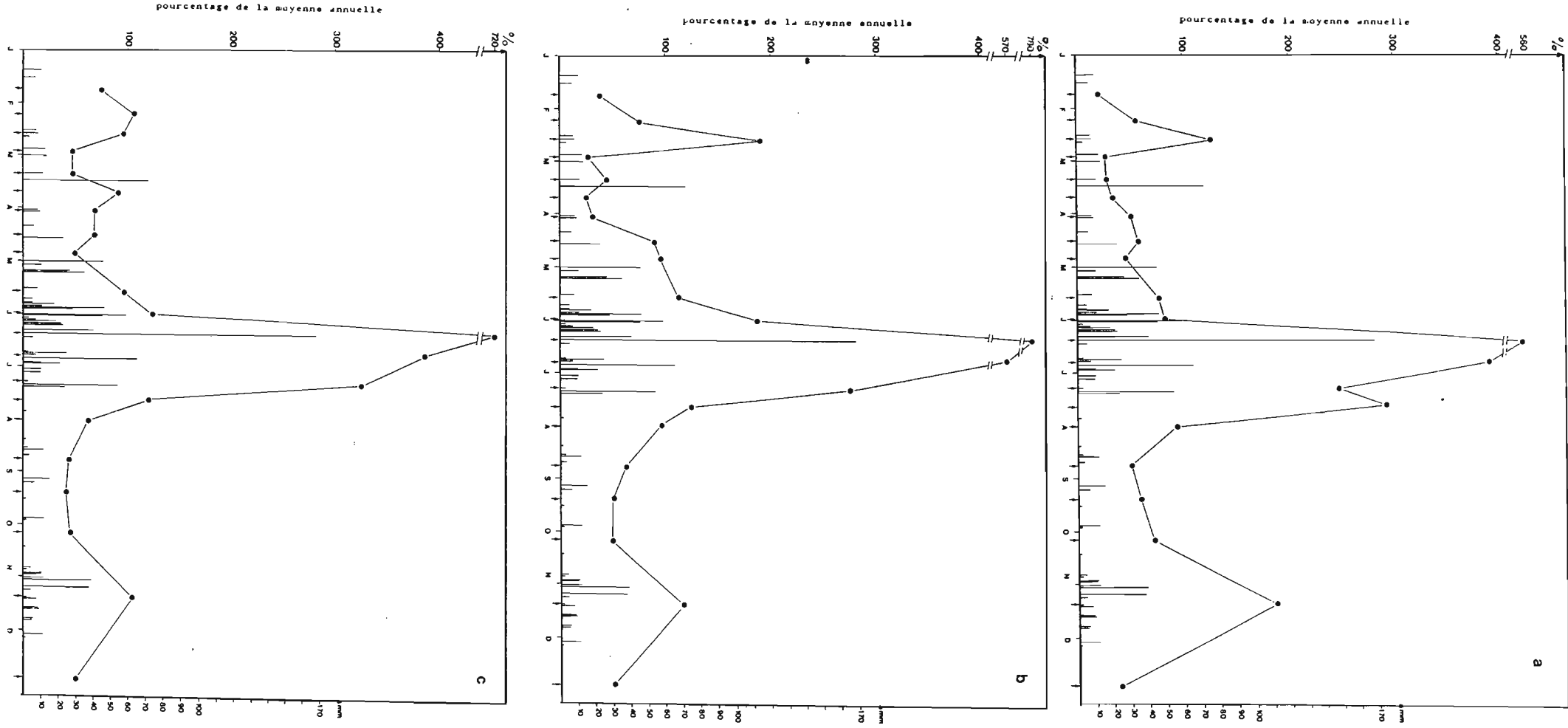
#### V.4.3. Evolution saisonnière de la contamination des eaux lagunaires par *E. coli*, les entérocoques et *C. perfringens*.

La figure 41 représente l'évolution saisonnière des concentrations d'*E. coli*, des entérocoques, et de *C. perfringens* en surface et en profondeur de la station 1. Pour chaque station, cette évolution a été réalisée et les autres figures sont présentées en annexe 3.

Ces représentations correspondent à l'évolution de la moyenne mobile des concentrations respectives de chaque bactérie exprimées en Logarithmes décimaux / 100 ml. La contamination bactérienne d'origine fécale présente des fluctuations temporelles plus ou moins marquées selon les stations et les types bactériens. Globalement, on observe entre le mois de mai et le mois de juillet, soit durant la saison des pluies, une augmentation du degré de contamination.

Figures 42, 43 et 44 :

Evolution saisonnière du niveau de contamination des eaux de surface par *Escherichia coli* (a), les entérocoques (b) et *Clostridium perfringens* (c). (Chaque point correspond à la moyenne des concentrations bactériennes de toutes les stations d'une campagne exprimée en pourcentage de la moyenne annuelle de chaque distribution bactérienne. Chaque barre verticale correspond aux précipitations journalières de la station aéroport d'Adibjan exprimées en mm).



Les figures 42, 43 et 44 représentent respectivement pour chaque bactérie, l'évolution de la moyenne de chaque campagne exprimée en pourcentage de la moyenne annuelle. Ces moyennes ont été déterminées graphiquement après normalisation des données par transformation logarithmique. Les précipitations tombées en 1985 à la station aéroport sont également portées sur les figures.

Ces représentations mettent en évidence l'influence de l'hydroclimat sur les variations du degré de contamination fécale des eaux de surface lagunaires.

Ainsi, on constate que la contamination du milieu est étroitement corrélée à la fréquence et à l'importance des précipitations comme l'attestent les pics de contamination durant la saison des pluies. A ce titre, la sortie du 11/06 est caractéristique puisque faisant suite à de violentes pluies (170 mm), elle révèle des augmentations relatives de 560%, 780% et 720% respectivement pour les E. coli, les entérocoques et C. perfringens.

D'autre part, le degré de pollution fécale diminue très progressivement à partir du mois de juillet et on ne peut à ce niveau qu'invoquer le rôle des crues fluviales qui évacuent en mer les eaux lagunaires polluées.

Cependant, compte tenu de la stratégie d'échantillonnage, il importait de vérifier statistiquement la signification saisonnière de ces variations temporelles.

L'évaluation des autres sources de variabilité a donc été parallèlement entreprise. La variabilité liée à la méthodologie a été appréciée par l'analyse répétée (10 fois) d'un même échantillon. De même, celle liée à la technique de prélèvement a été évaluée par l'analyse de 10 échantillons prélevés successivement en un point fixe. Les prélèvements étant réalisés toutes les minutes et compte tenu de l'écoulement des eaux, on peut considérer que ce coefficient de variation intègre également une composante de la variabilité liée à l'échantillonnage. Cette dernière a enfin été complétée par 3 cycles de 24 heures avec prélèvements horaires réalisés à différentes périodes de l'année.

Les valeurs des moyennes et variances sont présentées dans le tableau 30. Les coefficients de variation ont été calculé et ceux-ci sont légèrement plus élevés pour les entérocoques que pour E. coli. Si la méthodologie et l'échantillonnage ponctuel apparaissent d'importance restreinte, les cycles de 24 heures soulignent l'importance du flux et reflux de la marée dans le mouvement des eaux et l'évaluation du degré de pollution. Les coefficients de variation liés aux cycles de 24 h se révèlent cependant inférieurs à ceux résultant de l'échantillonnage annuel (Tab. 29).

Compte tenu de la signification de ces fluctuations, nous avons tenté d'apprécier l'impact des variations hydroclimatiques sur le niveau de contamination du milieu lagunaire. L'ensemble des sorties a été divisé d'après le découpage saisonnier préalablement définie, soit; du 22/01 au 17/05 (saison sèche), du 30/05 au 01/08 (saison des pluies) et du 23/08 au 27/12 (saison des crues).

Coefficients de variation (%)	<u>Escherichia coli</u>	Entérocoques
* liés à la méthodologie :	1,5	1,8
* liés à l'échantillonnage		
- 10 prélèvements successifs :	1,8	2,2
- cycle de 24 heures :		
date	Coef. de la marée	
09/01	1,00	11,6
16/01	0,50	7,3
24/07	0,75	5,4
		13,9
		-
		9,9

Tableau 30 : Coefficients de variation liés à la méthodologie et à l'échantillonnage des distributions des E. coli et des entérocoques dénombrés dans les eaux de surface.

Périodes :	Saison sèche (22/01-17/05)	Saison des pluies (30/05-01/08)	Saisons des crues (23/08-27/12)
N	96	66	55
<u>E. coli</u>			
EC50	3,55	4,40	3,85
s	0,70	0,85	0,65
int. de confiance (95%)	3,41-3,69	4,19-4,61	3,67-4,03
<u>Entérocoques</u>			
ENT50	2,70	3,20	2,70
s	0,95	0,95	0,70
int. de confiance (95%)	2,51-2,89	2,97-3,43	2,51-2,89
<u>C. perfringens</u>			
CP50	2,75	3,20	2,55
s	0,60	0,80	0,55
int. de confiance (95%)	2,63-2,87	3,00-3,40	2,40-2,70

avec N : nombre d'analyses effectuées durant la période considérée.

s : écart-type

EC50, ENT50 et CP50 : moyennes respectives des E. coli, entérocoques et C. perfringens (Log UFC / 100 ml).

Tableau 31 : Paramètres statistiques des distributions des E. coli, des entérocoques et de C. perfringens aux 3 saisons hydroclimatiques.



Les paramètres statistiques de chacune de ces distributions de surface, toutes stations confondues, sont présentés tableau 31.

Ce découpage saisonnier permet ainsi de quantifier l'influence des variations hydroclimatiques sur le degré de contamination d'origine fécale. Les moyennes respectives des 3 types de bactérie pendant la saison des pluies apparaissent nettement plus fortes que celles des 2 autres périodes qui présentent par ailleurs des différences entre elles. En effet, si la moyenne des entérocoques reste la même pendant la saison sèche et la saison des crues, les moyennes des 2 autres distributions présentent une évolution opposée. La moyenne des E. coli reste plus élevée durant les crues qu'au cours de la saison sèche tandis que l'on observe l'inverse pour la moyenne des C. perfringens.

La signification de ces variations inter-saisonnières a été évaluée par la comparaison des moyennes de chacune des populations. Selon l'égalité des variances (test de F), les moyennes ont été comparées entre elles d'après le test de Student en tenant compte ou non du principe de l'erreur-standart.

Les résultats mettent en évidence une majoration significative du niveau moyen de contamination par les 3 types de bactérie pendant la saison des pluies (Tab. 32). D'après les moyennes géométriques déterminées graphiquement pour chaque période, cette augmentation serait respectivement, de 600%, 200% et 185% pour les dénombrements des E. coli, des entérocoques et des C. perfringens.

Tableau 32 :

	Test :		Egalité des variances		Comp. des moyennes	
	R	F	F	t ou U	t ou U	t ou U
			(P = 0,975)	(P = 0,995)	(P = 0,995)	
Comparaison : Saison sèche / Saison des pluies.						
<u>E. coli</u>	160	1,47	DNS	t = -6,91	DS	
Entérocoques	160	1,00	DNS	t = -3,27	DS	
<u>C. perfringens</u>	160	1,78	DS	U = -4,06	DS	
Comparaison : Saison des pluies / Saison des crues.						
<u>E. coli</u>	119	1,71	DS	U = 4,03	DS	
Entérocoques	119	1,84	DS	U = 3,30	DS	
<u>C. perfringens</u>	119	1,78	DS	U = 5,27	DS	
Comparaison : Saison sèche / Saison des crues.						
<u>E. coli</u>	149	1,16	DNS	t = 2,13	DNS	
Entérocoques	149	1,84	DS	U = 0	DNS	
<u>C. perfringens</u>	149	1,19	DNS	t = 2,13	DNS	

DS : différence significative    DNS : différence non significative  
R : nombre de degré de liberté.

Tests de comparaison des moyennes saisonnières des 3 distributions bactériennes.

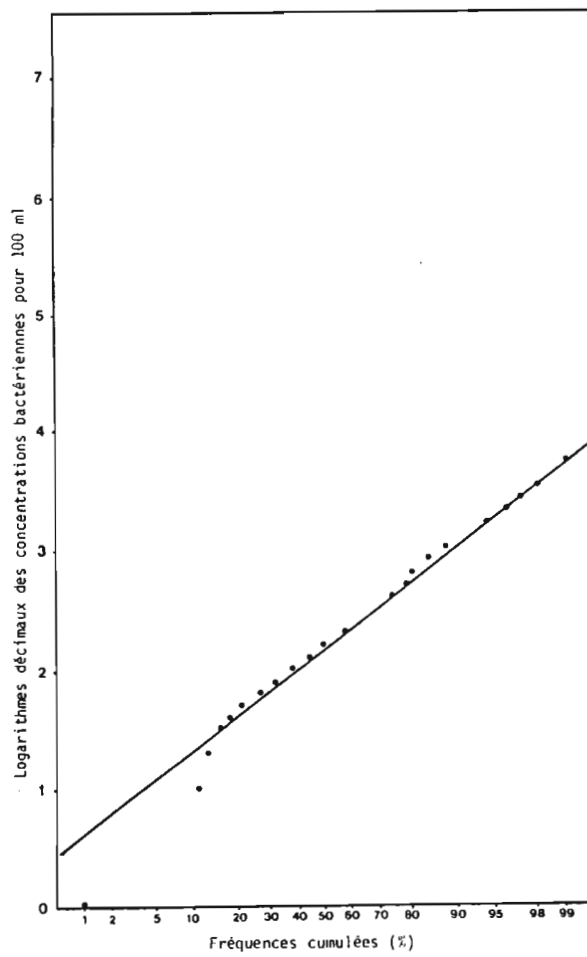


Figure 45 : Test de normalité de la distribution des *Pseudomonas aeruginosa* dénombrés dans les eaux de surface. Représentation en fréquences cumulées sur papier Probit.

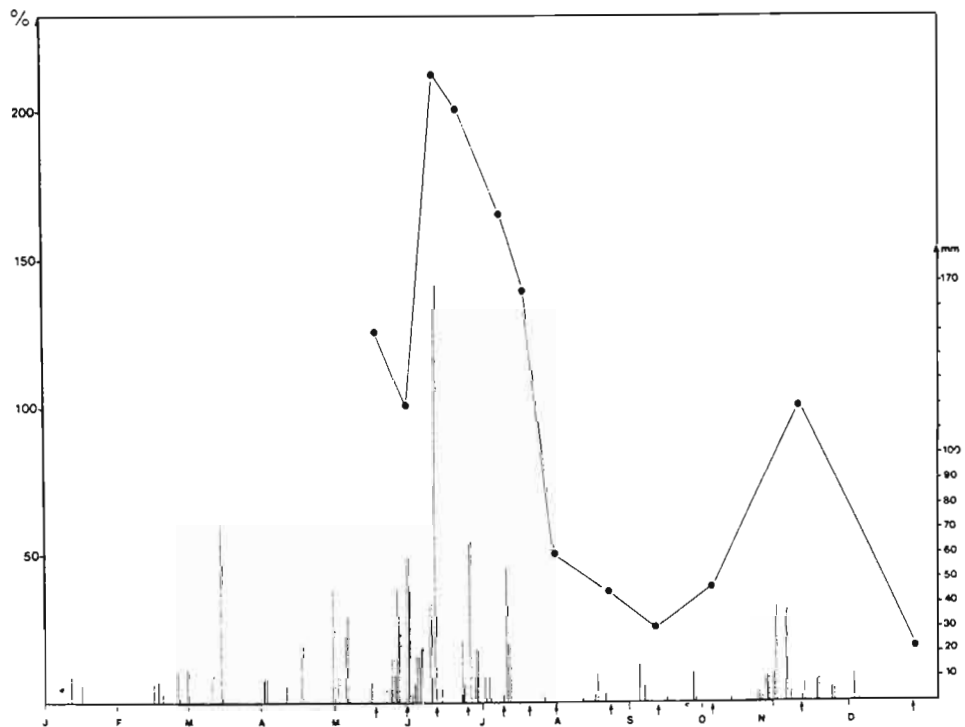


Figure 46 : Evolution saisonnière du niveau de contamination des eaux de surface par *Pseudomonas aeruginosa*. (chaque point correspond à la moyenne des concentrations bactériennes de toutes les stations d'une campagne exprimée en pourcentage de la moyenne annuelle de chaque distribution bactérienne, chaque barre verticale correspond aux précipitations journalières de la station aéroport d'Abidjan exprimées en ml.

A la suite de cet accroissement, l'arrivée des crues fluviales entraîne une diminution significative de la pollution fécale soulignant ainsi son rôle épurateur. Toujours d'après les moyennes géométriques, la crue permettrait d'évacuer respectivement 72%, 68% et 77% du niveau moyen de chaque type de contamination observé pendant la saison des pluies. Par contre, les différences relevées entre la saison sèche et la saison des crues pour les les distributions des E. coli, des entérocoques et des C. perfringens ne s'avèrent pas significatives ( $P = 0,995$ ).

#### V.4.4. Recherche des bactéries pathogènes.

La recherche des Pseudomonas aeruginosa dans les eaux de surface s'est avérée positive pour la quasi-totalité des échantillons analysés mais cette bactérie a pu être dénombrée systématiquement qu'à partir du mois de mai. L'ajustement des concentrations à une loi de distribution normale (Fig. 45) a permis de calculer une moyenne de 140 UFC/ 100ml.

Comme pour les bio-indicateurs fécaux, l'évolution de la moyenne de chaque campagne exprimée en pourcentage de la moyenne annuelle témoigne de la corrélation positive entre la distribution des P. aeruginosa et les données hydrobioclimatiques (Fig. 46).

Aucune entérobactérie pathogène n'a pu être mise en évidence avec la méthodologie utilisée. La recherche des Escherichia coli entéropathogènes par la technique d'immuno-fluorescence s'est avérée infructueuse. Cependant, les fortes concentrations de matières en suspension ont colmaté très rapidement les membranes Nuclepore (0,2  $\mu$ m). Le tableau 33 regroupe les volumes filtrés les plus importants avec respectivement les valeurs de turbidité, les teneurs en pigments chlorophylliens et les concentrations d'E. coli cultivant sur gélose désoxycholate lactose.

La recherche des Salmonella et Shigella s'est également révélée négative et ce, même dans les stations les plus polluées.

Station	Date	Vol. (ml)	Pig. chlorophylliens (ug / ml)	Secchi (m)	<u>E. coli</u> (UFC / ml)	ECEP
8	01/08	9	18,6	0,9	15	0
6	21/03	9	19,7	1,5	31	0
7	08/07	8	9,7	0,7	550	0
4	26/04	6	47,1	1,2	12	0
8	11/11	6	31,4	1,0	32	0
7	26/04	6	42,5	0,8	100	0
4	21/03	6	46,4	1,1	8	0

Tableau 33 : Caractéristiques d'échantillons d'eau de surface filtrée pour la recherche d'Escherichia coli entéropathogènes en immuno-fluorescence.

Station	1		2		3		4		5		6		7		8		9	
	surf.	fond	surf.	fond	surf.	fond	surf.	fond	surf.	fond	surf.	fond	surf.	fond	surf.	fond	surf.	fond
22/01	V.ph	-	V.nag+V.ph	V.ph+V.alg	V.ph	-	V.nag+V.ph	-	-	-	V.ph	-	V.ph	V.alg	-	V.ph	-	
07/02	-	-	-	-	-	-	-	-	V.nag+V.alg	-	-	-	-	-	-	-	-	
18/02	-	V.ph+V.alg	-	-	-	-	V.ph+V.alg	-	V.alg+A.sob	V.ph	V.nag	-	-	-	-	-	-	
28/02	-	V.ph+V.alg	V.alg	V.alg	-	-	-	V.ph	V.nag	V.ph+V.nag	-	-	V.nag	V.alg	-	V.alg	V.alg	V.ph
11/03	-	V.ph	-	V.alg	-	V.ph	-	-	-	-	V.ph	-	V.ph	V.ph	-	-	V.ph	-
21/03	A.sob	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A.cav	A.cav	-	-	-	-
02/04	-	V.ph	A.cav	V.ph	V.alg	-	A.sob	V.alg	A.cav	V.alg	V.alg	-	V.alg	V.ph	V.alg	V.alg	V.alg	-
16/04	-	V.ph	-	-	A.sob	V.ph	-	-	-	-	A.hyd	V.ph	-	-	-	-	-	-
26/04	-	-	A.sob	-	A.cav	-	A.cav	A.cav	A.cav	A.cav	A.hyd	V.ph	-	-	-	-	-	-
17/05	A.cav	-	A.sob	-	-	V.ph	A.cav	-	A.hyd	-	A.sob	-	-	-	-	-	-	-
30/05	-	V.ph	-	V.alg	-	-	-	V.ph+V.alg	V.ph	-	V.ph+V.alg	V.ph	A.hyd	-	-	-	A.cav	-
11/06	V.alg	V.ph	V.ph+V.alg	V.ph	V.ph	-	-	V.ph	A.hyd	V.ph	-	-	-	-	-	-	V.ph	-
24/06	-	V.ph	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V.alg	V.ph+A.cav	A.sob	V.ph	-	V.ph
08/07	-	-	-	A.cav	V.ph+V.alg	-	A.hyd	V.ph	V.alg	-	V.ph	-	-	-	V.ph+A.hyd	V.ph	-	-
19/07	-	V.alg	-	V.ph	-	A.hyd	A.cav	-	-	-	V.ph	-	-	-	-	-	A.sob	-
01/08	-	V.ph	A.hyd	-	V.ph	A.hyd	-	A.cav	V.alg	-	-	-	-	-	V.ph	-	-	-
23/08	-	-	-	A.hyd	-	-	-	A.hyd	-	A.sob+A.hyd	-	A.hyd	-	-	-	-	-	-
12/09	A.cav	A.cav	-	A.hyd	-	-	-	V.alg	A.cav	-	-	A.hyd	-	-	-	-	A.cav	A.sob
04/10	-	-	A.sob	-	-	-	-	-	-	-	V.ph	A.sob	-	V.ph	-	-	-	-
11/11	A.cav	-	-	A.hyd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27/12	V.ph	-	-	A.hyd	-	-	A.cav	-	A.cav	-	-	A.cav	A.sob	-	A.hyd	A.sob	-	-

V.ph : *Vibrio parahaemolyticus* V.alg : *V. alginolyticus* V.nag : *V. non agglutinabile* A.hyd : *Aeromonas hydrophila* A.sob : *A. sobria* A.cav : *A. caviae*

**Tableau 34 : Isolement des différentes espèces de *Vibrio* et d'*Aeromonas* présentes à chaque campagne dans les échantillons de surface ou de fond de chaque station.**

<i>V. parahaemolyticus</i>	Surface	Fond	Total	<i>A. caviae</i>	Surface	Fond	Total
22/01-17/05	7,7	24,1	16,1	22/01-17/05	8,9	3,3	6,1
30/05-27/12	12,1	21,1	14,6	30/05-27/12	8,1	5,1	6,6
Total	10,1	20,6		Total	8,4	4,2	

<i>V. alginolyticus</i>	Surface	Fond	Total	<i>A. sobria</i>	Surface	Fond	Total
22/01-17/05	12,2	11,1	11,7	22/01-17/05	7,7	0	3,9
30/05-27/12	7,1	4,4	5,6	30/05-27/12	5,1	3,1	4,1
Total	9,5	7,4		Total	6,3	1,6	

<i>V. nag</i>	Surface	Fond	Total	<i>A. hydrophila</i>	Surface	Fond	Total
22/01-17/05	3,3	4,4	3,9	22/01-17/05	3,3	0	1,7
30/05-27/12	0	0	0	30/05-27/12	6,1	10,1	8,1
Total	1,6	2,1		Total	4,8	5,3	

<i>Vibrio sp.</i>	Surface	Fond	Total	<i>Aeromonas sp.</i>	Surface	Fond	Total
22/01-17/05	23,3	40	31,1	22/01-17/05	20,1	3,3	11,6
30/05-27/12	19,1	21,1	20,2	30/05-27/12	19,1	18,1	18,7
Total	21,2	30,1		Total	19,6	11,1	

**Tableau 35 : Fréquences d'isolement des différentes espèces de *Vibrio* et d'*Aeromonas* isolées dans les eaux de surface ou du fond et calculées pour la saison sèche (22/01-17/05) N = 90 et pour la saison des pluies et des crues (30/05-27/12) N = 99. N: nombre total d'échantillons analysés à chaque période.**

Au niveau des Vibrionaceae, l'ensemble des résultats est présenté dans le tableau 34. Au total, 155 Vibrio et Aeromonas ont été dénombrés soit 58 V. parahaemolyticus, 32 V. alginolyticus, 24 A. caviae, 19 A. hydrophila et 15 A. sobria. Vibrio cholerae biotype El Tor sérotype O:1 n'a pas pu être mis en évidence mais 7 V. cholerae nag, non agglutinable avec l'anti-sérum polyvalent O:1 (Inst. Pasteur). Globalement, on note une légère prédominance (62%) du nombre de Vibrio spp.

