

## Etude expérimentale de l'effet de *Synechocystis* sp. (picocyanobactérie) sur le comportement de certaines bactéries d'intérêt sanitaire

K. Oufdou<sup>1</sup>  
N. Mezrioui<sup>1</sup>  
B. Oudra<sup>2</sup>  
Y. Ouhdouch<sup>1</sup>

Mots clés : *Synechocystis*, bactéries, substances intracellulaires, substances extracellulaires.

Dans les écosystèmes aquatiques, le comportement des populations bactériennes est régi par des facteurs biotiques, principalement par les microalgues. L'objectif de ce travail consiste à déterminer l'action, non encore élucidée, d'une picocyanobactérie Chroococcale : *Synechocystis* sp. sur le comportement de certaines bactéries d'intérêt sanitaire (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp. et *Vibrio cholerae* non-O1). Cette algue qui domine dans les eaux usées du lagunage de Marrakech en période chaude, a été isolée et cultivée au laboratoire sous des conditions contrôlées de lumière et de température.

Les substances extracellulaires et intracellulaires de la culture algale ont été testées vis-à-vis des bactéries étudiées. Les substances extracellulaires libérées au cours de la phase stationnaire de croissance de *Synechocystis* sp. et qui ont été récoltées dans le surnageant de la culture algale, réduisent la croissance d'*E. coli* et de *Salmonella* sp. et stimulent celle de *V. cholerae* non-O1. Aussi, les substances intracellulaires, obtenues après l'éclatement des cellules algales par l'éther, exercent un effet réducteur de la croissance d'*E. coli* et de *Salmonella* sp.. Les produits élaborés par *Synechocystis* sp. en culture non axénique (en présence de bactéries hétérotrophes) réduisent beaucoup plus la croissance d'*E. coli* et de *Salmonella* sp. en comparaison avec ceux libérés par la même microalgue mais en culture axénique.

La dominance de cette picocyanobactérie, surtout en période chaude, dans les eaux usées du second bassin de lagunage de Marrakech, pourrait contribuer à l'explication de la dynamique et de la survie des bactéries étudiées (*E. coli*, *Salmonella* sp. et *V. cholerae* non-O1) au sein de cet écosystème aquatique fonctionnant sous climat méditerranéen aride.

### Experimental study of the effect of *Synechocystis* sp. (picocyanobacteria) on the behaviour of some bacteria of sanitary interest

Keywords : *Synechocystis*, bacteria, extracellular products, intracellular products.

In aquatic ecosystems, bacterial behaviour is controlled by several biotic factors, especially by microalgae. The aim of this study is to determine the effect of a picocyanobacteria Chroococcale : *Synechocystis* sp. on the behaviour of some bacteria (*Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and non-O1 *Vibrio cholerae*). Blooms of this algae occur during hot periods in wastewater stabilization ponds of Marrakesch. The alga was isolated from the ponds and cultivated in the laboratory at controlled conditions of light and temperature.

Extracellular and intracellular products released by this microalga were tested on the bacteria. Extracellular products obtained at the supernatant of algal culture in stationary phase, reduced *E. coli* and *Salmonella* sp. growth and stimulated growth of non-O1 *V. cholerae*. Intracellular products obtained after lysing algal cells by ether, reduced *E. coli* and *Salmonella* sp. growth. The effect of products released by *Synechocystis* sp. was compared for the axenic and the non axenic algal strain. The results showed that the presence of heterotrophic bacteria increased the reduction of *E. coli* and *Salmonella* sp. growth by extracellular and intracellular products of *Synechocystis* sp..

Blooms of this picocyanobacteria in waste stabilization ponds of Marrakesch, could explain the dynamics and survival of bacteria studied in this ecosystem which functions under an arid mediterranean climate.

---

1. Laboratoire de Microbiologie, 2. Laboratoire d'Algologie, Département de Biologie, Faculté des Sciences Semlalia, Université Cadi Ayyad, B.P. S 15 Marrakech, 40001 Maroc.