Les fréquences d'isolement de chaque espèce sont regroupées selon le niveau et la période de prélèvement (Tab. 35); chaque fréquence correspond au pourcentage d'échantillons positifs par rapport au nombre total d'échantillons analysés. Compte tenu de l'échantillonnage réduit durant la saison des crues, les résultats obtenues au cours de cette période ont été ajoutés à ceux de la saison des pluies. Ainsi, 2 saisons ont été définies; la période sèche s'étalant du 22/01 au 30/05/1985 et celle des pluies et des crues du 30/05 au 27/12/1985. Ce regroupement permet de faire les constatations suivantes:

Au cours de la saison sèche, V. parahaemolyticus est 3 fois plus fréquemment isolé dans les eaux de fond qu'en surface. En baie de Biétri, on retrouve cette bactérie 24 fois (sur 58 isoléments) dont 17 fois dans les eaux du fond anoxiques de cette baie. Inversement, Aeromonas hydrophila et A. sobria ne sont isolés que dans les eaux de surface.

Cinq fois plus d'A. hydrophila sont dénombrés durant la deuxième période. En surface, c'est plus précisément de la mi-avril à la mi-juillet (soit au cours de la saison des pluies) qu'est isolée la majorité (7 sur 9) de ces bactéries. En profondeur, on retrouve une contamination des eaux mais avec un décalage de 1 mois puisque 80% des souches sont isolées entre le 19/07 et le 12/09. Une concentration spatiale plus marquée au niveau des sédiments en suspension de la baie de Biétri est observée puisque 6 Aeromonas hydrophila sur les 10 isolés proviennent des stations 2 et 3.

A l'opposé et ce, quel que soit le niveau de prélèvement, les V. alginolyticus sont 2 fois plus présents durant la saison sèche. Par contre, Vibrio cholerae non agglutinable est uniquement rencontré durant les 2 premiers mois de l'année. Enfin, les isoléments de V. parahaemolyticus, d'A. sobria et d'A. caviae sont réparties indifféremment tout au long de l'année. D'après le tableau 34, 43% des A. caviae et 50% des A. sobria sont cependant isolés entre le mois d'avril et le mois de mai.

Quelle que soit la saison et aux 2 niveaux, l'isolement des Vibrio est plus fréquent que celui des Aeromonas. Cette prédominance apparaît plus marquée durant la saison sèche (près de 3 fois plus de Vibrio que d'Aeromonas) et ce grâce à la fréquence d'isolement des Vibrio en profondeur 12 fois plus importante que celle des Aeromonas au même niveau.

Pour préciser la signification de ces variations spatio-temporelles, les 155 isoléments ont été regroupés en fonction de la salinité des échantillons. Les regroupements des dénombrements avec d'autres caractéristiques hydrobiologiques n'a pas été réalisés par manque de données respectives.

Trois plages de salinité ont été arbitrairement choisies; la plage de salinité < 11%, celle de salinité de 11 à 22% compris et celle de salinité > à 34%. Les fréquences d'isolement de chaque espèce et pour chaque plage de salinité ont été calculées.

## SURFACE

Plage de salinité	X < 11%	11% < X < 22%	X > 22%	Nt
Nombre total d'échantillons :	76	24	89	189
Nombre d'échantillons positifs et (fréquence d'isolement)				Nti+
Espèces :				
<i>Vibrio cholerae</i> NAG	0	0	3 (3,7 %)	3
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	6 (7,9 %)	5 (20,8 %)	8 (9,0 %)	19
<i>Vibrio alginolyticus</i>	4 (5,3 %)	3 (12,5 %)	11 (12,4 %)	18
<i>Aeromonas hydrophila</i>	4 (5,3 %)	3 (12,5 %)	2 (2,2 %)	9
<i>Aeromonas caviae</i>	6 (7,9 %)	2 (8,3 %)	8 (8,9 %)	16
<i>Aeromonas sobria</i>	4 (5,3 %)	3 (12,5 %)	5 (5,6 %)	12

Nt : Nombre total d'échantillons analysés    Nti+ : Nombre total d'échantillons positifs.

Tableau 36 : Fréquence d'isolement des différentes espèces de *Vibrionaceae* dans les eaux de surface regroupées en fonction de la salinité.

## FOND

Plage de salinité	X < 11%	11% < X < 22%	X > 22%	Nt
Nombre total d'échantillons :	29	21	139	189
Nombre d'échantillons positifs et (fréquence d'isolement)				Nti+
Espèces :				
<i>Vibrio cholerae</i> NAG	0	0	4 (2,8 %)	4
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1 (3,4 %)	6 (28,6 %)	32 (15,8 %)	39
<i>Vibrio alginolyticus</i>	0	0	14 (10,1 %)	14
<i>Aeromonas hydrophila</i>	7 (24,1 %)	0	3 (2,1 %)	10
<i>Aeromonas caviae</i>	1 (3,4 %)	1 (4,8 %)	6 (4,3 %)	8
<i>Aeromonas sobria</i>	1 (3,4 %)	0	2 (1,4 %)	3

Nt : Nombre total d'échantillons analysés    Nti+ : Nombre total d'échantillons positifs.

Tableau 37 : Fréquence d'isolement des différentes espèces de *Vibrionaceae* dans les eaux du fond regroupées en fonction de la salinité.

Dans les eaux de surface (Tab. 36), la présence la plus fréquente est celle du *V. parahaemolyticus* qui est isolé avec une fréquence de 20,8 % dans les échantillons de salinité comprise entre 11 et 22%. Cette valeur et celle du *V. cholerae* qui n'est isolé que dans des échantillons de salinité > à 22 %, sont les plus caractéristiques de la ségrégation liée à la salinité. On retrouve la même influence de la salinité dans la distribution du *V. alginolyticus* qui est nettement plus isolé dans les eaux de salinité > 11%. Ces données traduisent le caractère halophile et l'origine probablement marine de ces espèces. *Aeromonas hydrophila* est préférentiellement isolé dans des eaux de salinité comprise entre 11 et 22% et présente la plus faible fréquence pour une salinité > 22%. Les fréquences d'isolement des 2 autres *Aeromonas* n'apparaît pas directement conditionnées par les valeurs de salinité.

La ségrégation des différentes espèces est par contre plus beaucoup marquée dans les eaux du fond (Tab. 37). On retrouve les mêmes prévalences que dans les eaux de surface; *V. cholerae* et *V. alginolyticus* sont exclusivement isolés dans des eaux de salinité > à 22 %, avec des fréquences respectivement de 2,8 et 10,1 %. L'halophilie du *V. parahaemolyticus* est également confirmée; cette espèce présente entre 11 et 22 % une fréquence de 28,6 %, soit la plus forte valeur observée les 2 niveaux confondues. A l'inverse des *Vibrio*, *A. hydrophila* est beaucoup plus fréquemment (17,5%) isolé dans des eaux de salinité < à 11 %. Comme dans les eaux de surface, la salinité ne semble pas affecter la distribution des *A. caviae* et *A. sobria*. Hormis celles du *V. parahaemolyticus*, les fréquences d'isolement des différentes espèces sont nettement plus faibles dans eaux prélevées en profondeur que dans les eaux de surface.

En regroupant les résultats des 2 niveaux de prélèvement (Tab. 38), les fréquences calculées confirment l'influence de la salinité dans la ségrégation des *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. alginolyticus* ainsi qui sont plus fréquemment isolés dans des eaux salées ainsi que dans celle des *A. hydrophila*, plus fréquemment isolés dans les eaux douces. *A. caviae* et *A. sobria* n'ont pas de plages d'isolement préférentielles.

Plage de salinité	X < 11%	11% < X < 22%	X > 22%	Nt
Nombre total d'échantillons :	105	45	228	378
	Nombre d'échantillons positifs et (fréquence d'isolement)			Nti+
Espèces :				
<i>Vibrio cholerae</i> NAG	0	0	7 (3,1 %)	7
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	7 (6,7 %)	11 (24,5 %)	40 (17,5 %)	58
<i>Vibrio alginolyticus</i>	4 (3,8 %)	3 (6,7 %)	25 (11,0 %)	32
<i>Aeromonas hydrophila</i>	11 (10,5 %)	3 (6,7 %)	5 (2,2 %)	19
<i>Aeromonas caviae</i>	7 (6,7 %)	3 (6,7 %)	14 (6,1 %)	24
<i>Aeromonas sobria</i>	5 (4,8 %)	3 (6,7 %)	7 (3,1 %)	15

Nt : Nombre total d'échantillons analysés    Nti+ : Nombre total d'échantillons positifs.

Tableau 38 : Fréquence d'isolement des différentes espèces de *Vibrionaceae* dans les eaux de surface et du fond regroupées en fonction de la salinité.

V.4. Discussion.

La zone estuarienne de la lagune Ebrié subit le développement de la ville d'Abidjan. La pression de l'activité humaine y est particulièrement intense puisque la majorité des rejets urbains aboutissent dans la lagune. La forte pollution organique a pour conséquence une nette eutrophisation dont les caractéristiques ont été déterminées dans de nombreuses études antérieures (Dufour et Maurer, 1979 ; Pagès et al., 1980). Associée à ces rejets eutrophisants, la contamination microbienne d'origine fécale s'avère très élevée.

Les moyennes annuelles des distributions d'*Escherichia coli*, des entérocoques et de *Clostridium perfringens* sont respectivement de 7940, 710 et 630 UFC/100 ml en surface et de 3160, 1780 et 2240 UFC/100ml en profondeur (Tab. 26). Ces distributions sont significativement corrélées avec les éléments minéraux dissous et les coefficients de corrélation entre ces espèces bactériennes traduisent l'association de ces contaminants dans les rejets anthropiques.

Les distributions annuelles des *E. coli* et des entérocoques sont très étroitement corrélés et leur recherche simultanée peut être considérée comme redondante. Les études de survie parallèlement entreprises *in vitro* ont mis en évidence l'inadéquation de *S. faecalis* à témoigner de la présence de bactéries pathogènes telles que *Salmonella typhi* ou *Shigella dysenteriae*. Compte tenu des caractéristiques de survie de *S. faecalis*, espèce-type des entérocoques, la recherche de ce bio-indicateur ne semble pas convenir à l'évaluation de la qualité microbiologique des eaux lagunaires ivoiriennes.

Les rapports entre les différentes moyennes mettent en évidence de nettes différences entre les distributions bactériennes et les 2 niveaux de prélèvement (Tab. 39).

Ainsi, les eaux prélevées en surface ou en profondeur sont beaucoup plus contaminées par *E. coli* que par les autres bactéries. En surface, cette prédominance est très marquée avec une moyenne annuelle des *E. coli* respectivement 11,2 et 12,6 fois plus forte que celles des entérocoques et les *C. perfringens*. Les rapports *E. coli*/Entérocoques sont supérieurs à 4 et confirment l'origine humaine de la contamination (Geldreich et Kenner, 1969).

Surface :						Fond :				
2	1	EC	ENT	CP	PA	2	1	EC	ENT	CP
	EC	1,0					EC	1,0		
	ENT	11,2	1,0				ENT	1,8	1,0	
	CP	12,6	1,1	1,0			CP	1,4	0,8	1,0
	PA	56,7	5,1	4,5	1,0					

Tab. 39 : Rapports (1/2) des moyennes des différentes distributions bactériennes calculées pour l'ensemble des prélèvements de surface et de profondeur.



Cette prédominance peut aussi être interprétée par les différences d'aptitudes de survie observées précédemment; globalement, les eaux de surface présenteraient des caractéristiques hydrobiologiques plus favorables aux *E. coli* qu'aux autres bactéries. Cette remarque est confirmée par la valeurs du rapport Surface/Fond de chacune des distributions qui sont respectivement de 2,51, 0,40 et 0,28 pour *E. coli*, les entérocoques et *C. perfringens*. Cette hypothèse apparait en effet plus probable que celles suspectant une sédimentation spécifique ou encore une vitalité accrue des entérocoques et des *Clostridium* dans les eaux du fond qui s'opposerait d'ailleurs aux résultats du chapitre IV.

Ce suivi annuel a permis de mettre en évidence l'influence des variations hydroclimatiques sur l'état de pollution bactériologique des eaux lagunaires dans la zone estuarienne.

Le climat de la Côte d'Ivoire est conditionné par le déplacement saisonnier de la convergence inter-tropicale et pour cette étude au niveau d'Abidjan, l'année 1985 a été divisée en 3 saisons hydroclimatiques ; la saison sèche, la saison des pluies et la saison des crues.

Le rayonnement solaire présente une évolution saisonnière. Les valeurs minimales du mois d'août résulteraient de la couverture nuageuse plus importante durant ce mois tandis que les faibles valeurs de janvier et décembre seraient plutôt imputables à la hauteur minimale du soleil autour du solstice d'hiver et aux poussières transportées par le vent du nord har-mattan (in Dufour, 1982).

Durant la saison sèche, l'intrusion océanique est maximale et Abidjan baigne alors dans des eaux marines. A partir du mois de mai, soit le début de la saison des pluies, les eaux lagunaires de surface deviennent plus douces, moins alcalines et beaucoup plus turbides. Progressivement, ces variations s'intensifient et l'influence marine est alors contrebalancée par les crues, principalement celle du fleuve Comoé.

A cette alternance saisonnière des influences marine et continentale, se superposent des variations demi-diurnes et demi-synodiques de la marée. Cette influence de la marée est bien entendu maximale dans la région estuarienne; le volume d'eau marine y pénétrant annuellement serait de 38 km<sup>3</sup> (Varlet, 1978). Au niveau de la baie de Biétri, selon une estimation de Guiral et Lanusse (1983), les échanges journaliers passeraient de 12 millions de mètres-cubes en décembre 1982 à 15 millions en avril 1983, soit respectivement 28% et 34% du volume moyen de la baie. De plus, ces auteurs constatent que les volumes transitant par les 2 extrémités de la baie sont uniquement dépendants des amplitudes de marée observée à Vridi.

Cependant, les cycles de 24 heures entrepris au cours de cette étude n'ont pas permis de relier directement les variations horaires des dénombrements bactériens au cycle semi-diurne de la marée. Néanmoins, l'importance du flux et du reflux de la marée dans le renouvellement des eaux sont évidents; les coefficients de variation de la distribution des *E. coli* présentent les valeurs les plus élevées pour le coefficient de la marée le plus fort.

La variabilité liée à la méthodologie ou au prélèvement apparaît peu déterminante; les valeurs de ces coefficients sont toutefois inférieures à celles calculées au cours du cycle annuel. Ils autorisent par conséquent l'appréciation des variations saisonnières du niveau de contamination des eaux lagunaires.

En effet, cette étude montre que corrélativement aux variations hydrobiologiques, les caractéristiques hydroclimatiques se répercutent sur la qualité bactériologique du milieu lagunaire.

Durant la saison des pluies, le degré de contamination d'origine fécale des eaux de surface augmente significativement. D'après les moyennes géométriques déterminées graphiquement, cette augmentation serait respectivement, de 600 %, 200% et 185% pour les dénombrements des *E. coli*, des entérocoques et des *C. perfringens*. Au cours de cette période, le ruissellement des eaux de pluie, par le lessivage des sols souillés ainsi que par la vidange des égouts semble être à l'origine de cet accroissement de la contamination.

Cet accroissement pourrait aussi résulter de la diminution du rayonnement solaire et de son effet bactéricide comme le suggèrent Fatal et al. (1983) qui observent une corrélation inverse entre la durée d'ensoleillement et le niveau de contamination des eaux côtières israéliennes. Cette hypothèse pourrait être d'autant plus significative que les eaux durant cette période sont plus turbides.

A côté de ces influences directes d'origine météorologique, les résultats de l'étude de la survie des bactéries entériques (Chap. IV) permettent également d'impliquer une variabilité des vitalités bactériennes lors de cette évolution saisonnière.

En effet, d'après cette étude, on sait que la vitalité d'*E. coli* varie très nettement selon la qualité hydrobiologique du milieu d'incubation. Parmi les 3 bio-indicateurs testés, seul *E. coli* présente une vitalité prolongée dans les eaux les plus douces. Cette aptitude semble se répercuter sur le niveau de contamination des eaux lagunaires par cette espèce et elle pourrait ainsi être à l'origine du plus fort accroissement observé pour *E. coli* pendant la saison des pluies.

D'après les moyennes géométriques, on observe une différence d'environ 400 % entre les accroissements respectifs de la contamination par *E. coli* et celle par les entérocoques ou *C. perfringens*. Ces différences permettent de conclure que, dans le cas d'*E. coli*, l'influence liée à la prolongation de survie serait 2 fois plus forte que celles d'origine météorologique.

La spécificité de cette influence est confirmée par les corrélations significatives (négatives) uniquement observées entre *E. coli* et les valeurs de salinité et de pH. De même, l'influence de ces différences d'aptitudes de survie est confortée par l'évolution du rapport *E. coli*/Entérocoques qui passe de 7,1 durant la saison sèche à 15,9 durant la saison des pluies.

A l'inverse, la constance du comportement de *S. faecalis* quel que soit l'échantillon mis en incubation (Chap. IV) confirme l'influence du ruissellement des eaux de pluie sur l'accroissement de la contamination des eaux par les entérocoques et donc aussi par les autres bactéries.

Consécutivement à cet accroissement de contamination, les crues contribuent à épurer le milieu lagunaire en charriant les eaux lagunaires polluées en mer. Ce phénomène est mis en évidence par une diminution significative des moyennes calculées pour chaque distribution bactérienne à la saison des pluies; cette évacuation affecte le niveau de contamination des eaux de surface avec la même intensité puisque on observe une diminution de 72, 68 et 77 % du niveau moyen respectif des E. coli, entérocoques et C. perfringens. De plus, les coefficients de corrélation observés entre ces distributions et la turbidité témoignent du rôle auto-épurateur de la crue.

Néanmoins, l'influence des marées ou de la crue est variable selon les stations; ainsi, le degré de contamination des stations du chenal central (St. 8, 9, 7 et 6) est plus dépendant du renouvellement des eaux que celui des baies fermées de Marcory et Cocody (St. 11 et 12). Comme déjà signalé (Pagès et Citeau, 1978), le degré de contamination est donc fonction à la fois de l'importance des rejets et du confinement des eaux.

De même que pour les eaux de surface, l'effet de chasse lié au passage de la crue affecte la contamination des eaux de fond comme l'atteste la corrélation significative observée entre les concentrations bactériennes respectives des 2 niveaux. D'autre part, les concentrations bactériennes du fond sont corrélées avec les valeurs de salinité et de pH. Ces corrélations soulignent non seulement l'influence de ces paramètres physico-chimiques sur la vitalité des bactéries mais également la dynamique de la crue dans les eaux du fond. Ainsi, la crue influencerait la contamination des eaux du fond soit en limitant la sédimentation des bactéries fécales, soit en charriant toute la colonne d'eau.

Face à un tel contexte hydrologique, la qualité microbiologique des eaux lagunaires s'avère difficile à évaluer.

Les techniques de contrôle de la salubrité sont fondées sur des méthodes statistiques d'évaluation des risques "acceptables" de contamination. Celles-ci conduisent à la définition de concentrations limites d'un bio-indicateur qu'un ensemble d'échantillons consécutifs ne doit pas dépasser. L'intérêt et la valeur de cette démarche sont de plus en plus reconnus comme en témoigne le nombre croissant de normes nationales qui s'y réfèrent.

La salubrité des eaux lagunaires a été évaluée d'après les critères OMS/PNUE élaborés au cours du programme MED.POL. VII (programme OMS/PNUE de surveillance de la qualité des eaux méditerranéennes). Proposés pour être appliqués de façon provisoire aux eaux littorales à usage récréatif de la Mer Méditerranée, ceux-ci stipulent que ;

"Pour être considérées bactériologiquement satisfaisantes, les eaux littorales de baignade ne doivent pas excéder des concentrations de 100 coliformes fécaux (C.F.) ou streptocoques fécaux (S.F.) par 100 ml dans 50% des échantillons et 1000 C.F. ou S.F. dans 90% des échantillons sur au moins 10 prélèvements représentatifs effectués au cours de la saison balnéaire à moins de 14 jours d'intervalle."

Vis à vis de ces critères, les 11 stations se révèlent donc fortement contaminées et nettement au dessus des normes. La contamination par E. coli s'avère la plus élevée avec des moyennes logarithmiques variant de 1000 UFC/100ml (st.9) à plus de 30000 UFC/100ml (St. 3 et 11). Seules les eaux de la station 9 pourraient être considérées comme satisfaisantes compte tenu des paramètres statistiques de la distribution des entérocoques (ENT50 : 50 UFC/100ml, ENT90 : 200 UFC/100 ml).

Cependant, la validité des normes sanitaires OMS/PNUE pour les milieux tropicaux et en particulier, pour cette lagune tropicale reste sujette à caution.

La recherche des micro-organismes pathogènes impliqués dans les endémies locales pouvait se révéler de ce fait plus instructive.

Dans les eaux lagunaires, aucun Escherichia coli entéropathogène n'a pu être détecté par la technique d'immuno-fluorescence, mais à cause du colmatage immédiat des membranes Nucléopore (0,2 µm) par les matières en suspension, le volume d'échantillon (< 10ml) est resté trop faible pour être représentatif. Cette limitation du volume d'échantillon filtrable a déjà été signalée pour d'autres milieux aquatiques (Munro et Bianchi, 1984) et constitue un des problèmes majeurs à résoudre pour le développement de cette technique en milieu naturel.