## 1. Introduction

Dans les écosystèmes aquatiques, les algues et les bactéries constituent deux compartiments biologiques dont l'importance écologique est capitale. Les interactions bénéfiques (Cole 1982, Fabregas & Veiga 1984, Colwell & Speidel 1985) ou néfastes (Forlani et al. 1989, Cano et al. 1990) qui peuvent exister entre ces deux populations, contribuent aux phénomènes de l'auto-épuration.

Dans les bassins du lagunage naturel de Marrakech fonctionnant sous climat méditerranéen aride (31°36 Nord, 8°02 Ouest, 471 m d'altitude, Maroc), on assiste souvent, en période chaude, à l'apparition d'efflorescences algales avec une dominance des cyanobactéries. Ces algues bleues vertes appelées aussi cyanophycées sont essentiellement représentées par l'espèce *Synechocystis* sp. surtout au niveau du second bassin de lagunage (Oudra 1990). Dans cet écosystème aquatique, l'apparition de cette espèce algale coïncide généralement avec des abondances élevées de *Vibrio cholerae* non-O1 (Oufdou 1994, Mezrioui et al. 1995) et des abondances faibles des coliformes fécaux et de *Salmonella* sp. (Boussaïd 1987, Mezrioui 1995).

D'après les données bibliographiques, il apparaît que la relation entre les cyanobactéries et les bactéries, n'est pas encore bien élucidée et les études réalisées dans ce domaine restent très fragmentaires (Caire et al. 1993, Fish & Codd 1994). En effet, peu de travaux se sont intéressés à l'étude des composés bioactifs libérés par les cyanobactéries dans les bassins de traitement des eaux usées par lagunage. Les connaissances fondamentales sur le rôle écologique et sanitaire joué par les cyanobactéries vis-à-vis des bactéries précitées, restent partielles.

La présente étude, réalisée en microcosme, vise à déterminer l'action que peut exercer la picocyanobactérie unicellulaire : *Synechocystis* sp. sur le comportement et la survie de certaines bactéries d'intérêt sanitaire (Coliformes fécaux, *Salmonella* sp. et *V. cholerae* non-O1).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Souches algale et bactériennes étudiées

L'espèce responsable des efflorescences algales dans le lagunage de Marrakech est une picocyanobactérie chroococcoid unicellulaire, *Synechocystis* sp., dont la taille varie de 0,6 à 0,9 µm de diamètre (Oudra 1990). La biomasse picoplanctonique (taille de 0,2 à 2 µm) composée essentiellement de *Synechocystis* sp. (95 %) a été estimée par le dosage de la chlorophylle a selon la méthode de fractionnement en classe de taille par double filtration (Whatman GF/C, porosité : 1,2

µm et Millipore, porosité : 0,45 µm) (Oudra 1990). Les résultats obtenus ont montré que la fraction picoplanctonique présente une biomasse pigmentaire élevée en période chaude dans le second bassin de lagunage de Marrakech. La teneur moyenne en chlorophylle a, en été, a été de 236,5 µg/l, tandis qu'en période froide (hiver), la teneur moyenne a été seulement de 33 µg/l (Tableau 1). La biomasse picoplanctonique a

Tableau 1. Evolution saisonnière de la biomasse picoplanctonique (*Synechocystis* sp.) dans les bassins du lagunage de Marrakech, estimée par le dosage de la chlorophylle a en µg / l (Oudra 1990).

Table 1. Seasonal development of picoplanktonic biomass (*Synechocystis* sp.) in wastewater stabilization ponds of Marrakesch, evaluated by the dosage of chlorophyll a (µg / l) (Oudra 1990).

Saison	Bassin 1 (anaérobie)	Bassin 2 (facultatif)
Hiver	31,8	33
Printemps	17,3	50
Eté	28,2	236,5
Automne	23,7	58

été estimée par comptage des cellules de *Synechocystis* sp. sur des lames de Malassez (0,2 mm de profondeur) selon la technique décrite par Sournia (1978). Le nombre de cellules de *Synechocystis* sp. variait de 10<sup>7</sup> à 6,5 10<sup>8</sup> cellules / ml au cours de la période chaude dans le second bassin facultatif du lagunage (Oudra 1990).