D'autre part, on peut s'interroger de l'adéquation du sérum non-valent utilisé dans la mesure où le spectre d'agglutination de celui-ci reste limité aux 9 sérotypes les plus fréquemment rencontrés dans les pays occidentaux. Une optimisation de cette technique est donc nécessaire pour rechercher les E. coli entéropathogènes dans des échantillons d'eau turbide.

Il en est sans doute de même pour l'isolement des Salmonella et des Shigella dans ce type d'échantillon puisque même dans les stations les plus contaminées, aucune de ces 2 entérobactéries n'a pu être isolée selon le protocole utilisé.

Pourtant, les quelques données épidémiologiques disponibles ainsi que les aptitudes de survie de Salmonella typhi laissent présager une implication possible du milieu lagunaire et ses variations hydroclimatiques dans le maintien endémique des salmonelloses en Côte d'Ivoire; Iwuji (1976) a montré la prédominance en zone lagunaire des salmonelloses de mars en juin, soit au début de la grande saison des pluies. De même, en 1979, Kouamé et al. recensaient à Abidjan une nette recrudescence de la fièvre typhoïde chez les enfants aux débuts des saisons des pluies.

D'autre part, les incubations de S. typhi réalisées précédemment (Chap. IV) ont permis de constater que la durée de survie de cette bactérie était nettement prolongée par la dessalure de l'eau. Le T90 de cette bactérie incubée dans une eau à 4 ‰ de salinité présentait une valeur près de 3 fois plus forte que lors d'une incubation en eau marine (33‰). Ces incubations ont de plus mis en évidence une courte mais nette croissance de S. typhi dans les eaux plus continentales et des concentrations de 2,8 Log UFC/ml ont pu être dénombrées après 300 heures d'incubation in vitro.

Malgré ces suspicions, il n'a pu être mis en évidence une implication des eaux lagunaires dans la transmission de ces bactéries puisque même pendant la saison des pluies, aucune Salmonella n'a pu être isolée des échantillons avec la méthodologie utilisée. Comme Kouamé et al. (1979), on doit donc plutôt soupçonner l'écoulement des pluies et les inondations qui en résultent, d'être à l'origine de l'augmentation des salmonelloses aux débuts des saisons des pluies.

Par contre, les eaux lagunaires de surface sont fortement contaminées par Pseudomonas aeruginosa. Cette bactérie est responsable de nombreuses infections auriculaire, ophtalmique et urinaire (Hoadley, 1977 ; Seyfried et Fraser, 1978); d'après ces derniers auteurs, la présence de cette bactérie est d'autant plus dangereuse que les concentrations infectieuses sont faibles. La moyenne annuelle est de 140 UFC/100 ml mais des valeurs de 5000 UFC/100 ml ont été dénombrées dans la station 11 et 12 durant le mois de juin. L'influence du lessivage des sols doit également être impliquée dans cette majoration saisonnière et ce d'autant plus que P. aeruginosa persiste longtemps dans le sol en formant une sorte de kyste (Zechman et Casida, 1982).

Les concentrations de cette bactérie sont significativement corrélées avec celles des bactéries fécales. Cependant, son indice de présence dans le tube digestif des homéothermes est faible et de ce fait, l'appartenance de P. aeruginosa à la microflore intestinale reste controversée (Hugh et Gilardi, 1980 ; Dutka, 1981). La distribution de cette bactérie serait donc aussi conditionnée par l'intensité des rejets eutrophisants. D'après cette étude, les sels minéraux azotés (principalement nitrates et nitrites) favoriseraient significativement la vitalité de P. aeruginosa alors que les phosphates n'auraient aucune influence.

Les eaux lagunaires sont également contaminées par des Vibrionaceae. Comparativement aux entérobactéries, les Vibrionaceae et plus particulièrement le genre Vibrio seraient favorablement influencés par la température et l'eutrophisation élevées d'un écosystème aquatique (Singleton et al., 1982a, Watkins et Cabelli, 1985) ; cette différence résulterait des caractéristiques auto-écologiques de ces bactéries leurs permettant de mieux rivaliser avec la microflore autochtone pour l'utilisation des nutriments présents dans le milieu.

Malgré l'endémosporadicité du Vibrio cholerae O:1 biotype El Tor, celui-ci n'est cependant pas retrouvé; seuls des vibrions non agglutinables sont isolés dans le milieu lagunaire ivoirien. Cette constatation rejoint celle de Duchassin et al. (1973) qui, pendant la période endémique ivoirienne, n'avaient pu isoler que des vibrions nag dans les eaux lagunaires. De même, Gallut et Quinion (1970) signalent qu'à la fin de certaines épidémies de choléra, les V. cholerae sérotypes O:1 sont suppléés par des vibrions nag. A l'inverse, Wylie (1968, cité par Kaper et al., 1979) révèle que l'épidémie de choléra qui affecta la ville de Hong-kong en 1964 fut précédée par une incidence croissante de vibrions nag en pathologie humaine.

Pour Duchassin et al. (1973), cette absence traduirait le faible niveau de l'endémie tandis que Weissman et al. (1974) évoquent de plus la possibilité d'une mutation de l'antigène somatique (O).

Quelle que soit leur aptitude à muter, les Vibrio cholerae nag doivent être considérés comme de véritables pathogènes. Ils sont très fréquemment impliqués dans des diarrhées cholériformes (Hughes et al., 1978 ; Dodin, 1982) et certaines souches produisent une entérotoxine semblable sinon identique à la toxine cholérique (Yamamoto, 1983). Longtemps considérés comme des vibrions non cholériques, les Vibrio nag sont maintenant classés parmi les V. cholerae (Sakazaki et Balows, 1981).

Les différents vibrions proviennent d'échantillons d'eau de salinité comprise entre 24 et 29 ‰. Comparativement, cette plage de salinité se révèle plus élevée que celle généralement observée dans d'autres écosystèmes aquatiques (Kaper *et al.*, 1979) mais elle recouvre les valeurs optimales de croissance des *V. cholerae* évaluées *in vitro* (Singleton *et al.*, 1982 ; Miller *et al.*, 1984).

D'autre part, les isollements de *V. cholerae* sont associés à de très fortes concentrations d'*E. coli*, d'entérocoques et de *C. perfringens*. Cependant, le faible nombre d'isolement ne permet pas de préciser une éventuelle corrélation avec les bio-indicateurs fécaux qui paraît peu probable (Kaper *et al.*, 1979 ; Hood et Ness, 1982 ; Roberts *et al.*, 1982). *Vibrio cholerae* survit dans l'eau beaucoup plus longtemps que les différents bio-indicateurs ; incubé dans des échantillons d'eau prélevée à Abidjan, *V. cholerae* El tor sérotype Ogawa peut être cultivé après 53 jours d'incubation (Duchassin *et al.*, 1973), soit nettement plus longtemps qu'*E. coli* ou *S. faecalis* (Chap. IV).

Ces isollements se situent durant les 2 premiers mois de l'année, soit à la fin des crues et au début de la grande saison sèche, et la fréquence d'isolement est nettement plus forte en surface (13%) qu'en profondeur (5,3%) ; la salinité ne semble donc pas être l'unique facteur déterminant cette répartition saisonnière. D'après les données épidémiologiques locales (Bourgeade *et al.*, 1973 ; Dosso *et al.*, 1983), cette période de transition apparaît particulièrement favorable à des flambées épidémiques de choléra. Durant cette période, les eaux lagunaires présenteraient donc des caractéristiques hydrobiologiques plus propices à cette bactérie ; ces caractéristiques pourraient être induites par le phénomène de mélange des eaux.

En effet, au début de la grande saison sèche, l'intrusion marine en entraînant la déstratification du milieu permet le brassage de la colonne d'eau et la remise en suspension des sédiments (Carmouze et Caumette, 1985). Cette oxygénation de la colonne d'eau accompagnée d'une remontée de sels nutritifs accumulés dans l'hypolimnion pourrait donc directement se répercuter sur la vitalité du vibrion.

Dans l'attente de conditions plus favorables, *V. cholerae* (O1) serait capable de survivre très longtemps en restant dans un état de "dormance" (Miller *et al.*, 1984) ; un supplément nutritionnel lui permet de retrouver rapidement (2 h à 21°C) sa forme initiale (Baker, 1983) et même de se multiplier (Singleton *et al.*, 1982). De plus, cet apport nutritif brutal en exaltant l'ensemble de la chaîne trophique pourrait également prolonger la survie du vibrion ; Huq *et al.* (1984) ont observé qu'en laboratoire à 30°C, la présence de copépodes vivants contribue nettement à la croissance du *V. cholerae*.

Enfin, on peut supposer que les paramètres physiques et chimiques de l'environnement affectent également la virulence des vibrions ; Tramplin et Colwell (1986) notent une influence directe *in situ* de la salinité et de la richesse en matière organique sur la production de la toxine cholérique.

De par ces différentes implications écologiques, le phénomène d'holomixis pourrait donc être à la base de l'énigmatique recrudescence saisonnière du choléra dans les milieux lagunaires de la sous-région ouest-africaine.

Parallèlement à la présence de vibrions cholériques nag, les eaux lagunaires sont fortement contaminées par V. parahaemolyticus. La présence de ce vibrion halophile est importante à signaler puisqu'il est l'agent étiologique responsable d'intoxications alimentaires provoquées par la consommation de poisson et de coquillage (Fujino et al., 1974). Son isolement est signalé très fréquemment dans l'environnement aquatique et ce, préférentiellement dans des eaux marines de température élevée (> 15°C : Baross et Liston, 1970 ; > 21°C : Watkins et Cabelli, 1985).

Dans les eaux lagunaires, V. parahaemolyticus est principalement isolé dans des eaux de salinité supérieures à 11 ‰. Cependant, les fluctuations saisonnières de la salinité ne se répercutent pas sur les fréquences d'isolement de cette espèce comme Bockemühl et Triemer (1974) ont pu l'observer dans les eaux saumâtres togolaises. A Abidjan, on dénombre autant de V. parahaemolyticus aux 2 saisons. Par contre, l'hypolimnion semble constituer un biotope particulièrement privilégié et ce fait semble être à l'origine de l'apparente dépendance de cette bactérie vis à vis de la salinité.

V. parahaemolyticus est isolé près de 2 fois plus souvent dans les sédiments que dans les eaux de surface et les sédiments de salinité supérieure à 11 ‰ sont nettement plus contaminés. La contamination est très forte dans la baie de Biétri où cette espèce est principalement présente dans les eaux du fond anoxiques.

Dans les zones stratifiées de cette baie, la halocline et l'oxycline conditionnent la répartition verticale du phytoplancton, des bactéries et corrélativement celle du peuplement zooplanctonique dominé principalement par le calanide Acartia clausi gabonensis (Caumette et al., 1983). Absent en profondeur, le zooplancton ne semble donc pas être directement impliqué dans la prédominance spatiale du V. parahaemolyticus comme cela a pu être observée avec un autre copépode A. tonsa dans la baie de Chesapeake (Kaneko et Colwell, 1973 et 1975).

Cependant, la présence de sédiments en suspension ainsi que de chitine, constituant principal des carapaces de copépodes, pourrait être indirectement à l'origine de cette prédominance spatiale; les enzymes protéolytiques, chitinolytiques et lipolytiques prédisposent les Vibrio à la décomposition rapide des structures cellulaires de leurs hôtes (Bianchi M., 1976) et la chitine favorise nettement la croissance du V. parahaemolyticus (Watkins et Cabelli, 1985). De ce fait, l'hypolimnion des zones confinées et anoxiques pourrait être, en tant que réservoir de carapaces, un milieu encore plus propice à la croissance de ces micro-organismes.

De même que Bockemühl et Triemer (1974), on doit suspecter les milieux lagunaires du Golfe de Guinée d'être des biotopes particulièrement adaptés à l'écologie du V. parahaemolyticus.

Du fait de la similitude de leurs caractéristiques auto-écologiques, V. parahaemolyticus et alginoliticus sont souvent rencontrés dans les mêmes échantillons (Joseph et al., 1983) ce que nous avons observé 7 fois. La distribution des V. alginolyticus apparaît par contre plus conditionnée par l'évolution saisonnière de la salinité; la présence de celui-ci est 2 fois plus fréquente durant la saison sèche que durant la saison des pluies et des crues, et la fréquence d'isolement de cette bactérie augmente avec la salinité des échantillons de surface et de fond. L'isolement de ce vibrion est peu mentionné dans la littérature bien que depuis 1973, il soit reconnu comme pathogène pour l'homme (Zen-Yoji et al., 1973).

Dans les eaux marines européennes, son isolement est lié à l'augmentation estivale de la température (Gjerde et Boe, 1981) et il est plus fréquent que celui du *V. parahaemolyticus* (Kampelmacher *et al.*, 1972). Ces 2 vibrions ont été isolés dans les eaux de la baie de Jakarta (Molitoris *et al.*, 1985) ; *V. alginolyticus* présentait une distribution saisonnière avec 100% de présence durant la saison sèche (mai à septembre) qui n'a pas pu être corrélée avec la température de l'eau.

Les présences d'*Aeromonas caviae* et *A. sobria* dans des échantillons d'eau sont par contre plus exceptionnelles ; de nombreux *A. caviae* ont cependant été isolés lors d'une épidémie de diarrhées à Calcutta (Sakazaki *et al.*, 1971) tandis que Fritsche *et al.* (1975; in Sakazaki et Balows, 1980) signalent un cas de gastroentérite aiguë causée par cette même espèce. L'infection à *A. sobria* présente les mêmes manifestations cliniques et Champsour *et al.* (1982) décrivent un syndrome cholériforme provoqué par cette bactérie.

La fréquence d'isolement de ces espèces dans les eaux lagunaires ivoiriennes peut atteindre 12,5 % et leurs distributions s'avèrent indépendantes de la salinité. La prédominance de ces espèces dans les eaux de surface témoigne de l'origine exogène de ces contaminants; les premières pluies semblent favoriser la dissémination de ces espèces qui sont préférentiellement isolées durant les mois de mai et juin.

L'écologie d'*A. hydrophila* est mieux connue. De nombreux auteurs signalent l'importance de la température de l'eau sur la distribution de cette bactérie dans l'environnement aquatique (Hazen, 1983) et parmi les *Aeromonas*, cette espèce est la plus fréquemment rencontrée dans les eaux chaudes (25°C) polluées de la côte est des Etats-Unis (Le Chevallier *et al.*, 1982). Les eaux tropicales pourraient donc être favorables à ce micro-organisme.

Dans les eaux lagunaires, la distribution d'*A. hydrophila* présente des variations saisonnières; 5 fois plus d'*A. hydrophila* sont isolés durant les saisons des pluies et de crues que lors de la saison sèche. Cette distribution est affectée par l'évolution saisonnière de la salinité. La fréquence totale d'isolement de cette espèce dans les eaux lagunaires augmente avec la dessalure de l'eau pour atteindre une fréquence de 10,5 % dans les eaux les plus douces. Ce comportement peut être conditionné par les caractéristiques auto-écologiques de cette espèce mais elle pourrait aussi résulter de son origine anthropique ; la majorité des isoléments sont effectués à proximité de rejets. D'autre part, la distribution de cette bactérie pourrait corroborer les données épidémiologiques locales ; une plus forte contamination humaine est observée au cours des mois de juillet et d'août (Dosso *et al.*, 1984). Les pluies doivent encore une fois être à l'origine de cette tendance saisonnière.

On retrouve donc également au niveau de la distribution des micro-organismes pathogènes, une influence directe de l'hydrobioclimat lagunaire. Celui-ci semble conditionner non seulement leur présence mais aussi leur survie et leur dissémination.



#### V.5. Conclusion.

La zone estuarienne de la lagune Ebrié est actuellement la cible de l'expansion économique de la ville d'Abidjan et de ses 1,6 millions d'habitants. En recevant la quasi-totalité des rejets anthropiques et industriels, le milieu lagunaire présente une forte pollution organique et fécale dont l'évaluation s'avère complexe compte tenu de l'hydrologie de la zone estuarienne.

L'influence de la marée est très importante, surtout au niveau des stations ouvertes et pour une estimation plus représentative du degré de pollution, il serait donc à notre avis préférable de réaliser un échantillonnage bi-quotidien. Compte tenu des caractéristiques de la marée à Abidjan, celui-ci pourrait s'effectuer à 6 heures d'intervalle.

L'état de contamination des eaux lagunaires a été apprécié conformément aux recommandations du programme MED POL VII. De même que pour ce programme, c'est avec succès qu'un modèle de distribution log-normale a permis d'interpréter convenablement les concentrations bactériennes dans les eaux lagunaires ivoiriennes.

D'après les normes OMS/PNUE, le milieu lagunaire serait impropre à toute utilisation. Cependant, on peut s'interroger sur la validité de ces normes pour les milieux tropicaux et en particulier, pour cette lagune tropicale.

En effet, la forte contamination microbienne d'origine fécale n'a pas pu être corrélée à la présence d'entérobactéries pathogènes. La vitalité de ces bactéries dans les eaux lagunaires doit donc être trop limitée pour qu'elles puissent être isolées mais la méthodologie de recouvrement de ces micro-organismes reste aussi à optimiser pour confirmer ces données.

Les eaux lagunaires sont fortement contaminées par Pseudomonas aeruginosa dont l'incidence pathologique est signalée croissante en milieu tropical. Même si la sélectivité de la méthodologie utilisée reste à améliorer, le dénombrement systématique de P. aeruginosa peut être entrepris dans un programme routinier.

D'autre part, du fait de leurs caractères saumâtre et turbide, mais aussi à cause de la température et du degré d'eutrophisation élevés, les eaux lagunaires de la zone estuarienne présentent un ensemble de conditions favorables à la vitalité des Vibrionaceae dont certaines espèces sont pathogènes.

Ces micro-organismes et plus particulièrement V. parahaemolyticus sont favorablement influencés par les rejets anthropiques eutrophisants ; de ce fait, ils pourraient aussi servir de bio-indicateurs de pollution organique des milieux lagunaires.

Compte tenu de la redondance des informations apportées par la recherche simultanée des Escherichia coli et des entérocoques, les dénombrements de P. aeruginosa et V. parahaemolyticus devraient se substituer à celui des entérocoques. La recherche de ces bactéries en association avec celle des bio-indicateurs fécaux, E. coli et C. perfringens constituerait alors un complément significatif d'appréciation de la qualité des eaux lagunaires.

Les risques épidémiologiques liés à la présence de ces Vibrio devront cependant être confirmés par l'agglutination avec le sérum O1 pour V. cholerae et par la détermination du caractère hémolytique des souches de V. parahaemolyticus isolées. Rappelons que le plus souvent, les souches isolées de l'environnement aquatique répondent négativement à ces recherches et ce, malgré l'endémosporadicité des affections intestinales causées par ces vibrios (Schandevyl et al., 1984 ; Sarkar et al., 1985). En Côte d'Ivoire, Vibrio parahaemolyticus est impliqué en pathologie humaine sous 2 formes cliniques; une gastro-entérite et un syndrome cholériforme évocateur du choléra. Des bactéries halophiles responsables d'un syndrome cholériforme sont de plus en plus fréquemment isolées des milieux aquatiques et ce dernier point illustre les risques liés à l'émission directe de bactéries pathogènes dans un milieu saumâtre et eutrophe comme le milieu lagunaire.

En effet, ce type d'écosystème en stimulant la croissance des Vibrionaceae pourraient favoriser les échanges d'informations génétiques entre les différentes souches compatibles (Bianchi et Bianchi, 1985). La possibilité de telles recombinaisons naturelles permettrait ainsi à certaines souches de l'environnement d'acquérir le support génétique codant pour une antibio-résistance ou un facteur toxigène. A cet égard, signalons également que de nombreux auteurs isolent dans les milieux aquatiques contaminés, des coliformes fécaux résistants à plusieurs antibiotiques (in Stotzky et Babich, 1986). Ces considérations soulignent donc les dangers de rejeter dans de tel environnement des bactéries pathogènes issues des milieux hospitaliers.

Au niveau étiologique, l'aspect de la lagune accompagné de dégagements nauséabonds est suffisamment répulsif pour limiter la pratique de loisirs aquatiques. La contamination humaine par contact direct doit donc être plutôt envisagée lors des activités ménagères (vaisselle, lessive, ..). Il apparaît donc nécessaire de favoriser l'hygiène alimentaire afin de limiter la contamination par ces micro-organismes.

L'isolement de Vibrio est fréquemment mentionné sur des organismes aquatiques qu'ils soient fraîchement pêchés ou encore plus souvent sur les marchés (Bockemühl et Triemer, 1974 ; Molitoris et al., 1985). La contamination par manutention ou consommation de produits de la pêche insuffisamment cuits semble encore plus probable. Compte tenu de l'importance des produits aquatiques dans l'alimentation ivoirienne, une surveillance sanitaire de ces produits devrait être envisagée en parallèle d'un réseau d'observation de la qualité des eaux. Sakazaki et al. (1979) estiment à  $10^6$  UFC la dose infectieuse de V. parahaemolyticus (KP+) et proposent une valeur standard de  $10^4$  pour 100 grammes d'aliment contaminé.

Au niveau du plan d'assainissement, la priorité est actuellement donnée aux raccordements des réseaux déjà existants. Il en résulte une concentration croissance des effluents au niveau de 2 points de rejet qui se situe dans le chenal central et en baie de Biétri.

La libre circulation des eaux se révèle donc indispensable à la survie de cet écosystème et tout aménagement doit respecter cet impératif hydrologique.

A cet égard, il est important de signaler le rôle sanitaire du canal de Vridi qui constitue un véritable "poumon" hydrologique pour le milieu lagunaire. Non seulement ce canal permet l'intrusion d'eaux marines avec les marées qui diluent les eaux lagunaires mais c'est également à travers celui-ci que la crue charrie en mer l'ensemble des déchets générés par la ville d'Abidjan.

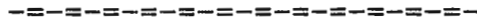
L'effet naturel de "chasse d'eau" des crues apparaît donc primordial pour la salubrité des eaux lagunaires et la santé des populations riveraines.

Actuellement, cette remarque s'avère d'autant plus importante qu'il a été décidé de rétablir le grau de Grand-Bassam qui constituait avant le percement du canal de Vridi, l'embouchure naturelle du fleuve Comoé.

Cette décision est justifiée par la prolifération intense de végétaux aquatiques (Pistia stratiotes, Salvinia molesta et Eichhornia crassipes) dans les zones dulçaquicoles lagunaires et sur les eaux du fleuve Comoé entraînées secondairement jusqu'à Abidjan lors de la saison des crues. Outre les phénomènes d'eutrophisation qu'elles accentuent par leur sédimentation, ces plantes constituent de véritables tapis végétaux flottants qui entravent la circulation nautique et l'activité de pêche artisanale. Cette réouverture prévue pour octobre 1987 a donc été décidée pour permettre une évacuation directe de ces plantes en mer et limiter ainsi leur présence encombrante dans les eaux abidjanaises.

Par conséquent, les crues du fleuve Comoé n'atteindront plus avec la même intensité la région d'Abidjan. Connaissant l'importance sanitaire des crues de ce fleuve au niveau d'Abidjan, on ne peut que s'inquiéter des conséquences écologiques et étiologiques de l'accroissement du confinement des eaux lagunaires sans la mise en place d'un système d'assainissement adapté.

CONCLUSION GENERALE



Cette étude présentait l'intérêt d'évaluer la salubrité de la zone estuarienne de la lagune Ebrié tout en définissant une stratégie de surveillance sanitaire spécifique aux écosystèmes lagunaires tropicaux. A cet égard, la partie centrale de la lagune Ebrié soumise aux rejets anthropiques et industriels de la ville d'Abidjan constituait un milieu idoine à cette double finalité; la température et l'eutrophisation des eaux, les nombreuses vocations socio-économiques ainsi que le contexte épidémiologique de cette lagune renforçant l'intérêt de ce programme.

Ce programme a mis nettement en évidence l'influence de l'hydroclimat lagunaire sur l'évolution temporelle du degré de contamination fécale de la zone estuarienne. Si dans un premier temps, les pluies contribuent localement à l'accroissement de la pollution, elles sont par la suite à l'origine de crues fluviales qui, en arrivant au niveau d'Abidjan, évacuent au large du canal de Vridi, l'ensemble des déchets générés par l'agglomération abidjanaise. Durant cette période, il doit en résulter une plus forte contamination de la zone littorale dont l'état sanitaire reste à évaluer.

La libre circulation des eaux doit donc être favorisée et l'effet naturel de chasse lié au passage de la crue est capital pour la salubrité des eaux lagunaires au niveau d'Abidjan.

Les eaux lagunaires sont toute l'année fortement contaminées par *E. coli*, les entérocoques, *C. perfringens* et *P. aeruginosa*; la classification des eaux lagunaires d'après les critères OMS/PNUE du programme MED.POL. VII. s'avère discutable. Néanmoins, ces données pourront servir de base à l'interprétation de toute évolution future de la contamination à la suite de la mise en place d'un réseau d'assainissement ou encore de la modification du contexte hydrologique de la zone estuarienne.

Cette forte contamination résulte de l'importance des rejets car les eaux lagunaires ne permettent pas la prolifération de ces espèces. Les caractéristiques physico-chimiques et plus particulièrement les teneurs en chlorure de Sodium et en métaux lourds limitent la survie des bactéries entériques. De plus, les eaux lagunaires abritent un ensemble de populations bactériennes, phyto et zooplanctoniques qui, par leurs activités bactéricide et prédatrice entraînent la disparition des espèces allochtones. La température élevée active ce processus auto-épurateur qui peut être assimilé à un lagunage naturel. Néanmoins, l'accroissement des rejets organiques est la source de nouveaux problèmes qui interfèrent avec la pollution bactérienne.

D'une part, la pollution organique dans les baies confinées atteint une telle intensité que l'hypolimnion de certaines zones devient hypereutrophe. Les caractéristiques aphotiques et anoxiques limitant l'expression de phénomènes auto-épurateurs, ces zones hypereutrophes peuvent constituer des réservoirs de bactéries pathogènes. Ces suspicions sont d'autant plus importantes que la destratification de la colonne d'eau au début de la grande saison sèche pourrait, en favorisant le brassage des eaux, entraîner la dissémination de ces bactéries. De même, il est important de s'inquiéter de l'accroissement des rejets chimiques dans le milieu lagunaire qui peuvent intoxiquer les agents biologiques contribuant à l'auto-épuration des eaux.

Les pollutions organique et chimique, outre les agressions qu'elles constituent, peuvent exacerber les risques liés à une contamination microbienne; cette constatation souligne par conséquent l'intérêt d'une approche pluridisciplinaire de l'assainissement des eaux. Pour les mêmes raisons, il convient de s'inquiéter de tout accroissement du confinement des eaux lagunaires qui amplifierait ces phénomènes.

D'autre part, les milieux saumâtres sont les biotopes des Vibrionaceae. De nombreuses espèces de cette famille sont des pathogènes de l'homme ou du poisson et sont la cause de flambées épidémiques plus ou moins graves selon l'espèce ou le biotype de celle-ci. En favorisant leur prolifération, l'eutrophisation des eaux exalte les risques épidémiologiques liés à leur présence.

Parallèlement, cette étude a permis de formuler un ensemble de recommandations préalables à l'élaboration de programmes de surveillance des milieux lagunaires tropicaux. De l'échantillonnage à l'interprétation statistique, ces recommandations sont les suivantes :

- Dans les zones où se fait ressentir l'influence de la marée, un échantillonnage bi-quotidien se révèle indispensable à l'estimation représentative du degré de pollution. Compte tenu des caractéristiques de la marée à Abidjan, celui-ci devrait s'effectuer à 6 heures d'intervalle.

- En milieu lagunaire tropical, le rayonnement solaire, la température et autres caractéristiques physico-chimiques de l'eau sensibilisent intensément les cellules bactériennes; ces processus limitent leur durée de survie dans les eaux lagunaires mais aussi leur aptitude de culture dans conditions sélectives. Les échantillons aussitôt prélevés devront par conséquent être conservés au froid et à l'abri de la lumière naturelle, et analysés le plus rapidement possible.

- Au niveau de l'approche méthodologique, cette étude a permis de préciser la vocation et les limites du concept de bio-indicateur. Les incubations du Chap. IV soulignent la nécessité de prendre en compte les fluctuations saisonnières des vitalités bactériennes respectives dans le choix des bio-indicateurs les plus adaptés au milieu lagunaire. La recherche des entérocoques, bien que de plus en plus recommandée en zone tempérée, s'avère inadéquate en zone tropicale. De plus, même une méthodologie supposée sélective ne permet pas de garantir l'origine humaine de la contamination détectée.

Par contre, Escherichia coli se révèle *in vitro* un indicateur fidèle de la présence de Salmonella. La détection d'E. coli et celle de C. perfringens en tant que témoin de contamination ancienne permet une bonne évaluation primaire du degré de pollution d'origine fécale. La recherche spécifique voire le dénombrement des micro-organismes pathogènes tels que Vibrio parahaemolyticus (KP+) et Pseudomonas aeruginosa s'avère néanmoins indispensable à l'évaluation de la qualité sanitaire des eaux lagunaires tropicales.

La recherche des ces micro-organismes peut être effectuée par des techniques classiques d'ensemencement sur milieux de culture. Une méthodologie sensible et spécifique a été définie pour le recouvrement optimal d'E. coli, de C. perfringens et de P. aeruginosa dans les eaux lagunaires (Chap. III.3, 5 et 6).

La détection directe de ces micro-organismes en microscopie à fluorescence est dans l'avenir la technique à privilégier. En comptabilisant les cellules non cultivables sur milieu gélosé, cette méthode permet une estimation plus juste de l'abondance bactérienne et des risques épidémiologiques; en effet, les cellules non cultivables seraient toujours viables et susceptibles d'exprimer leur éventuelle pathogénicité. Le développement de cette technique en milieu aquatique reste cependant conditionné aux problèmes de filtration des eaux turbides.

- Enfin au niveau de l'interprétation statistique des données recueillies, le Chap. V a permis de vérifier l'adéquation de la transformation Logarithmique pour normaliser les concentrations bactériennes et calculer les paramètres statistiques de la qualité bactériologique des eaux de surface des différentes stations lagunaires.

L'ensemble de ces conclusions pourra donc servir à l'évaluation de la contamination bactérienne des milieux lagunaires tropicaux et en particulier les estuaires et lagunes de de l'Afrique de l'Ouest.

Une démarche similaire se révèle indispensable à l'étude de la contamination virale des eaux lagunaires qui n'a pas encore été évaluée.

Enfin, les recherches ultérieures devront s'attacher à mieux connaître l'écologie des micro-organismes pathogènes mais aussi celui des gènes codant pour leur pathogénicité. Les écosystèmes lagunaires sont probablement le lieu de nombreuses recombinaisons génétiques naturelles et de ce fait, le berceau de nouvelles souches bactériennes aux propriétés multiples. Comme il a déjà été remarqué, ces zones pourraient favoriser les transferts génétiques de caractères de pathogénicité ou de résistance aux antibiotiques entre espèces compatibles allochtones et autochtones mais il pourrait également être imaginé le transfert de gènes "marins" entre les bactéries halophiles et les bactéries pathogènes rejetées dans le milieu aquatique....

## RESUME

-----



La zone estuarienne de la lagune Ebrié subit le développement démographique et industriel de la ville d'Abidjan. Les pressions anthropiques y sont particulièrement intenses; l'assainissement n'est assuré actuellement que par une évacuation directe des effluents urbains dans le milieu lagunaire. De nombreuses affections telles que les salmonelloses ou le choléra sévissent sous une forme endémique. Devant ces menaces épidémiologiques et compte tenu ses nombreuses vocations socio-économiques (pêche, aquaculture, tourisme, ...), la lagune Ebrié méritait une évaluation de sa qualité microbiologique. Cette constatation et la diversité des conditions écologiques rencontrées ont doublement motivé cette étude à caractère fondamental et appliqué.

Dans un premier temps, diverses méthodes d'analyse microbiologique des indicateurs bactériens ont été testées puis sélectionnées. Les méthodologies retenues ont ensuite été appliquées au suivi annuel du niveau de contamination bactérienne des eaux et sédiments de la zone estuarienne de la lagune. Parallèlement, dans le but de conforter les interprétations sur l'évolution spatio-temporelle de ces contaminations, la survie de bactéries pathogènes a été étudiée expérimentalement.

#### - Analyse bactériologique des eaux lagunaires.

Cette étude a eu pour but de sélectionner les méthodologies permettant le recouvrement optimal d'*Escherichia coli*, des entérocoques, de *Clostridium perfringens* et de *Pseudomonas aeruginosa*. Les méthodologies optimales ont été définies comme celles permettant la croissance spécifique du plus grand nombre de bactéries recherchées présentes dans l'échantillon à analyser.

Les méthodes retenues sont pour *E. coli*, la culture sur les milieux gélosés m-FC et m-TEC incubés à 44,5°C ; pour les entérocoques, la culture sur la gélose D-Coccosel incubée à 44°C et pour *C. perfringens*, la culture en gélose profonde dans le milieu Trypcase-Sulfite-Neomycine incubé à 46°C. Un nouveau milieu de culture m.PA-L est proposé pour la recherche des *P. aeruginosa* dans les eaux lagunaires.

- Estimation de la survie de quelques bactéries pathogènes dans les eaux lagunaires baignant la ville d'Abidjan.

Les bactéries étudiées sont *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Clostridium perfringens*. Les incubations réalisées *in vitro* montrent qu'aucune croissance significative n'a lieu que ce soit dans les échantillons d'eau de surface ou prélevés en profondeur. Soumis à d'importants rejets eutrophisants, les eaux lagunaires abritent un ensemble de populations bactériennes, phyto et zooplanctoniques qui par leurs activités bactéricide et prédatrice entraîne la disparition des bactéries entériques rejetées. La présence de myxobactéries, micro-organismes prédateurs d'*E. coli* est signalée pour la première fois dans les eaux lagunaires.

Une meilleure vitalité d' E. coli et de C. perfringens est observée dans les zones profondes hypereutrophes et anoxiques. Ces zones pourraient constituer des réservoirs de bactéries pathogènes.

Les variations hydrobioclimatiques de la qualité des eaux lagunaires se répercutent au niveau des aptitudes de survie des bactéries incubées in vitro. C'est au cours de la saison sèche, lorsque l'intrusion marine est maximale, que sont observées les durées de survie les plus courtes. A l'inverse, durant la saison des pluies et des crues, les eaux lagunaires sont plus douces et plus eutrophes; ces périodes sont plus favorables à la survie des entérobactéries et par conséquent plus propices à des flambées épidémiques d'infections causées par ces bactéries.

- Evolution annuelle de la contamination microbienne dans l'eau et les sédiments.

La contamination bactérienne du milieu lagunaire par les E. coli, les entérocoques, les C. perfringens et les P. aeruginosa se révèle très forte tout au long de l'année quelle que soit la station. Globalement, on observe entre le mois de mai et le mois de juillet, soit durant la saison des pluies, une augmentation significative du degré de contamination des eaux de surface. Au cours de cette période, le lessivage et le ruissellement des sols souillés ainsi que la vidange des égouts semblent être à l'origine de cet accroissement de la pollution. Le plus fort accroissement de contamination par E. coli est à relier à la variabilité des aptitudes de survie de cette bactérie.

Consécutivement à cet accroissement, l'arrivée des crues fluviales entraîne une diminution significative de la pollution d'origine fécale soulignant ainsi son rôle épurateur; l'effet de chasse lié au passage de la crue est capital pour la salubrité des eaux lagunaires au niveau d'Abidjan.

La forte contamination microbienne d'origine fécale n'a pas pu être corrélée à la présence d'entérobactéries pathogènes. Par contre, de nombreux Vibrionaceae ont été identifiés dont Vibrio cholerae NAG, V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, Aeromonas hydrophila, A. caviae et A. sobria. La distribution spatio-temporelle de ces micro-organismes est également influencée par les caractéristiques hydrobioclimatiques lagunaires. Du fait de leurs caractères saumâtres mais aussi à cause de la température et du degré d'eutrophisation élevés, les eaux lagunaires de la zone estuarienne présentent un ensemble de conditions favorables à la vitalité des Vibrio dont certaines espèces sont pathogènes.

En conclusion, la zone estuarienne de la lagune Ebrié présente des caractéristiques climatiques, hydrologiques et hydrobiologiques qui imposaient la définition d'une stratégie d'étude spécifique. Celle-ci a permis de formuler un ensemble de recommandations qui pourrait être transposé à d'autres milieux lagunaires tropicaux. La poursuite d'une telle approche devrait permettre d'évaluer la capacité d'auto-épuration bactériologique d'un milieu lagunaire tropical ainsi que de mieux connaître l'écologie des micro-organismes pathogènes et leurs relations avec l'homme.

mots clefs: Côte d'Ivoire, lagune, eau, sédiments, indicateur bactérien, bactérie pathogène, méthode d'analyse, survie, contamination bactérienne, évolution saisonnière.

## BIBLIOGRAPHIE

-----

- Anonymous. 1976. Standart methods for the examination of water and wastewater. 14th ed. American Public Health Association, Washington, DC.
- Abshire, R., 1976.- Detection of enteropathogenic Escherichia coli strains in wastewater by fluorescent antibody. Can. J. Microbiol., 22 : 364- 378.
- Aldeman, X. et X. Smith, 1972.- Toxicity of H<sub>2</sub>S. Can. Fish. Res. Bd., 29 : 1309-1317.
- Anderson, I., M. Rhodes et H. Kator, 1979.- Sublethal stress in Escherichia coli: function of salinity. Appl. Environ. Microbiol., 38 : 1147-1152.
- Anderson, I., M. Rhodes et H. Kator, 1983.- Seasonnal variation in survival of Escherichia coli exposed in situ in membrane diffusion chambers containing filtered and non-filtered estuarine water. Appl. Environ. Microbiol., 45 : 1877-1883.
- Aubert, M., J. Aubert et M. Gauthier, 1968.- Pouvoir auto-épurateur de l'eau de mer et substances antibiotiques produites par les organismes marins. Rev. Int. Océanogr. Méd., 10 : 132-207.
- Aubert, M., J. Aubert, M. Gauthier et P. Bernard, 1981.- Les systèmes d'information des micro-organismes marins. Leur rôle dans l'équilibre biologique océanique. Rev. Int. Océanogr. Méd., 60 : 13-205.
- Baker, R., F. Singleton et M. Hood, 1983.- Effects of nutrient deprivation on Vibrio cholerae. Appl. Environ. Microbiol., 46 : 930-940
- Baross, J et J. Liston, 1970.- Occurence of Vibrio parahaemolyticus and related hemolytic Vibrio in marine environments of Washington state. Appl. Microbiol., 20 : 179-186.
- Bianchi, M., 1976.- Etude taxonomique et distribution écologique des bactéries vibrioïdes du milieu marin. Thèse de doctorat. Aix-Marseille II.
- Bianchi, A., 1977.- L'étude de la structure des populations bactériennes dans les zones polluées. Rev. Int. Oceanogr. Med. Tome XLVII : 161-169.
- Bianchi, A et M. Bianchi, 1985.- Micro-organismes et gestion des zones littorales. Coll. fr.-japon. Océanogr., Marseille 16-21 Sept. 85, 4 : 5-14.
- Bisson, J. et V. Cabelli, 1979.- Membrane filter enumeration method for Clostridium perfringens. Appl. Environ. Microbiol., 37 : 55-66.
- Bissonnette, G., J. Jezeski, G. McFeters et D. Stuart, 1975.- Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from water. Appl. Microbiol., 29 : 186-194.
- Bissonnette, G., J. Jezeski, G. McFeters et D. Stuart, 1977.- Evaluation of recovery methods to detect coliforms in water. Appl. Environ. Microbiol., 33 : 590-595.
- Blake, P., R. Weaver et D. Hollis, 1980.- Diseases of human (other than choléra) caused by Vibrio. Annu. Rev. Microbiol., 34 : 341-367.

- Bockemühl, J. et A. Triemer, 1974.- Ecology and epidemiology of Vibrio parahaemolyticus on the coast of Togo. Bull. O.M.S., 51 : 353-360.
- Bohlool, B. et E. Schmidt, 1982. - The immunofluorescence approach in microbial ecology. Adv. in microbial ecology, 4 : 203-241.
- Bolter, M., 1982.- Submodels of a brackish water environment. I - Temperature and microbial activity. Ecol. Modelling, 17 ; 311-318.
- Bonde, G., 1977.- Bacterial indication of water pollution. Adv. in aquatic microbiology. Vol. 1., 273-363.
- Bourgeade, A., J. Rives, M. Duchassin, E. Koffi et A. Seka, 1973.- L'épidémiologie du choléra et ses problèmes. Méd. d'Afrique noire. 20 : 177-187.
- Brayton, P., D. Roszak, L. Palmer, S. Huq, D. Grimes et R. Colwell, 1984.- Fluorescent antibody enumeration of Vibrio cholerae in the marine environment. Actes du 2 ième colloque de bactériologie marine. (Brest), 507-514.
- Brodsky, M. et D. Schiemann, 1976.- Evaluation of Pfizer Selective Enterococcus and KF media for recovery of fecal streptococci from water by membrane filtration. Appl. Environ. Microbiol., 31 : 695-699
- Brodsky, M. et B. Ciebin, 1978. Improved medium for recovery and enumeration of Pseudomonas aeruginosa from water using membrane filters. Appl. Environ. Microbiol., 36 : 36-42.
- Brown, M. et J. Foster, 1970. - A simple diagnostic milk medium for Pseudomonas aeruginosa. J. Clin. Path., 23 : 172-177.
- Bruce Hanes, N. et R. Fragala, 1967.- Effect of seawater concentration on survival of indicator bacteria. J. Wat. Poll. Cont. Fed., 39 : 97-104.
- Buttiaux, R., G. Muchemle et T. Leurs, 1953.- Colimétrie de l'eau sur membranes filtrantes. Ann. Inst. Pasteur Paris, 84 : 1010-1025.
- Cabelli, V., 1979. What do water quality indicator indicate ? in Aquatic Microbial Ecology: Proccedings of the conference (Colwell R. et J. Foster, Eds.) 305-306. Maryland Sea Grant, College Park, MD.
- Cabelli, V., H. Kennedy et A. Levin, 1976.- Pseudomonas aeruginosa-fecal coliform relationships in estuarine and fresh recreational water. J. Wat. Poll. Cont. Fed., 48 : 367-376.
- Caplenas, N., M. Kanarek et P. Dufour, 1981.- Source and extent of Klebsiella pneumoniae in the paper industry. Appl. Environ. Microbiol., 42 : 779-785.
- Caplenas, N. et M. Kanarek, 1984.- Thermotolerant non-fecal source Klebsiella pneumoniae : Validity of the fecal coliform test in recreational waters. Am. Journal of Public Health., 74 : 1273-1275.
- Carillo, M., E. Estrada et T. Hazen, 1985.- Survival and enumeration of the fecal indicators Bifidobacterium adolescentis and Escherichia coli in tropical rain forest watershed. Appl. Environ. Microbiol., 50 : 468-476.

- Carlucci, A. et D. Pramer, 1960.- An evaluation of factors affecting the survival of Escherichia coli in sea water. Appl. Microbiol., 8 : 254-256.
- Carmouze, J.P et P. Caumette, 1985.- Les effets de la pollution organique sur les biomasses et activités du phytoplancton et des bactéries hétérotrophes dans la lagune Ebrié. Rev. Hydrobiol. trop., 18 : 183-211
- Caumette, P., M. Pagano et L. Saint-Jean, 1983.- Répartition verticale du phytoplancton, des bactéries et du zooplancton dans un milieu stratifié en baie de Biétri (Lagune Ebrié). Relations trophiques. Hydrobiologia. 106 : 135-148.
- Caumette, P., 1985.- Développement des bactéries phototrophes et des bactéries sulfato-réductrices dans les lagunes peu profondes et des lagunes stratifiées. Thèse de Doctorat, Univ. Aix-Marseille/St-Jérôme, 325 p.
- C.E.E., 1975.- Directives concernant la qualité des eaux de baignade. Journal officiel de la Communauté Européenne. L31/1, 05/02/76 : 1-7
- Chamberlin, C. et R. Mitchell, 1978.- A decay model for enteric bacteria in natural waters. p. 325-348. In : R. Mitchell (ed), Water pollution microbiology, vol.2, Wiley and sons. New York.
- Champsour, H., A. Andremont, D. Mathieu, E. Rottman et P. Auzepy, 1982.- Cholera-like illness due to Aeromonas sobria. J. of infect. diseases. 145 : 248-254.
- Charles-Dominique, E. et J.R. Durand, 1982.- Les lagunes de Côte d'Ivoire. Bibliographie provisoire. Arch. Sc. Cent. Rech. Océanogr., Abidjan, 7 : 1-26.
- Charmot, G., 1980.- La diarrhée du voyageur. Données actuelles sur le rôle d'Escherichia coli entérotoxigène. Ann. Gastroentérol. Hépatol., 20 : 289-294.
- Charriere, G., T. Jouenne, J. Lemeland, E. Selegny et G. Junter, 1984.- Bacteriological analysis of water by potentiometric measurement of lipoic acid reduction. Appl. Environ. Microbiol., 47 : 160-166.
- Cline, J., 1979.- Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural water. Limnol. Oceanogr. 14 : 454-458.
- C.N.E.X.O. 1983.- Manuel des analyses chimiques en milieu marin. B.N.D.O. documentation. Centre Océanographique de Brest. France.
- Colcanap, M. et P. Dufour, 1982.- L'assainissement de la ville d'Abidjan. Evaluation, recommandations, propositions d'alternatives. Ministère de l'Environnement, Paris, 299 p.
- Colwell, R., 1980.- Human pathogens in the aquatic environment. Annu. Rev. of American Society of Microbiology, 377-379.
- Colwell, R., 1984.- Vibrio in the environment. Colwell, R. (Ed.) John Wiley and sons. 623 p.