La souche algale étudiée, *Synechocystis* sp., a été isolée des eaux usées du lagunage de Marrakech. Elle a été cultivée, purifiée et rendue axénique par repiquages successifs sur le milieu gélosé BG13 (Ferris & Hirsch 1991).

Les souches bactériennes testées ont été : *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. et *V. cholerae* non-O1. Pour mieux apprécier l'effet de *Synechocystis* sp. sur les bactéries étudiées, toutes les souches bactériennes ont été isolées, en double, à partir des eaux usées brutes. Les colonies correspondantes à *E. coli* ont été isolées après étalement d'un volume de 0,1 ml de l'eau usée brute sur le milieu sélectif au TTC (2,3,5 Triphenyl Tetrazolium Chloride) et Tergitol 7 (Institut Pasteur Production : IPP) et incubation à 44,5°C pendant 24 heures. Les colonies jaunes ayant un aspect caractéristique d'*E. coli* ont été identifiées, par la suite, par la microméthode API 20E (API système- France).

Les colonies correspondantes aux souches de *Salmonella* sp. ont été prélevées sur milieu de culture sélectif *Salmonella-Shigella*-Agar (Difco). Elles ont été ensuite purifiées sur gélose nutritive, puis identifiées à l'aide du milieu de Kligler et de la galerie API Z (API système-France).

Les colonies correspondantes aux souches de *V. cholerae* non-O1 ont été isolées sur le milieu gélosé TCBS (Thiosul-

fate-Citrate-Bile salts-Sucrose, Difco), purifiées sur gélose nutritive (IPP) puis identifiées suivant la technique décrite par Mezrioui et al. (1995).

Toutes les souches bactériennes utilisées dans cette étude, ont été cultivées sur la gélose trypto-caseïne de soja pendant 18 h. à 37°C, puis des colonies correspondantes à chaque souche bactérienne testée, ont été mises en suspension monobactérienne dans de l'eau usée préalablement filtrée (filtre Whatman GF/C) et autoclavée pendant 15 min. à 120°C et constituaient de ce fait l'inoculum initial (environ 10<sup>4</sup> unités formant colonies / ml).

Les abondances bactériennes et algales choisies dans cette étude sont comparables à celles mesurées *in situ* (Oudra 1990, Mezrioui & Echab 1995, Mezrioui & Oufdou 1996).

## 2.2. Effet des substances extracellulaires de *Synechocystis* sp.

*Synechocystis* sp. a été cultivée dans une eau usée prélevée dans le premier bassin du lagunage, puis filtrée (filtre Whatman GF/C) et autoclavée pendant 15 minutes à 120°C.

L'incubation des cultures algales a été réalisée dans une chambre thermostatée (température de 27° ± 1°C) et éclairée (14 heures : lumière / 10 heures : obscurité) à une intensité de 50 µE / m<sup>2</sup> / s. Pour favoriser leur croissance, les cultures algales ont été placées sur une table d'agitation tournante (100 tours/min.).

Les substances extracellulaires produites par *Synechocystis* sp. ont été récoltées dans le surnageant de la culture algale en phase exponentielle et stationnaire de croissance après une centrifugation à 3000 g pendant 30 minutes. Le surnageant de la culture de *Synechocystis* sp. a été ajusté au pH du milieu témoin (pH 7,4) avec des solutions de NaOH (1 N) ou d'HCl (1 N) stérilisées par autoclavage (15 minutes à 120°C). Ce surnageant a été ensuite filtré sous dépression (filtre Millipore), et réparti à raison de 10 ml dans des tubes en verre stériles. Ces tubes ont été ensuite inoculés par les souches bactériennes testées, et incubés à la température ambiante (22 ± 1°C). Le milieu témoin utilisé a été l'eau usée filtrée et autoclavée qui est de même nature que celle ayant déjà servi pour la culture de *Synechocystis* sp..