- Colwell, R., J. Kaper et S. Joseph, 1977.- Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus and other Vibrio : occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science, 198 : 394-396.
- Colwell, R., R. Seidler, J. Kaper, S. Joseph, S. Garges, H. Lockman, D. Maneval, H. Bradford, N. Roberts, E. Remmers, I. Huq et A. Huq., 1981.- Occurrence of Vibrio cholerae serotype 1 in Maryland and Louisiana estuaries. Appl. Environ. Microbiol., 41 : 555-558.
- Dadié, P., 1979.- Bibliographie courante des travaux du Centre (1958-1978). Arch. Sc. Cent. Rech. Océanogr., Abidjan, 5 : 1-187.
- Daget, J., 1976.- Les modèles mathématiques en écologie. Coll. Ecologie. Masson. Paris, 172 p.
- Dagnelie, P., 1970.- Théorie et méthodes statistiques. Vol. I et II. Ed. Duculot, Gembloux, Belgique.
- David, J. et R. Sizemore, 1982.- Incidence of Vibrio species associated with blue crabs collected from Galveston bay, Texas. Appl. Environ. Microbiol., 43 : 1092-1097.
- Davis, A., J. Kane, V. Garagusi, 1978.- Human Aeromonas infections : a review of the literature. Medicine (Baltimore), 57 : 267-277.
- Dawson, M., B. Humphrey et K. Marshall, 1981.- Adhesion : a tactic in the survival strategy of a marine vibrio during starvation. Current Microbiol., 6 : 195-199.
- De Giaxa, 1889.- Über das Verhalten einiger pathogener Mikroorganismen im Meer Wasser. Ztsch. Hyg. InflektKrankh, 6 : 162-225.
- Dodin, A., 1982.- Le choléra et les diarrhées cholériques de l'adulte. Rev. du Praticien, 32 : 1023-1029.
- Dodin, A et B. Goud, 1983.- Diagnostic du vibrion cholérique au laboratoire. Bull. Soc. Path. Ex., 76 : 644-651.
- Dosso, M., M. Duchassin, A. Lombardo, M. Koné et V. Edoh, 1983.- Cas sporadiques ou début d'une nouvelle épidémie de choléra. Bull. Soc. Path. Ex., 76 : 121-125.
- Dosso, M., M. Duchassin, P. Koua-Amian, K. Kouakou, P. Gnagne et R. Kotschi, 1984. - Les Aeromonas hydrophila en Côte d'Ivoire. Aspects épidémiologiques, écologiques et rôle entéropathogène. Bull. Soc. Path. Ex., 77 : 17-27.
- Doyle, J., B. Tunnicliff, S. Brickler, R. Kramer et N. Sinclair, 1984. - Anaerobic incubation of membrane filter culture for improved detection of fecal coliforms for recreational waters. Appl. Environ. Microbiol., 48 : 324-326
- Duchassin, M., M. Clerc, J. Rives, A. Bourgeade et M. Hosotte, 1973 - La survie du vibrion cholérique El Tor dans les eaux de la lagune d'Abidjan. Bull. Soc. Path. Exot., 66 : 679-684.
- Ducluzeau, R. et P. Raibaud, 1979.- Ecologie microbienne du tube digestif. Coll. "I.N.R.A. Actualités scientifiques et agronomiques" 104 p.

- Dufour, Ph., 1982.- Influence des conditions du milieu sur la biodégradation des matières organiques. *Oceanol. Acta*, 5 : 355-363.
- Dufour, Ph., 1982.- Les frontières naturelles et humaines du système lagunaire Ebrié. Incidences sur l'hydroclimat. *Hydrobiologia*, 94 : 105-120.
- Dufour, Ph., 1984.- Production primaire d'une lagune tropicale (Ebrié, Côte d'Ivoire). Facteurs naturels et anthropiques. Thèse de Doctorat, Univ. Pierre et Marie Curie, Paris, 164 p.
- Dufour, Ph., 1984.- L'assainissement d'Abidjan et la sauvegarde de la lagune. *La Sirène* (PNUE, Genève), 25 : 15-23
- Dufour, Ph. et L. Lemasson, 1985.- Le régime nutritif de la lagune tropicale Ebrié (Côte d'Ivoire). *Océanogr. trop.*, 20 : 41-69.
- Dufour, Ph et D. Maurer, 1979.- Pollution organique et eutrophisation en milieu tropical saumâtre. *Biologie-Ecologie méditerranéenne*. 6:252.
- Dufour, A. et V. Cabelli, 1976.- Characteristics of Klebsiella from textile finishing plant effluents. *J. Water Poll. Contr. Fed.*, 48 : 872.
- Dufour, A., E. Strickland et V. Cabelli, 1981.- Membrane filter method for enumerating Escherichia coli. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 1152-1158.
- Dupray, E. et M. Cormier, 1985.- Mise au point d'une technique d'isolement de Vibrio parahaemolyticus dans les coquillages. *Sci. Aliments*, n° hors série 4 : 181-185.
- Durand, J.R. et J.M. Chantraine, 1982.- L'environnement climatique des lagunes ivoiriennes. *Rev. Hydrobiol. Trop.*, 15 : 85-113.
- Durand, J.R. et M. Skubich, 1982.- Les lagunes ivoiriennes. *Aquaculture*, 27 (3) : 211-250.
- Durand, J.R., J.M. Ecoutin et E. Charles-Dominique, 1982.- Les ressources halieutiques des lagunes ivoiriennes. *Oceanol. Acta*. N° Special. Proceedings International Symposium on coastal lagoons. SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, France. 8-14 sept. 1981, 277-284.
- Durrande, M., 1982.- Une lagune qui ne veut pas mourir. *Jeune Afrique Economie*. 14 : 90-92.
- Dutka, B., 1973.- Coliforms are an inadequate index of water quality. *J. of Environmental Health*, 36 : 39-46.
- Dutka, B., 1979.- Microbiological indicators, problems and potential of new microbial indicators of water quality. *Biological Indicators of water quality*. James A and L. Evison ed. Wiley and sons, New York.
- Dutka, B., 1981.- Pseudomonas aeruginosa : a controversial indicator pathogen. p 119-129. *In* B. Dutka ed., *Membrane filtration : application, technique and problems*. M. Dekker, Inc., New York.
- Dutka, B., 1981.- Methods for microbiological analysis of waters, wastewater and sediments. Inland water directorate, Center for Inland waters, Burlington, Ontario (Canada).



- Dutka, B. et K., Kwan, 1977.- Confirmation of the single step membrane filtration procedure for estimating Pseudomonas aeruginosa densities in water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 : 240-245.
- Dutka, B. et K., Kwan, 1978.- Comparison of eight media-procedures for recovering faecal Streptococci from water under winter conditions. *J. of Appl. Bacteriol.*, 45 : 333-340.
- Eijkman, C., 1904.- Die Gärungsprobe bei 46°C als Hilfsmittel bei der Trinkwasser Untersuchung. *Zbl. Bakt.*, 37 : 742-752.
- Eisenstark, A., 1971.- Mutagenic and lethal effects of visible and near U.V. light on bacterial cells. *Adv. Genet.*, 16 : 167-198.
- Eldin, M., 1971.- Le milieu naturel de la Côte d'Ivoire. Le climat. *Mémoires ORSTOM, Paris*, 50 : 109-155.
- Elliot, J.M., 1977.- Statistical analysis of samples of benthic invertebrates. *Freshwater biological association, Publication n°25*. 160p
- Elliot, E. et R. Colwell., 1985.- Indicator organism for estuarine and marine waters. *FEMS Microbiology Reviews*, 32 : 61-79.
- Escherich, T., 1885.- Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschr. Med.*, 3 : 515-517.
- Evison, L. et A. James., 1973.- A comparison of the distribution of intestinal bacteria in British and East African water sources. *J. Appl. Bact.*, 36 : 109-118.
- Evison, L. et A. James., 1975.- Bifidobacterium as an indicator of fecal pollution in water. *Progress in Wat. Technol.*, 7 : 57-66.
- Fatal, B., R. Vasl., E. Katzenelson et H. Shuval, 1983.- Survival of bacterial indicator organisms and enteric viruses in the Mediterranean coastal waters off Tel-Aviv. *Wat. Res.*, 4 : 397-402.
- Facklam, R., 1973.- Comparison of several laboratory media for presumptive identification of enterococci and D group streptococci. *Appl. Microbiol.* 26 : 138 - 145.
- Facklam, R., 1980.- Streptococci and Aerococci, p 88-110. In E. Lennette, A. Balows, W. Hausler and J. Truant (ed.), *Manual of clinical microbiology*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Facklam, R. et H. Wilkinson, 1981.- Streptococci. Chap. 27. in *The Prokaryotes*
- Feachem, R., 1974.- Faecal coliforms and faecal streptococci in streams in the New Guinea highlands. *Wat.Res.*, 367-374.
- Felix, H., 1971.- Le développement de l'épidémie de choléra en Afrique occidentale. *Bull. Soc. Path. exot.*, 64 : 580-582.
- Foster, D., N. Hanes et D. Lord, 1971.- A critical examination of bathing water quality standard. *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.*, 43 : 2229-2241.
- Fujioka, R. et O. Narikawa, 1982.- Effect of sunlight on enumeration of indicator bacteria under field conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44 : 395-401.

- Fujino, T., G. Sakagachi, R. Sakazaki et Y. Fadedda, 1974.- International symposium on Vibrio parahaemolyticus. Saikon Tokyo, 261p.
- Gallais, H., D. Raoult, A. De Rego, D. Morvan et P. Casanova, 1983. La fièvre typhoïde en Afrique Noire. Med. Trop., 43 : 367-370.
- Gallut, J. et J. Quinion, 1970.- Interactions de Vibrio cholerae classique, V. cholerae biotype El Tor et vibrions Nag. Bull.OMS, 42 :464-466.
- Gameson, A. et J. Saxon, 1967.- Field studies on effect of daylight on mortality of coliform bacteria. Wat. Res., 1 : 279-295.
- Garay, E., A. Arnau et C. Amaro, 1985. Incidence of Vibrio cholerae and related Vibrio in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. Appl. Environ. Microbiol., 50 : 426-430.
- Gavini, F. et H. Leclerc, 1982.- Quality assurance of a multiple well system for the mechanical identification of Enterobacteriaceae strains. Arch. Lebensmitt.-Hyg. 33, 137-176.
- Geldreich, E., 1973.- Principles for developing criteria for coastal bathing waters. 5 ième session of GESAMP V/3.
- Geldreich, E. et B. Kenner, 1969.- Concepts of fecal streptococci in stream pollution. J. Water. Poll. Contr. Fed., 4 : 336.
- Gerba, C. et J. McLeod, 1976.- Effect of sediments on the survival of Escherichia coli in marine waters. Appl. Environ. Microbiol., 32 : 114-120.
- Gerba, C. et G. Schaiberger, 1974.- Biscayne Bay : Bacteriological interpretation. Biol. Sciences, 2-4 : 104-114.
- Girard, G., J. Sircoulon et P. Touchebeuf, 1971.- Le milieu naturel de la Côte d'Ivoire. Aperçu sur les régimes hydrologiques. Mémoires ORSTOM, Paris, 50 : 109-155.
- Gjerde, J. et B. Boé, 1981.- Isolation and characterisation of V. alginolyticus and V. parahaemolyticus from the Norwegian coastal environment. Acta Vet. Scand., 22 : 331-343.
- Gordon, R. et C. Fliermans, 1978.- Survival and viability of Escherichia coli in a thermally altered reservoir. Wat. Res., 12 : 343-352.
- Graham, J. et J. Sieburth, 1973.- Survival of Salmonella typhimurium in artificial and coastal sea water. Rev. Intern. Oceangr. Med., 24 : 5-29
- Green, B., W. Litsky et K. Sladek, 1980.- Evaluation of membrane filter methods for enumeration of faecal coliforms from marine waters. Mar. Environ. Bull., 3 : 267-276.
- Guelin, A., 1952.- Bactériophages et entérobactéries. Ann. Inst. Pasteur. 83 : 46-56.
- Guiral, D., 1984.- Devenir de la matière organique particulaire dans un milieu eutrophe tropical. Rev. Hydrobiol. trop., 17 : 191-206.

- Guiral, D et J.M. Chantraine, 1982.- Hypothèses sur l'origine des mortalités observées en lagune Ebrié en 1979. Doc. Scient. Centr. Rech. Océanogr. Abidjan. (A paraître).
- Guiral, D. et A. Lanusse, 1984.- Contribution à l'étude hydrodynamique de la baie de Bietri (lagune Ebrié). Doc. Sc. Cent. Rech. Océanogr., Abidjan, 15 : 1-18.
- Hanes, N., G. Rohlick et W. Sarles, 1965.- Effects of temperature on survival of indicator bacteria in water. J. N. Engl. Water. Works Assoc., 80 : 13-16.
- Hanes, N. et R. Fragala, 1967.- Effect of seawater concentration on survival of indicator bacteria. J. Wat. Pol. Cont. Fed., 97-104.
- Hartemann, P. et J.M. Foliquet, 1985.- Bactéries pathogènes pour l'homme. Chap. 5 - In Bactériologie des milieux aquatiques. Tec et Doc. Librairie Lavoisier- Paris. 257-311.
- Havelaar, A., M. During et E. Delfgou-Van Asch, 1985.- Comparative study of membrane filtration and enrichment media for the isolation and enumeration of Pseudomonas aeruginosa from sewage, surface water and swimming pools. Can. J. Microbiol., 31 : 686-692.
- Hazen, T., C. Fliermans, R. Hirsch, et G. Esch, 1978.- Prevalence and distribution of Aeromonas hydrophila in the United States. Appl. Environ. Microbiol., 36 : 731-738.
- Hendricks, C et S. Morrison, 1967.- Multiplication and growth of selected enteric bacteria in clear mountain streamwater. Wat. Res., 1 : 567-576.
- Hill, E., 1981.- The genus Clostridium, Chap. 37, in the Prokaryotes.
- Hirn, J., H. Viljamaa et M. Raevuori, 1980.- The effect of physico-chemical, phytoplankton and seasonal factors on faecal indicator bacteria in Northern brackish water. Wat. Res., 0 : 1-7.
- Hoadley, A., 1977.- Pseudomonas aeruginosa in surface waters. p.31-57. In V. Young Ed. Pseudomonas aeruginosa, ecological aspects and patient colonization. Raven Press - New York.
- Hood, M. et G. Ness, 1982.- Survival of Vibrio cholerae and Escherichia coli in estuarine waters and sediments. Appl. Environ. Microbiol., 43 : 578-584.
- Hugh, R. et G. Gilardi, 1980.- Pseudomonas, p. 288-317. In E. Lennette, A. Balows, W. Hausler and J. Truant (ed.), Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Hughes, J., D. Hollis, E. Gangarosa et R. Weaver, 1978.- Non-cholera vibrio infections in the United States. Clinical, epidemiologic and laboratory features. Ann. Intren. Med., 88 : 602-606.
- Huq, A., E. Small, P. West, M. Huq, R. Rahman et R. Colwell, 1983.- Ecological relationships between Vibrio cholerae and crustacean copepods. Appl. Environ. Microbiol., 45 : 275-283.
- Isenberg, H., D. Goldberg et J. Sampson, 1970.- Laboratory studies with a selective enterococcus medium. Appl. Microbiol., 20 : 433-436.

- Iwuji, S., 1976.- Les infections intestinales à salmonelloses en zone lagunaire rurale. Thèse de médecine, Abidjan n°79.
- Jannasch, H., 1968.- Competitive elimination of Enterobacteriaceae from seawater. *Appl. Microbiol.*, 16 : 1616-1621.
- Jones, G., 1967.- Precipitates from autoclaved sea water. *Limnol. Oceanogr.*, 12 : 165-167.
- Joseph, S., R. Colwell et J. Kaper, 1983.- Vibrio parahaemolyticus and related halophilic vibrios. *Crit. Rev. Micro.* 10 : 77-124.
- Kaneko, T. et R. Colwell, 1973.- Ecology of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.*, 123 : 24-32.
- Kaneko, T. et R. Colwell, 1975.- Adsorption of Vibrio parahaemolyticus onto chitin and copepods. *Appl. Environ. Microbiol.*, 29 : 269-274.
- Kaper, J., R. Seidler, H. Lockman et R. Colwell. 1979.- Medium for the presumptive identification of Aeromonas hydrophila and Enterobacteriaceae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38 : 1023-1026.
- Kaper, J., H. Lockman, R. Colwell et S. Joseph. 1979.- Ecology, serology and enterotoxin production of Vibrio cholerae in Chesapeake bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 37 : 91-103.
- Kaper, J., H. Lockman, R. Colwell et S. Wi, 1981.- Aeromonas hydrophila : ecology and toxigenicity isolates from an estuary. *J. Appl. Bacteriol.*, 50 : 359-377.
- Kenner, B., H. Clark et P. Kabler, 1961.- Fecal Streptococci I. Cultivation and enumeration of Streptococci in surface waters. *Appl. Microbiol.*, 9 : 15-20.
- King, E., M. Ward et D. Raney, 1954.- Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.*, 44 : 301-307.
- Klein, D. et S. Wu, 1974.- Stress : a factor to be considered in heterotrophic micro-organism enumeration from aquatic environments. *Appl. Microbiol.*, 27 : 429-431.
- Klein, T. et L. Kasida, 1967.- Pseudomonas aeruginosa die-out from normal soil as related to nutrient availability and the indigenous microflora. *Can. J. Microbiol.*, 13 : 1461-1470.
- Klein, T. et M. Alexander, 1986.- Bacterial inhibitors in lake water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 52 : 114-118.
- Kampelmacher, E, L. van NoorleJansen, D. Mossel et F. Groen, 1972.- A survey of the occurrence of Vibrio parahaemolyticus and Vibrio alginolyticus on mussels and oysters and in estuarine waters in the Netherlands. *Appl. Bacteriol.*, 35 : 431-438.
- Kouamé, K., J. Moreau, K. Timite, K. Diekouadio et J. Assi Adou, 1979.- La fièvre typhoïde de l'enfant à Abidjan. *Rev. Méd. de Côte d'Ivoire*, 48 : 2-15.
- Lassere, P., 1979.- Les lagunes côtières. *Nature et ressources*, 15 : 2-21.

- Lavoie, M., 1983.- Identification of strain isolated as total and fecal coliforms and comparison of both groups as indicators of fecal pollution in tropical climates. *Can. J. Microbiol.*, 29 : 689-693.
- LeChevallier, M. et G. McFeters, 1985.- Interactions between heterotrophic plate count bacteria and coliform organisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49 : 1338-1341.
- Leclerc, H., 1983.- Les bactéries pathogènes dans le milieu aquatique. XXIII<sup>ème</sup> congrès de Limnologie. *Trav. français de Limnologie*, 184-187.
- Leclerc, H., C. Savag et C. Eymard, 1970.- Sur l'isolement des Salmonella dans les milieux fortement pollués. *Essais sur les eaux résiduaires*. *Ann. Inst. Pasteur. Lille*, 21 : 277-294.
- Leclerc, H., F. Gavini et C. Oger, 1981.- Les indicateurs bactériens dans le contrôle bactériologique de l'eau : exigences et limites. *J. Fr. Hydrol.*, 35 : 213-228.
- Leclerc, H., F. Gavini, D. Izard et P. Trinel, 1983.- Les coliformes : mythe et réalité. *Colloques INSERM, Les bacilles à Gram négatif d'intérêt médical et en santé publique*, Lille.
- Le Minor, J., M. Veron, M. Popoff, 1983.- Salmonella. *Colloques INSERM : Les bacilles à Gram négatif d'intérêt médical et en santé publique*, Lille.
- Le Noc, P. et J. Orio, 1972.- Les infections à Salmonella en Côte d'Ivoire. *Rev. Epidem. Med. Soc. et Santé Publ.*, 20 : 27-40.
- Lennette, E., A. Balows, W. Hausler et J. Truant, 1980.- *Manual of clinical microbiology*. American Society of Microbiology, Washington, D.C.
- Lessard, E. et J. Sieburth, 1983.- Survival of natural sewage populations of enteric bacteria in diffusion and batch chambers in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 45 : 950-959.
- Levin, M. et V. Cabelli, 1972.- Membrane filter technique for enumeration of Pseudomonas aeruginosa. *Appl. Microbiol.*, 24 : 864-870.
- Marchand, M. et J.L. Martin, 1985.- Détermination de la pollution chimique (hydrocarbures, organochlorés et métaux) dans la lagune d'Abidjan (Côte d'Ivoire) par l'étude des sédiments. *Océanogr. trop.*, 20 : 1-90.
- Marshall, R., J. Steenberger et L. McClung, 1965.- Rapid technique for enumeration of Clostridium perfringens. *Appl. Microbiol.*, 13 : 559-563.
- Martins, M., M. Alves et P. Sanchez, 1982.- Comparison of methods for Pseudomonas aeruginosa recoveries from water. *Environ. Technol. Letters*, 3 : 405-410.
- Maurer, D., 1978.- *Phytoplankton et pollution : Lagune Ebrié (Abidjan) ; secteur de Cortiou (Marseille)*  
Thèse Doct. 3<sup>ème</sup> Cycle, Aix-Marseille. 121p.
- Mc Cambridge, J. et T. Mc Meekin, 1979.- Protozoan predation of Escherichia coli in estuarine waters. *Wat. Res.*, 13 : 659-663.

- Mc Cambridge, J., et T. Mc Meekin, 1980.- Relative effects of bacterial and protozoan predators on survival of Escherichia coli in estuarine water samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40 : 907-911.
- Mc Cambridge, J. et T. Mc Meekin, 1981.- Effect of solar radiation and predacious microorganisms on survival of fecal and other bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 1083-1087.
- Mc Donell, M. et M. Hood, 1982.- Isolation and characterisation of ultramicro-bacteria from a gulf coast estuary. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43 : 566-571.
- Mc Feters, G. et D. Stuart, 1972.- Survival of coliform bacteria in natural waters field and lab studies with membranes filter chambers. *Appl. Microbiol.*, 24 : 805-811.
- Mc Feters, G., G. Bissonnette, J. Jezeski, C. Thomson et D. Stuart, 1974. - Comparative survival of indicator bacteria and enteric pathogens in well water. *Appl. Microbiol.*, 27 : 823-829.
- Miller, C., B. Drasar et R. Feachem, 1984.- Response of toxigenic Vibrio cholerae 01 to physico-chemical stresses in aquatic environments. *J. Hyg. Camb.*, 93 : 475-495.
- Mitchell, R., 1968.- Factors affecting the decline of non-marine micro-organisms in seawater. *Wat. Res.*, 2 : 535-543.
- Miyamoto, Y., T. Kato, Y. Obara, S. Akiyama, K. Takizawa et S. Yamai, 1969. In vitro hemolytic characterisation of Vibrio parahaemolyticus ; its close correlation with human pathogenicity. *J. Bacteriol.*, 100 : 1147-1149.
- Moebus, K., 1972.- Seasonal changes in antibacterial activity of North Sea Water. *Mar. Biol.*, 13 : 1-13.
- Moebus, K., 1973.- Bactericidal properties of natural and synthetic seawater as influenced by addition of low amounts of organic matter. *Mar. Biol.*, 15 : 81-88.
- Molitoris, E., S. Joseph, M. Krichevsky, W. Sindhuhardja et R. Colwell, 1985. - Characterization and distribution of Vibrio alginolyticus and Vibrio parahaemolyticus isolated in Indonesia. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50 : 1388-1394.
- Morita, Y., 1982.- Starvation-survival of heterotroph in the marine environment. *Adv. Microb. Ecol.*, 6 : 171-198.
- Morlière, A., 1970.- Les saisons marines devant Abidjan. *Doc. Sci. Cent. Rech. Océanogr. Abidjan*, 1 : 1-15.
- Mundt, J., 1982.- Ecology of Streptococci. *Microbiol. Ecol.*, 8 : 350-369.
- Munro, et M. Bianchi, 1984.- Comparaison de méthodes directe et indirecte dans l'évaluation d'une pollution bactérienne d'origine fécale. *Actes du 2 ième colloque de bactériologie marine, Brest, IFREMER.*
- Nair, G., M. Abraham et R. Natarajan, 1980. Distribution of Vibrio parahaemolyticus in finfish harvested from Porto Novo (S. India) environs: a seasonal study. *Can. J. Microbiol.*, 26 : 1264-1269.