Pour chaque souche bactérienne étudiée, 3 répétitions ont été considérées par ensemencement d'une série de 3 tubes par le même inoculum bactérien. Chaque dénombrement bactérien a été réalisé sur deux boîtes de gélose nutritive, ce qui permet d'avoir une moyenne de 6 valeurs correspondant aux abondances de la bactérie testée. Le dénombrement bactérien a été réalisé après 24 heures d'incubation à 37°C par comptage des unités formant colonies (U. F. C.) après étalement sur gélose nutritive.

Le traitement statistique des résultats a été réalisé par le test non paramétrique de Mann-Whitney (MW) qui permet la comparaison de toutes les abondances des souches bactériennes après 24 heures d'incubation dans le surnageant de la culture algale et dans le milieu témoin.

## 2.3. Effet des substances intracellulaires de *Synechocystis* sp.

Pour avoir une meilleure extraction des substances à activité biologique à partir des cyanobactéries, plusieurs solvants organiques peuvent être testés. Des auteurs ont choisi le méthanol (Cano et al. 1990, Mulé et al. 1996) alors que certains auteurs ont choisi d'autres solvants : éther, éthanol, dichlorométhane... (Cano et al. 1986, Patterson et al. 1993). Dans notre travail, une étude préliminaire a révélé que l'éther permet de mettre en évidence la production des substances antibactériennes par *Synechocystis* sp. dans les conditions expérimentales précitées.

Ainsi, les cellules de *Synechocystis* sp. ont été récoltées dans le culot de la culture algale en phase stationnaire de croissance, après centrifugation à 3000 g pendant 30 minutes. Ces cellules ont subi l'action de l'éther pendant une nuit. Le solvant a été évaporé au rotavapor et l'extrait a été repris dans 15 ml de l'eau distillée. Par la suite, cet extrait a été centrifugé à 3000 g pendant 30 minutes pour éliminer les débris des algues dans le culot. Le surnageant (10 ml par tube) contient ainsi les substances intracellulaires dont l'effet a été testé sur la croissance des souches bactériennes étudiées. Le milieu témoin a été l'eau distillée répartie à raison de 10 ml par tube. Les conditions d'ensemencement de ces tubes ainsi que leur incubation sont les mêmes que celles réalisées pour la détermination de l'effet des substances extracellulaires de *Synechocystis* sp..

## 2.4. Effet de la flore bactérienne totale sur la production des métabolites sécrétés par *Synechocystis* sp.

Dans les écosystèmes aquatiques tels que le lagunage de Marrakech, les algues ne sont pas seules. Elles interagissent avec plusieurs autres compartiments biologiques, principalement avec les bactéries. L'objectif de cette étude a été de déterminer l'effet de la présence des bactéries hétérotrophes, d'une part, sur la croissance de la souche axénique de *Synechocystis* sp., et d'autre part, sur la production des produits bioactifs par cette microalgue.

L'échantillon d'eaux usées, prélevé dans le premier bassin du lagunage de Marrakech, a été filtré (filtre Whatman GF/C) et autoclavé pendant 15 minutes à 120°C. L'eau usée a été ensuite répartie dans 3 Erlenmeyers de 1 litre à raison de 700 ml chacun. Le premier Erlenmeyer a été ensemencé par la souche axénique de *Synechocystis* sp. avec un inoculum initial de 8 x 10<sup>5</sup> cellules algales / ml. Le deuxième Erlenmeyer a été ensemencé par le même inoculum de *Synechocystis* sp. et des bactéries hétérotrophes isolées à partir des eaux usées brutes. Le troisième Erlenmeyer a été ensemencé par les bactéries hétérotrophes seules. L'inoculum bactérien initial (3,5 x 10<sup>4</sup> U. F. C. / ml) a été réalisé par mise en suspension, dans 10 ml d'eau usée autoclavée et filtrée, des colonies ayant poussé sur une boîte de gélose nutritive (IPP) préalablement ensemencé avec de l'eau usée brute et incubée à 25°C pendant 5 à 7 jours (Imzilen & Hassani 1990). Ces trois microcosmes placés sur une table d'agitation tournante (100 tours/min.), ont été incubés dans une chambre thermostatée et éclairée comme déjà décrit.