- Nicas, T et B. Iglewski, 1985.- The contribution of exoproducts to virulence of Pseudomonas aeruginosa. Appl. Environ. Microbiol., 31 : 387-392.
- Nicati, W. et W. Reitsch, 1885.- Experiences sur la vitalité du bacille cholérigène. Rev. Hyg. Pol. Sanit., 7 : 353-378.
- Oudart, E., 1980.- Contribution au choix de milieux de culture et de techniques microbiologiques. Mémoire d'ingénieur. USTL-Montpellier.
- Oger, C., G. Gavini, J. Delattre et H. Leclerc, 1981.- A propos des coliformes et de la colimétrie des eaux d'alimentation. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 132A : 183-189.
- OMS-PNUE, 1977.- Directives applicables à la surveillance sanitaire de qualité des eaux littorales. Bureau Régional de l'Europe, Copenhague.
- Dragui, J. et D. Mara, 1983.- Investigation of the survival characteristics of Rhodococcus coprophilus and certain fecal indicator bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 46 : 356-360.
- Orlob, T., 1956.- Viability of sewage bacteria in sea water. Sewage and Ind. Wastes, 27 : 1147-1167.
- Owens, J., 1977.- Coliform and Escherichia coli bacteria in seawater around Penang island, Malaysia. Wat. Res., 12 : 365-370.
- Paoletti, A., 1964.- Micro-organismes pathogènes dans le milieu marin. Comm. Int. Exp. Sci. Mer Médit., 133-184.
- Pagel, J., A. Qureshi, M. Young et L. Vlassof, 1982. - Comparison of four membrane filter methods for fecal coliform enumeration. Appl. Environ. Microbiol., 43 : 787-793.
- Pagès, J. et J. Citeau, 1978.- La pollution bactérienne de la lagune et de la mer autour d'Abidjan. Doc. Sc. Cent. Rech. Océanogr., Abidjan. 9 : 43-50.
- Pagès, J., L. Lemasson et Ph. Dufour, 1979.- Eléments nutritifs et production primaire dans les lagunes de Côte d'Ivoire. Cycle annuel. Arch. Scient. Cent. Rech. Océanogr. Abidjan, 5 : 1-60.
- Pagès, J., Ph. Dufour et L. Lemasson, 1980.- Pollution de la zone urbaine de la lagune Ebrié (Côte d'Ivoire). Doc. Sc. Cent. Rech. Océanogr. Abidjan, 11 : 79-107.
- Pike, E., A. Gameson et D. Gould, 1970.- Mortality of coliform bacteria in sea water samples in the dark. Rev. Int. Oceanogr. Med., 18-19 : 97-107.
- Popoff, M. et M. Veron, 1976.- A taxonomic study of the Aeromonas hydrophila - Aeromonas punctata group. J. of General Microbiol., 25 : 11-22.
- Popoff, M., P. Berche et M. Veron, 1983.- Vibrionaceae. Bactériologie médicale. Le Minor L. et Veron M. Ed. Flammarion Publ., Paris.
- Prescott, S., C. Winslow et M. Mc Grady, 1945.- Water bacteriology. Wiley and Sons Ed., New-York.
- Pugsley, A., L. Evison et A. James., 1973.- A simple technique for the differentiation of Escherichia coli in water examination. Wat. Res., 7 : 1431-1437.

- Raverdy, J., 1973.- Sur l'isolement et l'activité bactériolytique de quelques myxobactéries isolées de l'eau. Wat. Res., 7 : 687-693.
- Rhodes, M., I. Anderson et H. Kator., 1983.- In situ development of sublethal stress in Escherichia coli : Effets on enumeration. Appl. Environ. Microbiol., 45 : 1870-1876.
- Richard, C., 1983.- Enterobacteriaceae. Colloques INSERM : Les bacilles à Gram négatif d'intérêt médical et en santé publique, Lille.
- Richard, C et M. Lhuillier, 1977.- Vibrio parahaemolyticus et vibrions halophiles ; leur importance en pathologie humaine et dans l'environnement marin. Bull. Inst. Pasteur, 4 : 345-368.
- Rippley, S. et V. Cabelli., 1980. Occurrence of Aeromonas hydrophila in limnetic environments : Relationship of organism to trophic state. Microb. Ecol., 6 : 45-54.
- Roberts, N., R. Siebeling., J. Kaper et H. Bradford, 1982.- Vibrios in the Louisiana Gulf coast environment. Microb. Ecol., 8 : 299-312.
- Robertson, W et R. Tobin, 1983.- The relationship between three potential pathogens and pollution indicator organisms in Nova Scotian Coastal Waters. Can. J. Microbiol., 29 : 1261-1269.
- Romond, C., H. Beerens, J. Criquelion et C. Lepage, 1981.- Dénombrement en milieu liquide de Clostridium perfringens dans les aliments. Ann. Fals. Exp. Chim., 74 : 181-184.
- Romond, C., C. Neut, H. Beerens et L. Dubreuil, 1985.- Répartition de Clostridium perfringens dans l'environnement. Sci. Aliments, 4 (HS) : 163-173.
- Roper, M. et K. Marschall, 1974.- Modification of the interaction between Escherichia coli and bacteriophage in saline sediment. Microb. Ecol., 1 : 1-13.
- Roper, M. et K. Marschall, 1977.- Lysis of Escherichia coli by a marine Myxobacter. Microb. Ecol., 3 : 167-171.
- Roper, M. et K. Marshall, 1978.- Biological control agents of sewage bacteria in marine habitats. Aust. J. Mar. Freshwater Res., 29 : 335-343.
- Rychert, R et G. Stephenson, 1981.- Atypical Escherichia coli in streams. Appl. Environ. Microbiol., 41 : 1276-1278.
- Rychert, R et G. Stephenson, 1986.- Lactose negative Escherichia coli from rangeland streams : source, antibiotic resistance and colicinogenicité. Wat. Resources. Bull., 22 : 39-42.
- Sakazaki, R., K. Tamura, T. Kato, Y. Obara, S. Yamai et K. Hobo, 1968.- Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, Vibrio parahaemolyticus. III. Enteropathogenicity. Jap. J. of Med. Sc. Biol., 21 : 325-331.
- Sakazaki, R., K. Tamura, L. Prescott, Z. Bencic, S. Sanyal et R. Sinka, 1971.- Bacteriological examination of diarrheal stools in Calcutta. Indian Journal of medical research., 59 : 1025-1034.



- Sakazaki, R. et A. Balows, 1981.- The Genera Vibrio, Plesiomonas and Aeromonas Chap. 103 in The Prokaryotes, Springer Verlag, Berlin.
- Schandevyl, P., E. Van Dyck et P. Piot, 1984.- Halophilic Vibrio species from seafish in Senegal. Appl. Environ. Microbiol., 48 : 236-238.
- Schleifer, K. et R. Kilpper-Baltz., 1984.- Transfert of Streptococcus faecalis et S. faecium to the genus Enterococcus nom. rev. Enterococcus faecalis. Int. J. Syst. Bact., 34 : 31-34.
- Seyfried, P et D. Fraser, 1978.- Pseudomonas aeruginosa in swimming pool related to the incidence of otitis externa infection. Health. Labo. Sc., 15 : 50-57.
- Show, A., A. Samb, J. Chiron, F. Denis, E. Diop et I. Diop Mar., 1977.- A propos de deux syndromes cholériformes à Aeromonas hydrophila observés en Afrique de l'ouest. Bull. Soc. Med. Afr. Noire, 22 : 140
- Sieburth, J., 1964.- Antibacterial substances produced by marine algae. Dev. Ind. Microbiol., 5 : 124-134.
- Sinclair, J. et M. Alexander, 1984.- Role of resistance to starvation in bacterial survival in sewage and lake water. Appl. Environ. Microbiol. 48 :410-415.
- Singleton, F., R. Attwell, M. Jangi et R. Colwell, 1981.- Influence of salinity and organic nutrient concentration on survival and growth of Vibrio cholerae in aquatic microcosm. Appl. Environ. Microbiol., 43 : 1080-1085.
- Singleton, F., R. Attwell, S. Jangi et R. Colwell, 1982.- Effects of temperature and salinity on Vibrio cholerae growth. Appl. Environ. Microbiol., 44 : 1047-1058.
- Smith, L et J. Dowell, 1980.- Clostridium, Chap. 37, in Manuel of clinical microbiology (Lennette et al., 1980).
- Standart Methods for the examination of water et wastewater. 1976 American Public Health Association, New York, 14 th ed.
- Stolp, H. et M. Starr, 1963.- Bdellovibrio bacteriovorus, a predatory, ectoparasitic and bacteriolytic microorganism. Ant. Van Leeuwenhock, 29 : 217-248.
- Stotzky, G. et H. Babich, 1986.- Survival of, and genetic transfert by, genetically engineered bacteria in natural environments. Adv. in Appl. Microbiol., Vol. 31 : 93-138.
- Strickland, J. et T. Parsons, 1972.- A practical handbook of seawater analysis. Bull. Fish. Res. Bd. Can., 167 - 311 p.
- Tastet, J.P., 1974.- L'environnement physique du système lagunaire Ebriè. Univ. Abidjan, Série Doc. 11 : 28 p.
- Tosti, E. et L. Volterra, 1984.- Incubation temperature and fecal streptococci recovery from marine sediments. Microbiologica, 7 : 103-106.
- Tramplin, M et R. Colwell, 1986.- Effects of microcosms salinity and organic substrate concentration on production of Vibrio cholerae enterotoxin. Appl. Environ. Microbiol., 52 : 297-301.

- Trinel, P. et H. Leclerc, 1977.- Automatisation de l'analyse bactériologique de l'eau : description d'une nouvelle méthode de colimétrie. Ann. Microbiol (Inst. Pasteur), 128A : 419-432.
- Tsuchiya, T. et S. Shinoda., 1985.- Respiration driven Na<sup>+</sup> pump and Na<sup>+</sup> circulation in Vibrio parahaemolyticus. J. Bacteriol., 162 : 794-798.
- Vago, P., 1974.- Seasonal and vertical distribution of zooplankton in an estuarine anoxic basin and their tolerances to hydrogen sulfide and dissolved oxygen. Ph.D Oceanography, Univ. of Rhode Island.
- Vandepitte, J., C. Van Damme., Y. Fofana et J. Desmyter, 1980.- Edwardsiella tarda et Plesiomonas shigelloides. Leur rôle comme agent de diarrhée et leur épidémiologie. Bull. Soc. Path. Exot., 73 : 139-149.
- Varlet, F., 1978.- Le régime de la lagune Ebrié (Côte d'Ivoire). Traits physiques essentiels. Trav. Doc. ORSTOM, 83, 164 p.
- Von Graevenitz, A. 1980.- Aeromonas et Plesiomonas, 220-225. In Lennette, A. Balows, W. Hausler and J. Truant (ed.), Manual of clinical microbiology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Watkins, D., C. Thomas et V. Cabelli, 1976.- Membrane filter procedure for enumeration of Vibrio parahaemolyticus. Appl. Environ. Microbiol., 32 : 679-684.
- Watkins, D. et V. Cabelli, 1985.- Effect of fecal pollution on Vibrio parahaemolyticus densities in an estuarine environment. Appl. Environ. Microbiol., 49 : 1307-1313.
- Weissman, J., W. DeWitt, J. Thompson, C. Muchnick, L. Portnoy, J. Feeley et E. Gangarosa, 1974.- A case of cholera in Texas. Am. J. Epidemiol., 100 : 487-498.
- Wheater, D., D. Mara et J. Dragui, 1980.- Pseudomonas aeruginosa and Escherichia coli in sewage and fresh water. Wat. Res., 14 : 713-721.
- Wilson, W. et E. Blair, 1925.-Correlations of the sulphite reduction test with others tests in the bacteriological examination of water. J. of Hygiene, 24 : 111-119.
- Wright, R., 1984.- A new selective and differential agar medium for Escherichia coli and coliform organism. J. of Appl. Microbiol., 56 : 381-388.
- Xu, H.S., N. Roberts, F. Singleton, R. Attwell, D. Grimes et R. Colwell, 1982.- Survival and viability of non-culturable Escherichia coli and Vibrio cholerae in the estuarine and marine environment. Microbiol. Ecol., 8 : 313-323.
- Yamamoto, A., Y. Takeda, T. Miwatani et J. Craig, 1983.- Evidence that a non-O1 Vibrio cholerae produces enterotoxin that is similar but not identical to cholera enterotoxin. Infect. Immun., 41 : 896-901.
- Zabi, G., 1982.- Les peuplements benthiques lagunaires liés à la pollution en zone urbaine d'Abidjan (Côte d'Ivoire). Oceanol. Acta. N° Special. Proceedings International Symposium on coastal lagoons. SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, France. 8-14 sept. 1981, 441-455.

- Zaske, S., W. Dockins et G. Mc Feters, 1980.- Cell envelope damage in Escherichia coli caused by short-term stress in water. Appl. Environ. Microbiol., 40 : 386-390.
- Zechman, J. et L. Casida, 1982.- Death of Pseudomonas aeruginosa in soil. Can. J. Microbiol., 28 : 788-794.
- Zen-Yoji, H., R. Leclerc, K. Ohta et F. Montague, 1973.- Comparison of Vibrio parahaemolyticus cultures isolated in the United States with those isolated in Japan. J. Infect. Dis., 127 : 237-241.
- Zobell, C., 1936.- Bactericidal action of sea-water. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 34 : 113-116.

## ANNEXES

-----

Annexe 1 : Composition des milieux de culture.

Annexe 2 : Tracés anamorphiques des distributions bactériennes.

Annexe 3 : Evolution saisonnière des concentrations d'E. coli, des entérocoques et des C. perfringens en surface et en profondeur des stations 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 et 12.

ANNEXE 1 : Composition des milieux de culture.  
(formule en g/l d'eau distillée)

Tampon phosphate (pH 7,2).

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1

Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 121°C.

Application: milieu de dilution pour bactéries aérobies.

Milieu m.FC (Fecal Coliform) (DIFCO)

Bacto-tryptose	10,0
Protéose peptone n°3	5,0
Extrait de levure	3,0
NaCl	5,0
Sels biliaires n°3	1,5
Lactose	12,5
Bleu d'aniline	0,1
Agar	15,0

Chauffer jusqu'à ébullition puis retirer rapidement. NE JAMAIS AUTOCLAVER.  
Ajuster le pH à 7,4.

Application: isolement des coliformes.

Milieu m.TEC (Total E. coli (Dufour et al., 1981)

Protéose peptone n°3	5,0
Extrait de levure	3,0
NaCl	7,5
Lactose	10,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	3,3
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0
Na-Lauryl sulfate	0,2
Désoxycholate de Na	0,1
Pourpre de bromocrésol	0,08
Rouge de bromophénol	0,08
Agar	15,0
pH 7,3	

Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 120°C.

Application: isolement des coliformes.

Milieu E.L.S.A.B. (Wright, 1984)

Bacto-tryptose	20,0
Extrait de levure	6,0
Lactose	30,0
Na-lauryl sulfate	1,0
Rouge de phénol	0,2
Agar	12,0
Ajuster le pH à 7,4	
Faire fondre le milieu puis porter à ébullition.	

Application: isolement des coliformes.

Gélose lactosée au T.T.C. et au Tergitol (Inst. Pasteur)

Extrait de viande	5,0
Peptone	10,0
Extrait de levure	6,0
Lactose	20,0
Bleu de bromothymol	0,05
Agar	12,75

Faire fondre le milieu de base (47,8 g pour 1 l) puis porter à ébullition. Stériliser à l'autoclave pendant 20 mn à 115°C. Après refroidissement, ajouter pour 1 litre :

- 50 ml de solution stérile de chlorure de 2-3-5 triphenyltetrazolium (T.T.C.) à 0,05 % en eau distillée.
- 50 ml de solution de Tergitol à 0,02 % en eau distillée.

Bien mélanger, puis couler en boîtes de Petri.

Application: Isolement des coliformes.

Milieu Eosine bleu de méthylène de Levine (BioMérieux)

Biogélytone	10,0
Lactose	10,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,0
Eosine Y	0,4
Bleu de méthylène	0,065
Agar	15,0
pH 7,1	

Stériliser à l'autoclave pendant 15mn à 120°C.

Application: isolement des coliformes.

Gélose Desoxycholate lactose (BioMérieux)

Biopolytone	10,0
NaCl	5,0
Lactose	10,0
Citrate de Na	2,0
Désoxycholate de Na	0,5
Rouge neutre	0,033
Agar	15,0
pH 7,1	

Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 115°C.

Application: isolement des coliformes.

Milieu T.M.B. (Pugsley et al., 1973)

Tryptone	20,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4
NaCl	5,0
Mannitol	5,0
Tryptophane	3,0
Bleu de bromothymol (0,4%)	12 ml
pH 7,4	

Application: identification d' *E. coli*.

Gélose D-Coccosel (BioMérieux)

Biotrypticase	17,0
Biothione	3,0
Extrait de levure	5,0
Bile de boeuf	10,0
Chlorure de Na	5,0
Citrate de Na	1,0
Esculine	1,0
Citrate de fer ammoniacal	0,5
Azide de Na	0,25
Agar	13,5
pH 7,1	

Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 120°C.

Application: isolement des entérocoques.

**Gélose T.S.N. (Tryptcase, Sulfite, Néomycine) (BioMérieux)**

Biotryptcase	15,0
Sulfite de Na	1,0
Sulfate de Neomycine	0.02
Sulfate de Polymyxine	0,05
Extrait de levure	10,0
Citrate de fer	0,5
Agar	13,5
pH 7,2	

Répartir en tube

Stériliser à l'autoclave pendant 12 mn à 118°C. Eviter toute surchauffe.

Application: isolement du C. perfringens.

**Bouillon au thioglycolate avec resazurine (BioMérieux)**

Biotrypticase	15,0
L.cystine	0,5
Glucose	5,0
Extrait de levure	5,0
NaCl	2,5
Thioglycolate de Na	0,5
Resazurine	0,001
Agar	0,75
pH 7,1	

Répartir en tube de 20 ml à raison de 10 ml par tube.

Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 120°C.

Application: culture des Clostridium.

**Milieu Lactose-Sulfite. (Romond et al., 1981)**

Biotrypticase	5,0
Extrait de levure	2,5
NaCl	2,5
Lactose	10,0
Chlorydrate de cysteine	0,3
Bisulfite de Na	0,75
Nitrate de fer (III)	0,70

Ajuster le pH à 7,1

Répartir 10 ml par tube contenant une cloche de Durham.

Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 115°C.

Application: isolement du C. perfringens.



#### Milieu Sucrose-Sulfite

Biotrypticase	5,0
Extrait de levure	2,5
NaCl	2,5
Sucrose	10,0
Chlorhydrate de cysteine	0,3
Bisulfite de Na	0,75
Nitrate de fer (III)	0,70
Rouge de phenol	0,02
Ajuster le pH à 7,1	

Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 115°C.

Application: fermentation du sucrose par C. perfringens.

#### Milieu m.PA-B (Dutka et Kwan, 1977)

L-Lysine.HCl	5,0
Extrait de levure	2,0
NaCl	5,0
Na.thiosulfate	1,5
Sucrose	1,25
Xylose	1,25
Lactose	1,25
Citrate d'ammonium ferrique	0,80
Rouge de phénol	0,08
Agar	15,0

Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 121°C.

Après refroidissement, ajouter les antibiotiques suivants:

Sulfapyridine	176,0 mg
Sulfate de kanamycine	8,5 mg
Acide nalidixique	37,0 mg
Actidione	150,0 mg

Ajuster le pH à 7,1 , puis couler en boites de Petri.

Application: isolement de P. aeruginosa.

Milieu pour l'isolement de *P. aeruginosa* (Inst. Pasteur)

Peptone	16,0
Hydrolysate de caseine	10,0
Sulfate de potassium	10,0
Chlorure de magnesium	1,4
Cetrimide	0,2
Acide nalidixique	0,015
Agar	10,0

Verser 47,6 g du milieu déshydraté dans 1 l d'eau distillée.  
Ajouter 10 ml de glycérol puis porter doucement à ébullition  
jusqu'à dissolution complète.  
Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 121°C.

Milieu m.PA-L

Solution 1

L.Lysine.HCl	5,25
NaCl	5,25
Extrait de levure	2,10
Thiosulfate de Na	5,25
Sulfate de Mg	1,60
Xylose	1,30
Citrate d'ammonium ferrique	0,80
Rouge de phénol	0,08

Dissoudre dans 700 ml d'eau distillée.  
Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 120°C.

Solution 2.

Lait instantané en poudre	80 g
Eau distillée	300 ml

Dissoudre puis porter à ébullition.  
Stériliser à l'autoclave pendant 15 mn à 120°C.

Mélanger les solutions 1 et 2.

Après refroidissement, ajouter les antibiotiques suivants:

Sulfapyridine	176,0 mg
Sulfate de Kanamycine	8,5 mg
Acide nalidixique	37,0 mg
Actidione	150,0 mg

Ajuster le pH à 7,1 puis couler en boîtes de Petri.

Application : isolement de *P. aeruginosa*.

Milieu de King A (Inst. Pasteur)

peptone	20
agar	12
glycérol	10
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhydre)	10
MgCl <sub>2</sub> (anhydre)	1,4

Milieu de King B (Inst. Pasteur)

peptone	20
agar	12
glycerol	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydre)	1,5
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5

Ces 2 milieux sont ajustés à pH 7,2 avec une solution de potasse à 10% puis filtrés sur papier et répartis en tube incliné.

Application: identification des Pseudomonas fluorescents.