Dans ces microcosmes, nous avons réalisé un suivi journalier de la croissance algale par comptage des cellules algales sur des lames de Malassez. Le taux de croissance a été déterminé à partir de la formule :  $\mu = \ln(Nt/No) / (t-t_0)$  où  $No$  est le nombre initial de cellules algales à  $t_0$  et  $Nt$  est le nombre de cellules algales après l instant  $t$  (Guillard 1973).

Le dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies cultivables a été fait par un comptage des unités formant colonies (U.F.C.) sur la gélose nutritive (IPP) incubée pendant 5 à 7 jours à 25°C. Le pH et le carbone organique dissous dans les milieux réactionnels étudiés ont été également mesurés. Le pH est mesuré en utilisant un pH-mètre (Orion Research, modèle 601 A). Le carbone organique a été estimé à partir de la D.C.O. (Demande Chimique en Oxygène). Selon Akiyama (1973), et Somiya & Fujii (1984), le rapport D.C.O. / Carbone organique a été estimé à 3, aussi bien pour les bactéries, pour les algues (ou matière organique produite par les algues) que pour les eaux usées.

En phase stationnaire de croissance algale, les substances extracellulaires et intracellulaires ont été récoltées selon la méthodologie déjà citée et ont été testées vis-à-vis des souches d'*E. coli*, de *Salmonella* sp. et de *V. cholerae* non-O1.

### 3. Résultats et discussion

#### 3.1. Effet des substances extracellulaires de *Synechocystis* sp.

Le comportement des bactéries étudiées dans le surnageant de la culture algale contenant les produits libérés par *Synechocystis* sp. durant sa phase exponentielle de croissance, n'a pas été le même (Fig. 1). Ces substances ont stimulé d'une manière significative (test de MW,  $p < 0,05$ ) la croissance d'*E. coli* et de *V. cholerae* non-O1 comparativement à celle évaluée au niveau du témoin. Tandis qu'aucune différence significative n'a été observée en présence des produits libérés par *Synechocystis* sp. en phase exponentielle de croissance pour *Salmonella* sp..

Par contre, durant la phase stationnaire de croissance algale, *Synechocystis* sp. a libéré des substances qui ont réduit significativement (test de MW,  $p < 0,05$ ) les abondances d'*E. coli* et de *Salmonella* sp. comparativement à celles évaluées au niveau du témoin (Fig. 2). Les taux de réduction des abondances d'*E. coli* (souche 1) et de *Salmonella* sp. (souche 1) ont été de 85 et 90 % respectivement (Tableau 2). Par contre, sous les mêmes conditions expérimentales, les abondances de *V. cholerae* non-O1 (souche 1) se trouvent significativement stimulées avec un pourcentage d'accroissement de 89,4 %.

Ces résultats suggèrent que l'état physiologique de *Synechocystis* sp. détermine l'effet des substances éla-

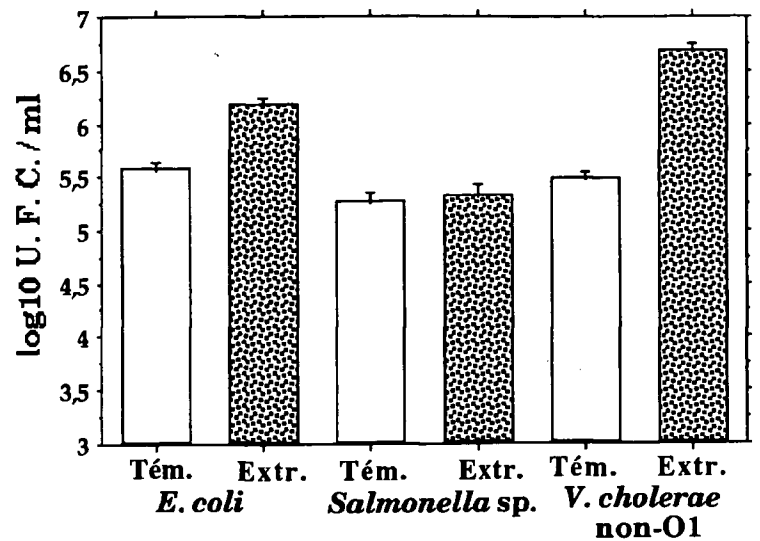


Fig. 1. Abondances moyennes, avec intervalles de confiance (95%,  $n = 6$ ), d'*E. coli* (souche 1), de *Salmonella* sp. (souche 1) et de *V. cholerae* non-O1 (souche 1) en présence (Extr.) et en absence (Tém.) des substances extracellulaires de *Synechocystis* sp. en phase exponentielle de croissance.

Fig. 1. Mean densities, with confidence intervals (95 %,  $n = 6$ ), of *E. coli* (strain 1), *Salmonella* sp. (strain 1) and non-O1 *V. cholerae* (strain 1) in the presence (Extr.) and the absence (Tém.) of extracellular products from *Synechocystis* sp. at the exponential phase of growth.

Tableau 2. Pourcentages de réduction ou de stimulation de la croissance d'*E. coli*, de *Salmonella* sp. et de *V. cholerae* non-O1 en présence des substances extracellulaires de *Synechocystis* sp. en phase exponentielle et stationnaire de croissance.

Table 2. Reduction or stimulation (in percentage) of growth in *E. coli*, *Salmonella* sp. and non-O1 *V. cholerae* in the presence of extracellular products of *Synechocystis* sp. in exponential and stationary phase of growth.

	Phase exponentielle	Phase stationnaire
<i>E. coli</i>		
Souche 1	+ 74,6	- 85
Souche 2	+ 72,9	- 84,6
<i>Salmonella</i> sp.		
Souche 1	+ 13,6*	- 90
Souche 2	+ 15,2**	- 88,1
<i>V. cholerae</i> non-O1		
Souche 1	+ 93,7	+ 89,4
Souche 2	+ 93,9	+ 85

\* Stimulation de croissance bactérienne non significative (test de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).

- : Réduction de croissance bactérienne,

+ : Stimulation bactérienne.

borées par cette algue sur les bactéries étudiées. Les substances antibactériennes de *Synechocystis* sp. n'ont été libérées qu'au cours de la phase stationnaire de croissance algale. Ces substances présentant un effet antibactérien sur *E. coli* et sur *Salmonella* sp., seraient donc des métabolites secondaires libérés par *Synechocystis* sp. dans des conditions nutritionnelles limitantes. Ces substances antibactériennes n'ont pas présenté cependant cet effet sur *V. cholerae* non-O1. La libération de produits antibactériens par les Cyanobactéries, a déjà été rapportée (Mason et al. 1982, Flores & Wolk 1986, Cannell et al. 1988, Caire et al. 1993, Fish & Codd 1994).

La nature et la production des produits extracellulaires des algues ont été l'objet de plusieurs travaux (Fogg 1971, Hellebust 1974, Fabregas & Veiga 1984). Ces substances incluant, entre autres, des glucides, des lipides, des peptides, des phosphates organiques, des substances volatiles, des enzymes, des vitamines, des facteurs de croissance,... pourraient exercer des effets stimulants pour la croissance de certaines bactéries comme c'est le cas dans notre étude pour *V. cholerae* non-O1 ou au contraire des effets inhibiteurs vis-à-vis d'autres bactéries comme c'est le cas d'*E. coli* et de *Salmonella* sp..

### 3.2. Effet des substances intracellulaires de *Synechocystis* sp.

L'étude des substances intracellulaires n'a été réalisée qu'au cours de la phase stationnaire de croissance algale. En effet, la libération de ces substances intracellulaires après la lyse des cellules algales ne se produit pas dans la phase exponentielle mais surtout vers la fin de la phase stationnaire.