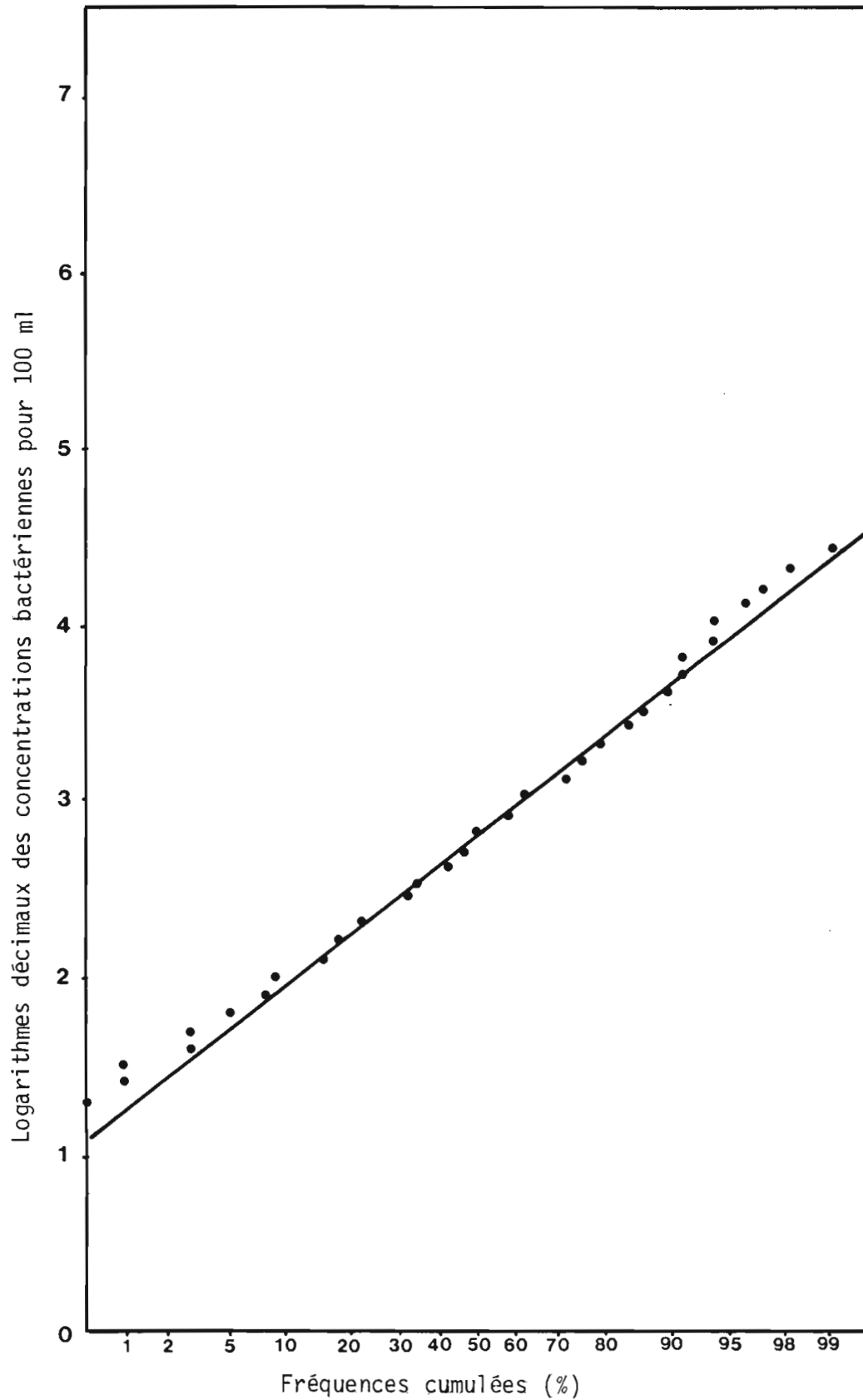


Fig. - Test de normalité de la distribution des *C. perfringens* en surface sur papier probit

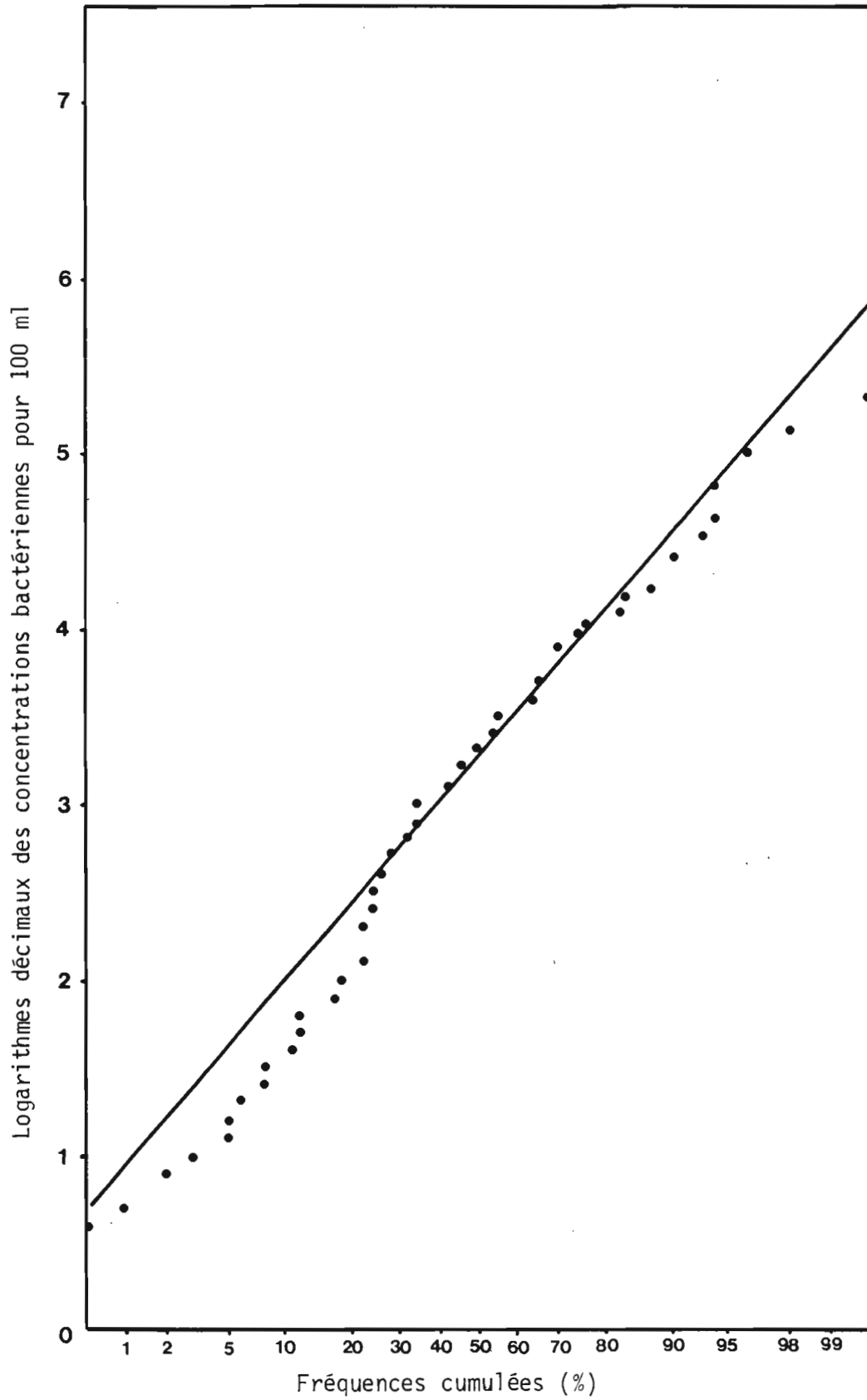


Fig. - Test de normalité de la distribution des Enterocoques en profondeur sur papier probit

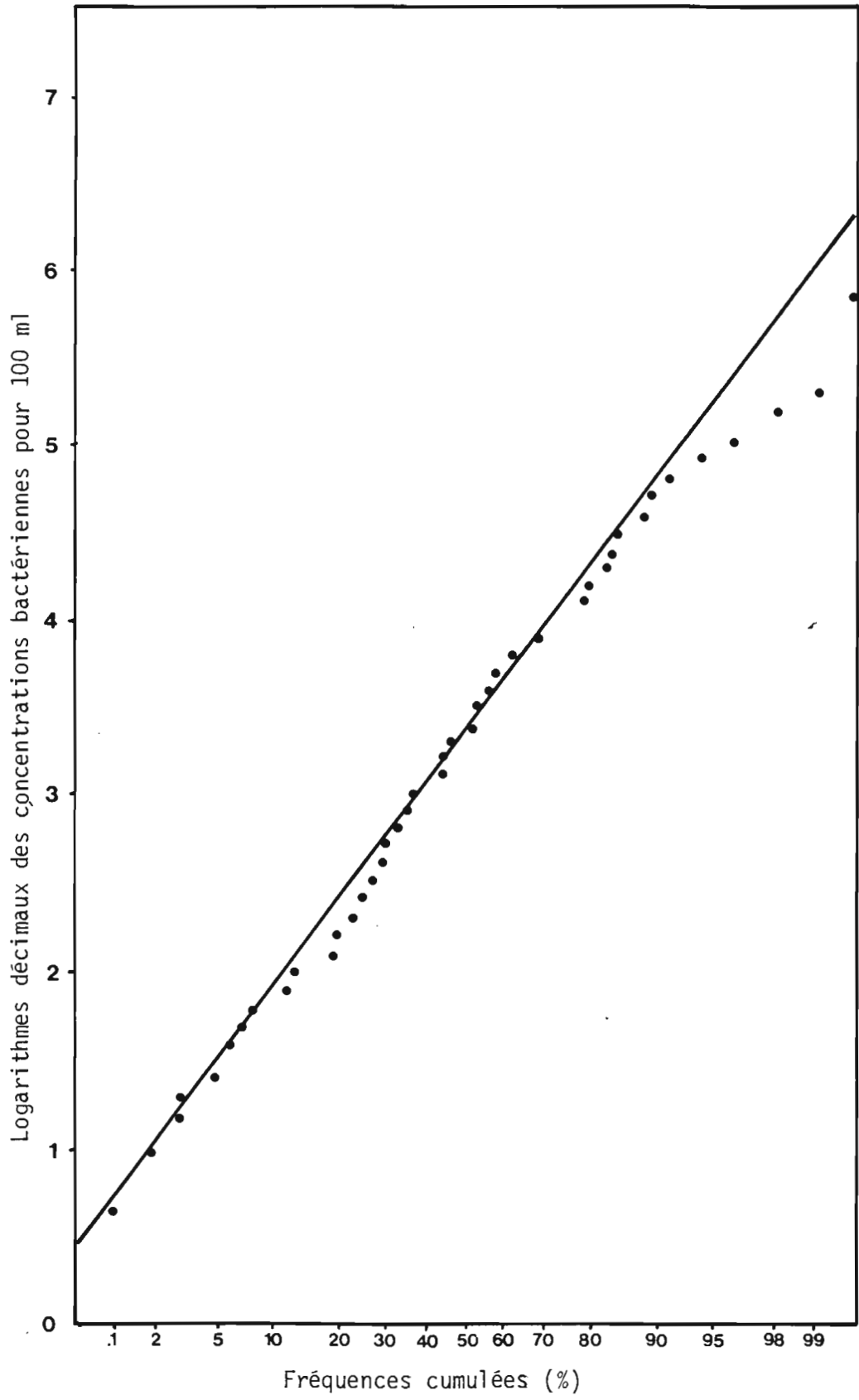


Fig. - Test de normalité de la distribution des C. perfringens en profondeur sur papier probit

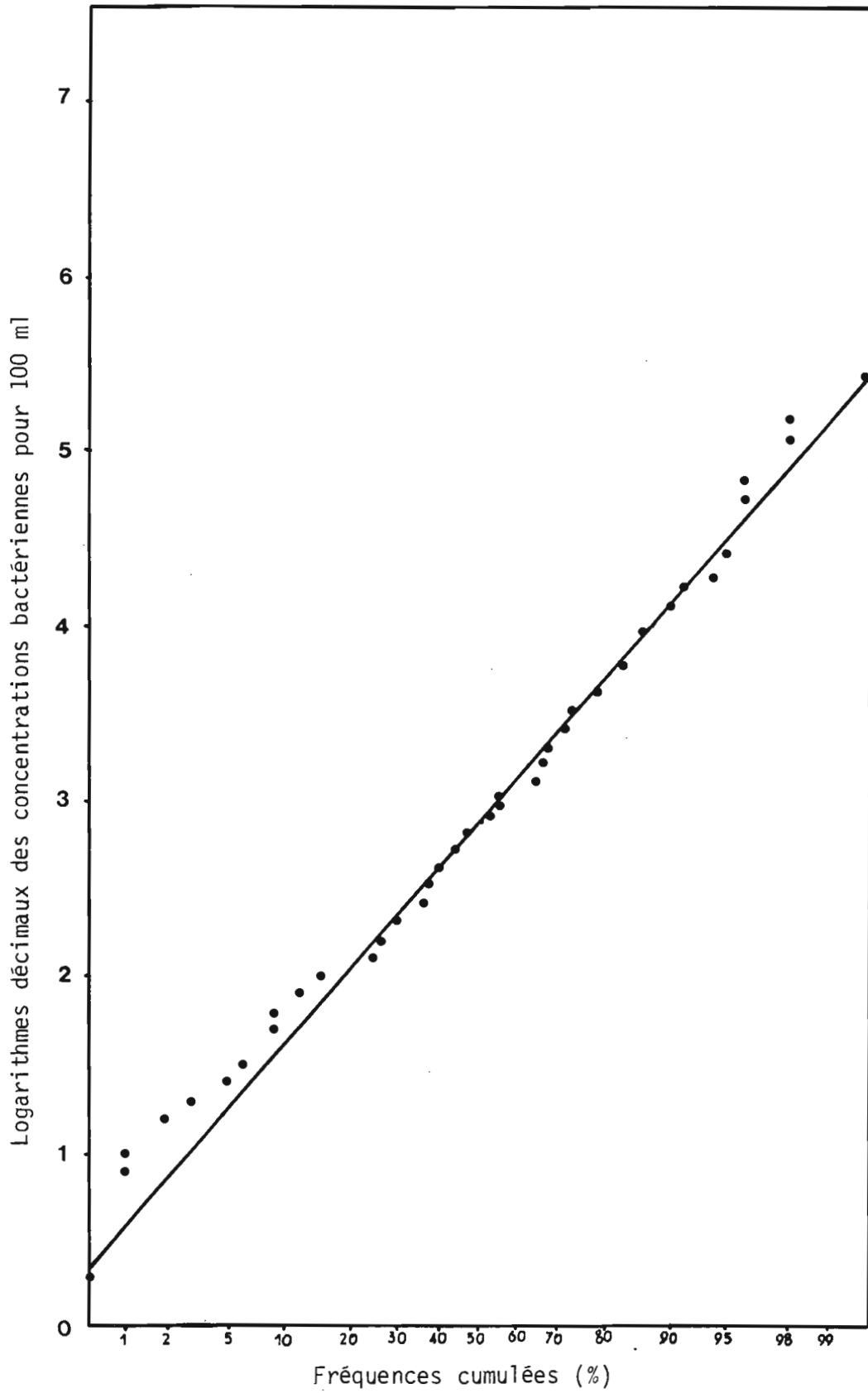


Fig. - Test de normalité de la distribution des Enterocoques en surface sur papier probit

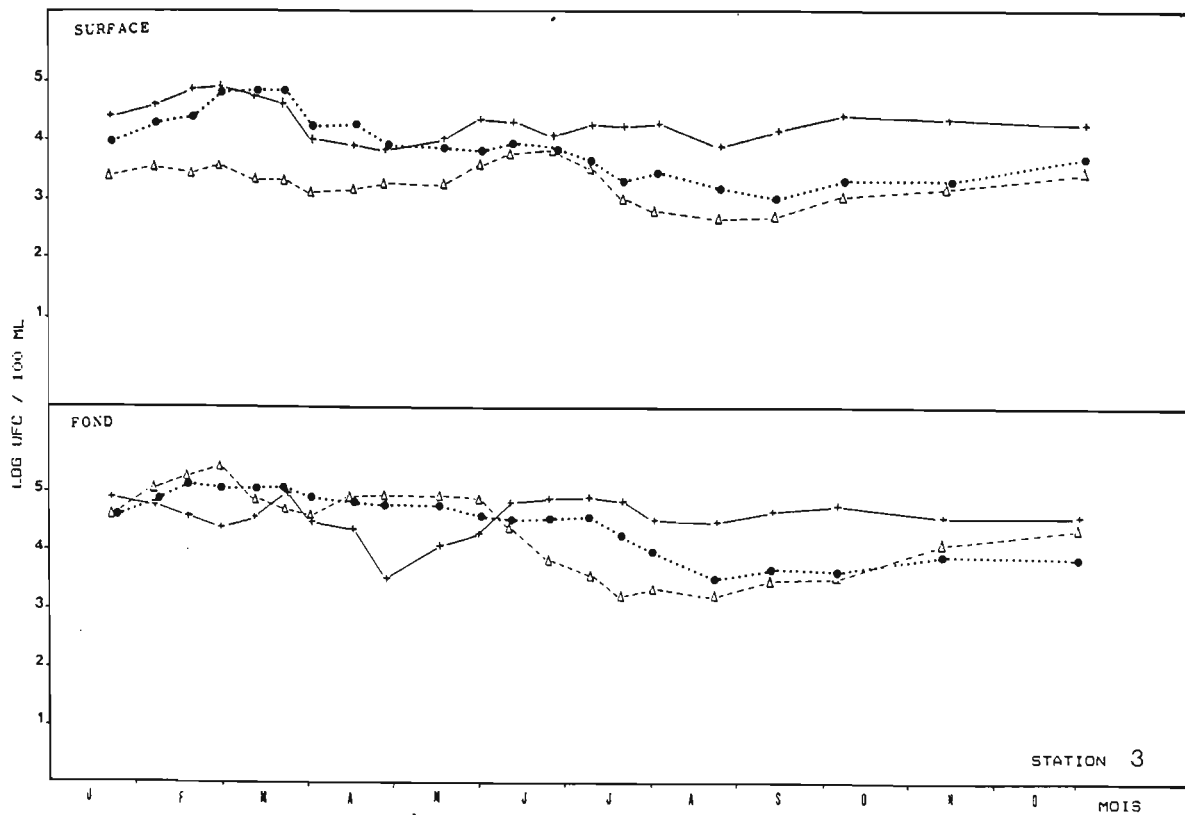
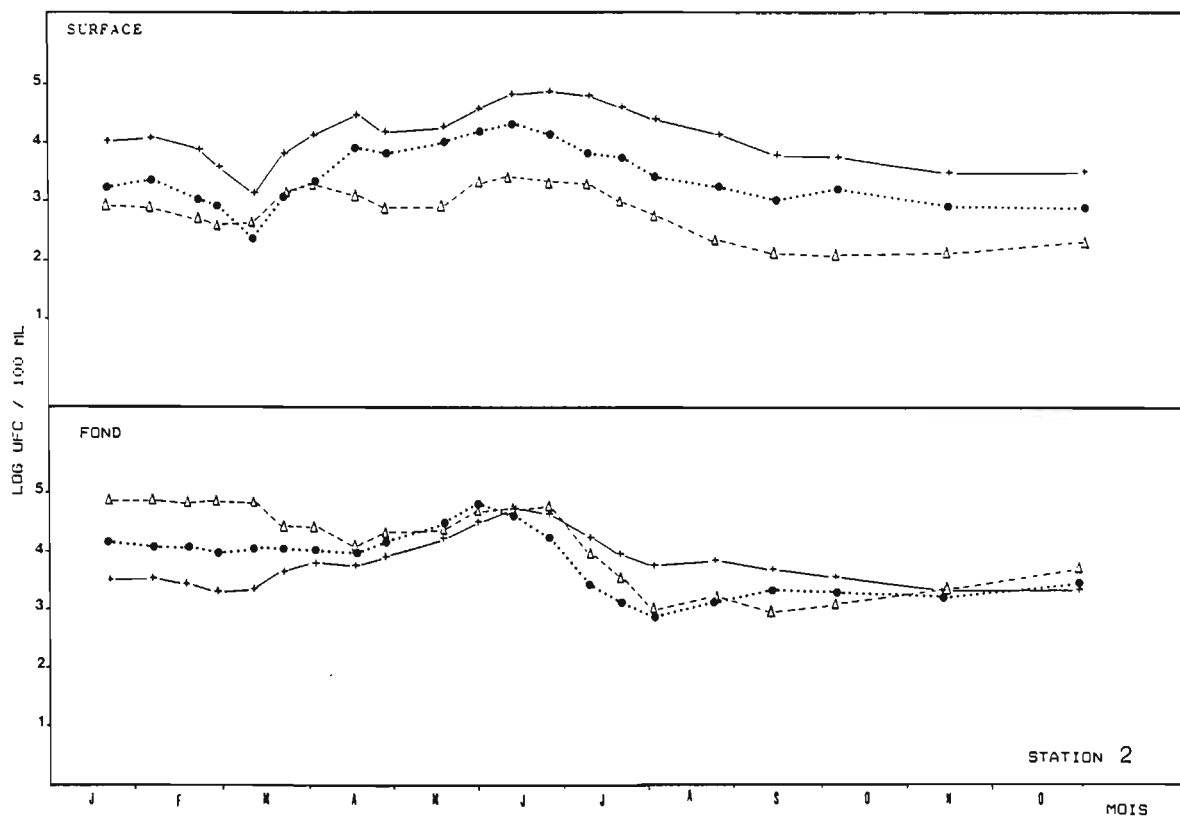


Figure 41b : Evolution saisonnière des concentrations d'*Escherichia coli* (+—+), des entérocoques (●---●) et des *Clostridium perfringens* (△---△) en surface et en profondeur de la station 2 et de la station 3 (Représentation en moyenne mobile).