Les résultats obtenus ont montré que ces substances extraites par l'éther, ont réduit les abondances des cellules cultivables d'*E. coli* et de *Salmonella* sp. (Fig. 3) par rapport au témoin (test de MW,  $p < 0,05$ ). Pour *V. cholerae* non-O1, on a remarqué que la présence de ces substances n'a pas d'effet significatif sur l'abondance des cellules cultivables des souches testées (Tableau 3), contrairement à ce qui a été observé avec les substances extracellulaires.

### 3.3. Effet de la flore bactérienne totale sur la production des métabolites sécrétés par *Synechocystis* sp.

Nous avons aussi étudié l'interaction qui pourrait exister entre *Synechocystis* sp. et les bactéries hétérotrophes qui sont abondantes dans les eaux usées du lagunage de Marrakech. Les évolutions temporelles de *Synechocystis* sp. dans le milieu réactionnel contenant

Tableau 3. Pourcentages de réduction ou de stimulation de la croissance d'*E. coli*, de *Salmonella* sp. et de *V. cholerae* non-O1 en présence des substances intracellulaires de *Synechocystis* sp. en phase stationnaire de croissance.

Table 3. Reduction or stimulation (in percentage) of growth in *E. coli*, *Salmonella* sp. and non-O1 *V. cholerae* in the presence of intracellular products of *Synechocystis* sp. in stationary phase of growth.

	% de réduction ou de stimulation
<i>E. coli</i>	
Souche 1	- 98,5
Souche 2	- 98,2
<i>Salmonella</i> sp.	
Souche 1	- 99
Souche 2	- 98,8
<i>V. cholerae</i> non-O1	
Souche 1	+ 4,6*
Souche 2	- 2,5*

\* Réduction ou stimulation de croissance bactérienne non significative (test de Mann-Whitney,  $p > 0,05$ ).

- : Réduction de croissance bactérienne,

+ : Stimulation bactérienne.

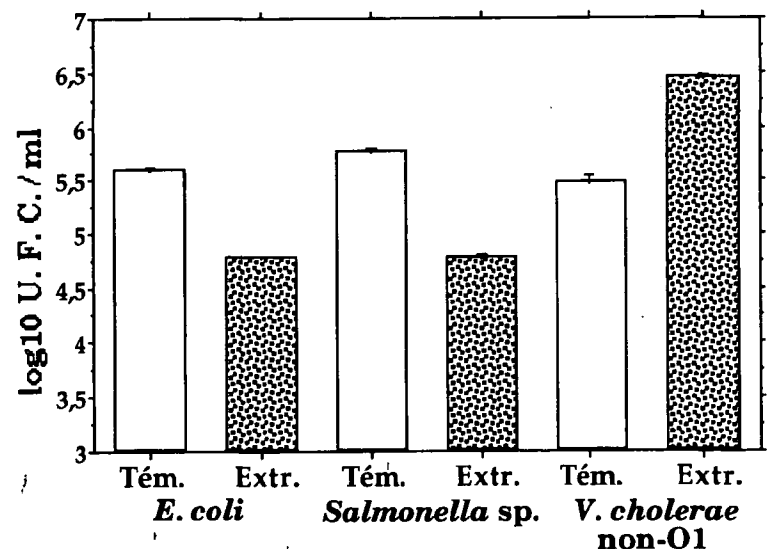


Fig. 2. Abondances moyennes, avec intervalles de confiance (95 %,  $n = 6$ ), d'*E. coli* (souche 1), de *Salmonella* sp. (souche 1) et de *V. cholerae* non-O1 (souche 1) en présence (Extr.) et en absence (Tém.) des substances extracellulaires de *Synechocystis* sp. en phase stationnaire de croissance.