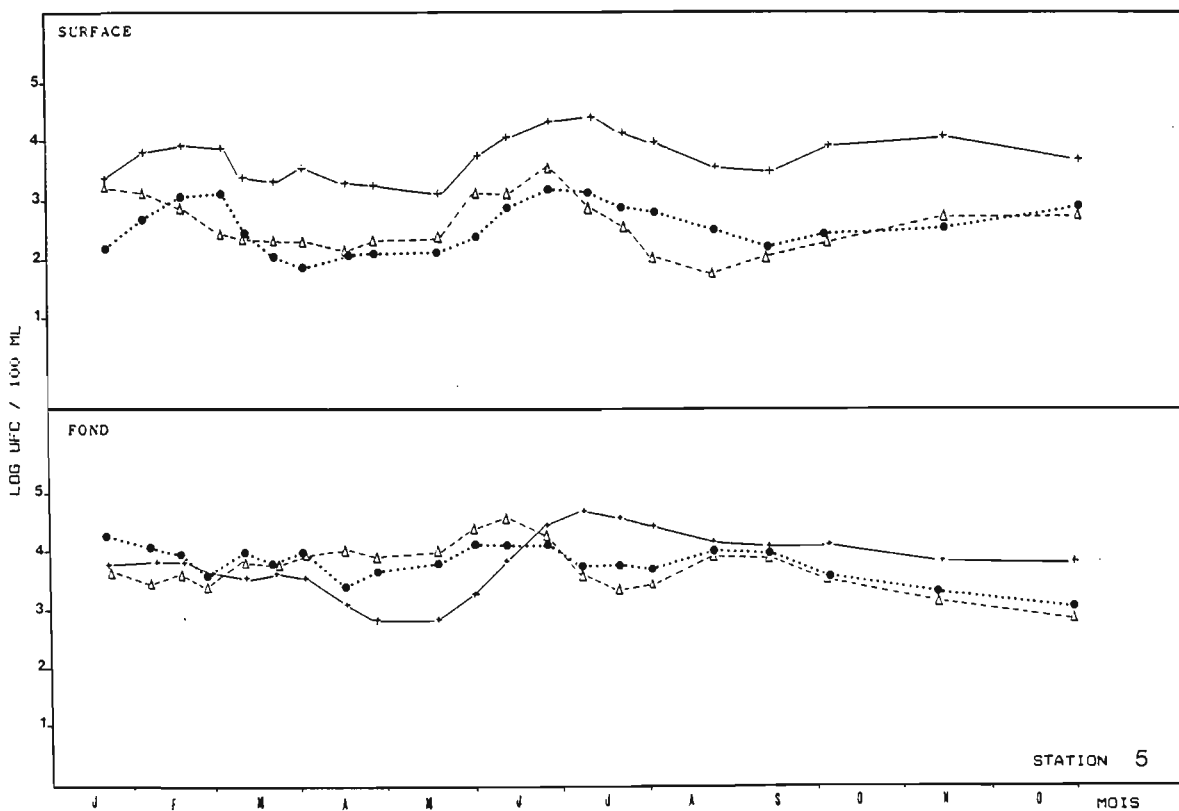
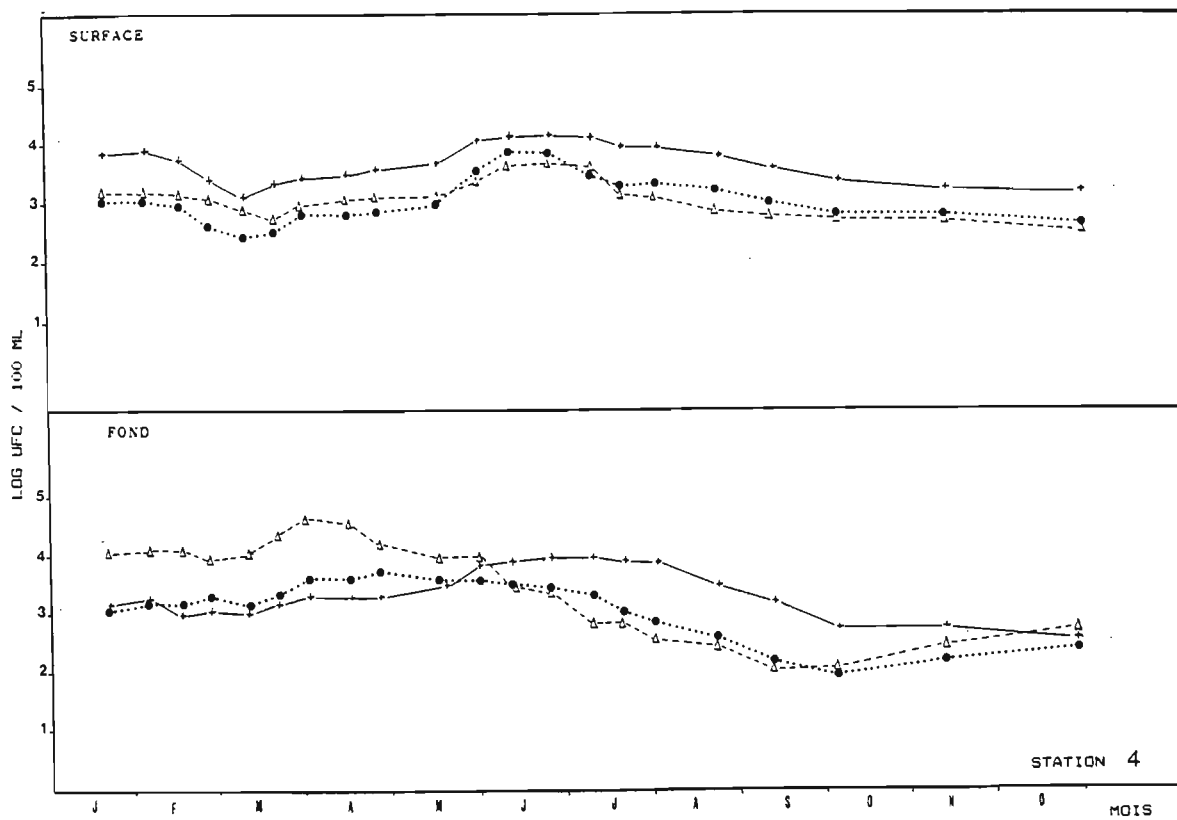


Figure 41c : Evolution saisonnière des concentrations d'*Escherichia coli* (+---+), des entérocoques (●---●) et des *Clostridium perfringens* (Δ---Δ) en surface et en profondeur de la station 4 et de la station 5 (Représentation en moyenne mobile).

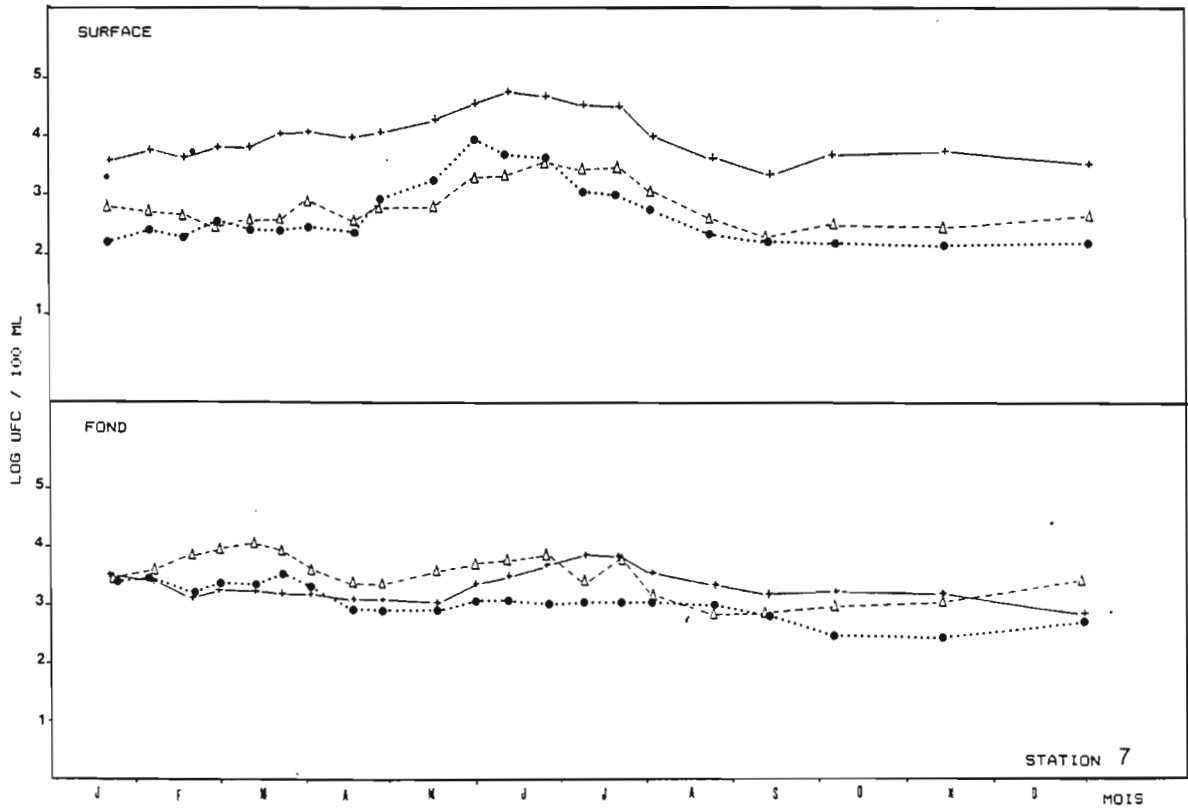
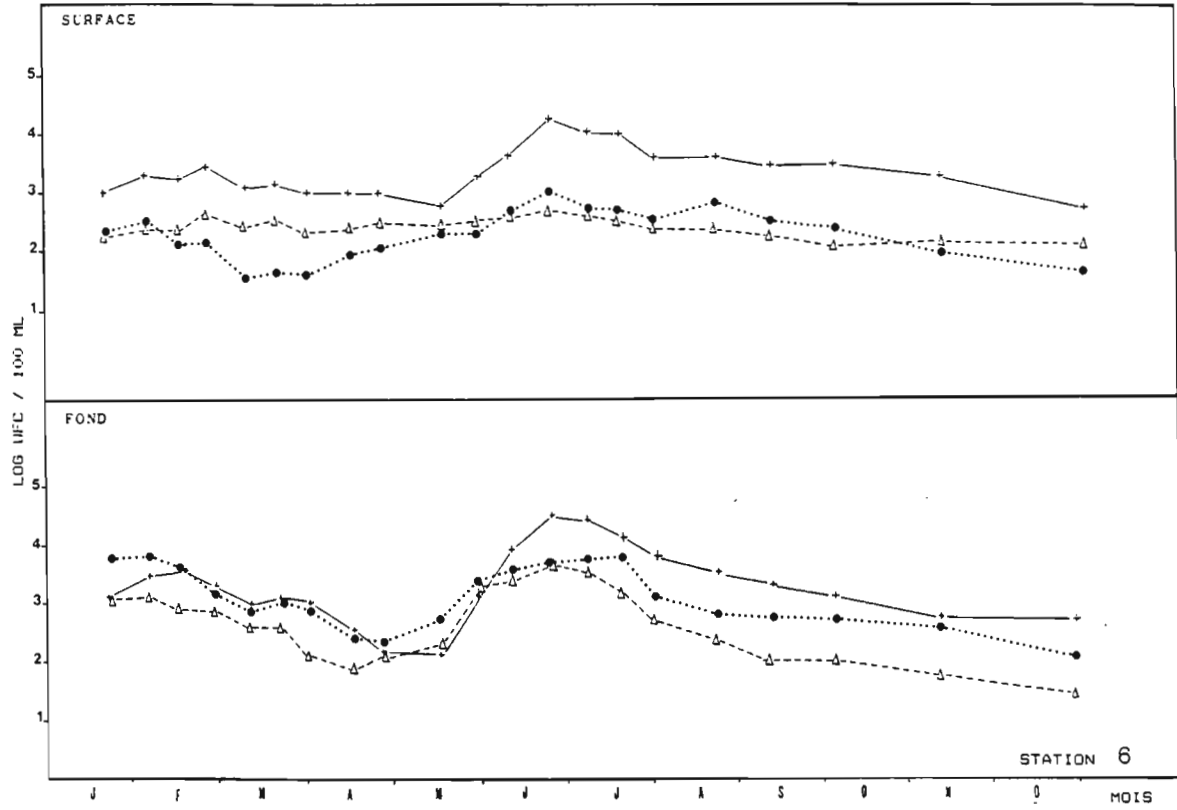


Figure 41d : Evolution saisonnière des concentrations d'*Escherichia coli* (+---+), des entérocoques (●---●) et des *Clostridium perfringens* (Δ---Δ) en surface et en profondeur de la station 6 et de la station 7 (Représentation en moyenne mobile).

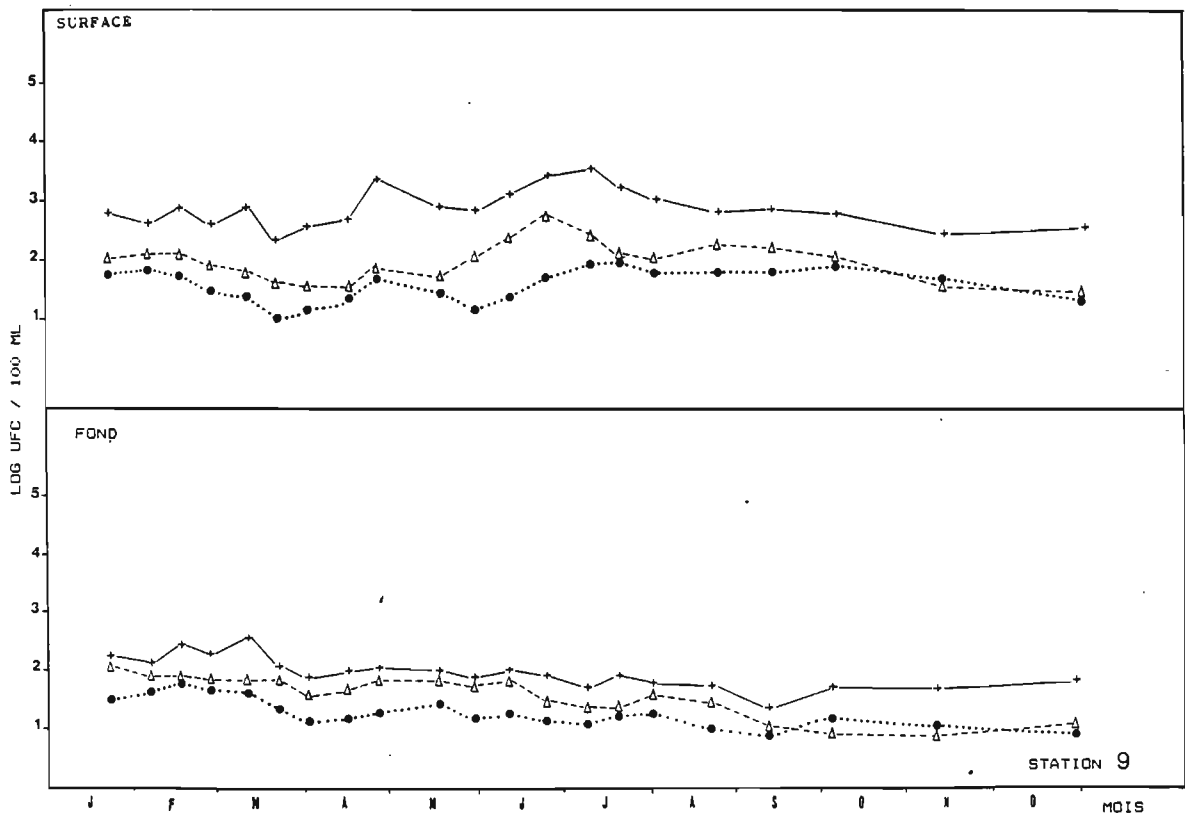
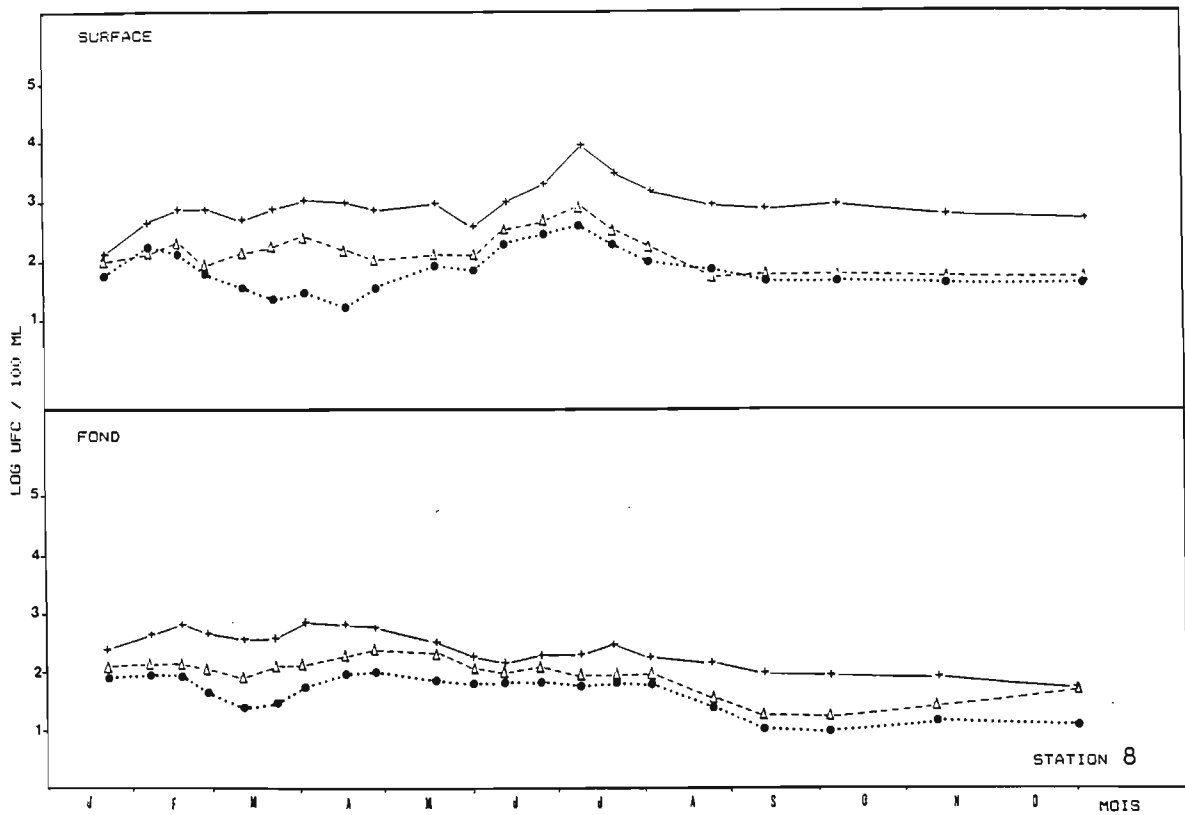


Figure 41e : Evolution saisonnière des concentrations d'*Escherichia coli* (+---+), des entérocoques (●---●) et des *Clostridium perfringens* (Δ---Δ) en surface et en profondeur de la station 8 et de la station 9 (Représentation en moyenne mobile).

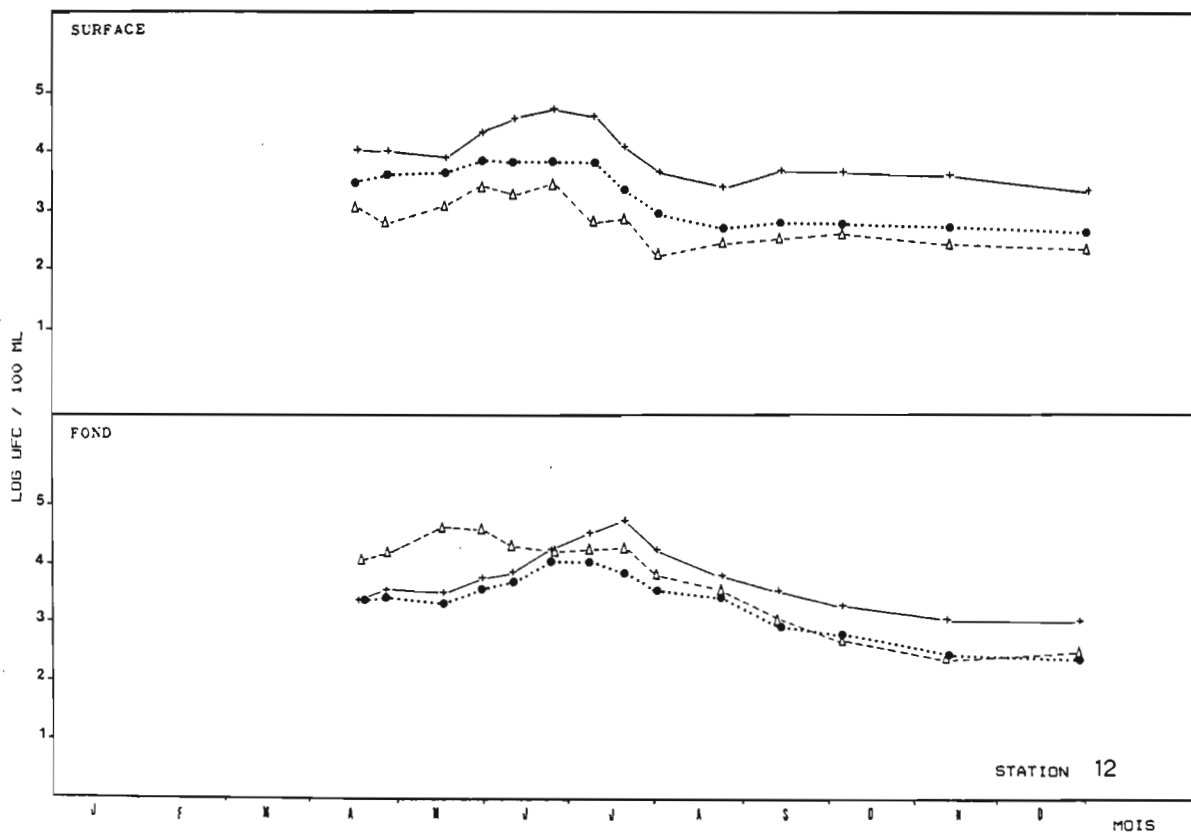
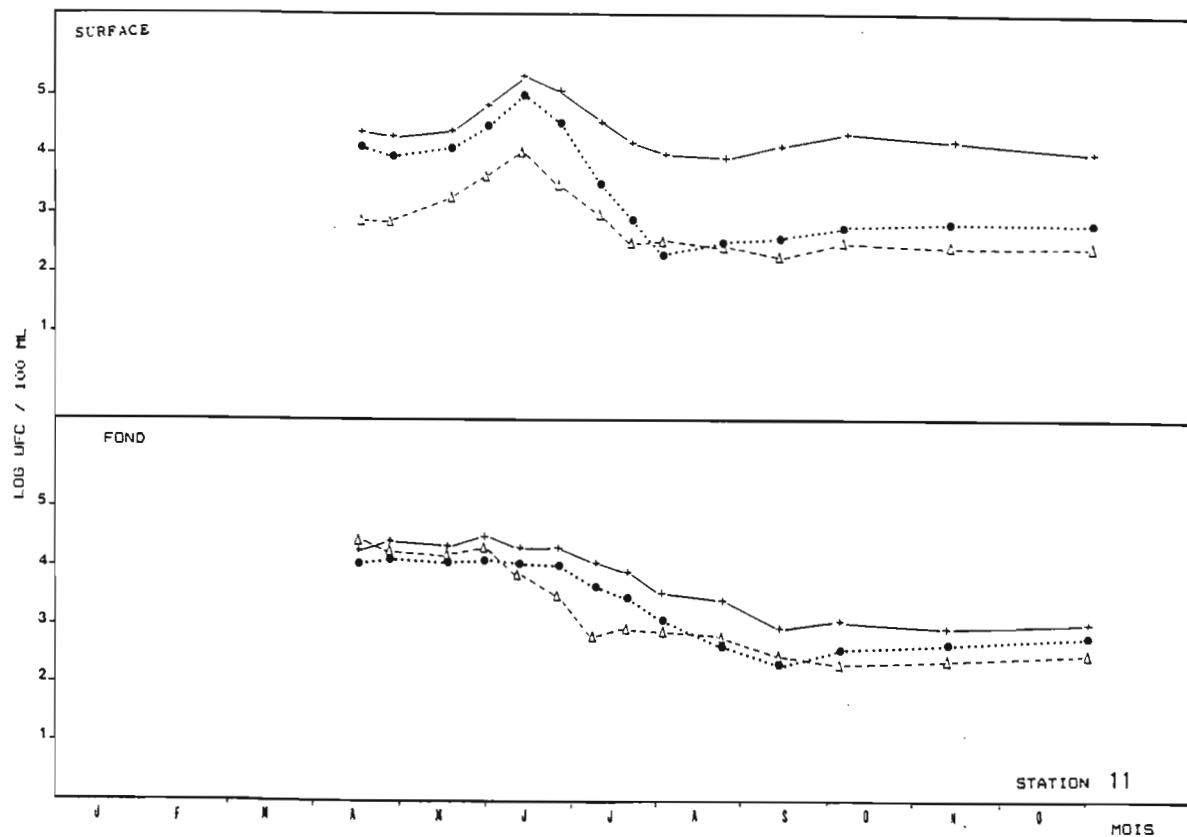


Figure 41f : Evolution saisonnière des concentrations d'*Escherichia coli* (+—+), des entérocoques (•---•) et des *Clostridium perfringens* (Δ---Δ) en surface et en profondeur de la station 11 et de la station 12 (Représentation en moyenne mobile).