Fig. 2. Mean densities, with confidence intervals (95%,  $n = 6$ ), of *E. coli* (strain 1), *Salmonella* sp. (strain 1) and non-O1 *V. cholerae* (strain 1) in the presence (Extr.) and the absence (Tém.) of extracellular products from *Synechocystis* sp. at the stationary phase of growth.

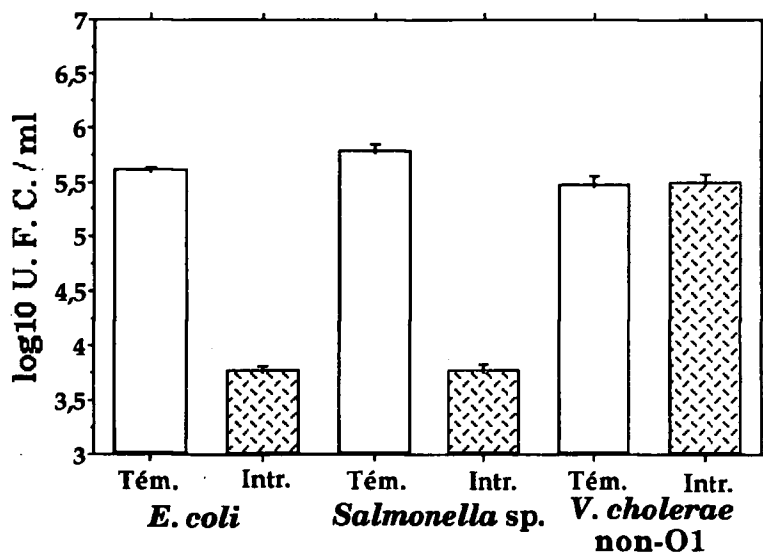


Fig. 3. Abondances moyennes, avec intervalles de confiance (95 %, n = 6), d'*E. coli* (souche 1), de *Salmonella sp.* (souche 1) et de *V. cholerae non-O1* (souche 1) en présence (Intr.) et en absence (Tém.) des substances intracellulaires de *Synechocystis sp.*.

Fig. 3. Mean densities, with confidence intervals (95%, n = 6), of *E. coli* (strain 1), *Salmonella sp.* (strain 1) and non-O1 *V. cholerae* (strain 1) in the presence (Intr.) and the absence (Tém.) of intracellular products from *Synechocystis sp.*.

*Synechocystis sp.* seule (culture axénique) et dans le milieu réactionnel contenant cette microalgue et les bactéries hétérotrophes (culture non axénique), ont été présentées sur la figure 4. L'analyse des courbes obtenues a montré que le taux de croissance de *Synechocystis sp.*, calculé durant les 6 premiers jours de l'expérimentation (phase exponentielle de croissance algale), a été significativement (test non paramétrique de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) supérieur en présence des bactéries hétérotrophes ( $\mu = 0,72 \text{ j}^{-1}$ ) qu'en leur absence ( $\mu = 0,54 \text{ j}^{-1}$ ). Cette différence de comportement de *Synechocystis sp.* peut être due à plusieurs raisons. Des études ont démontré que les bactéries peuvent stimuler la croissance des algues par production de  $\text{CO}_2$  (Tison & Lingg 1979, Chirac et al. 1985), libération de vitamines et de facteurs de croissance (Stewart & Daft 1977, Hino 1984). La réduction de la tension en  $\text{O}_2$  par les bactéries peut aussi être prise en considération dans l'interprétation de l'augmentation de la croissance algale en présence des bactéries. Escher & Characklis (1982) ont rapporté que, dans plusieurs environnements aquatiques, la fixation du carbone photosynthétique est limitée par le rapport  $\text{CO}_2 / \text{O}_2$  dans la phase aqueuse. Les microalgues produisent par photosynthèse une grande quantité d' $\text{O}_2$  dont l'accumulation inhibe la fixation du carbone et réduit par conséquent la croissance algale (Coleman & Colman 1980). Les bactéries, par leur activité de dégradation de la matière organique, consomment l'oxygène, produisent du  $\text{CO}_2$  et aussi des sels nutritifs (azote, phosphore). Tous ces

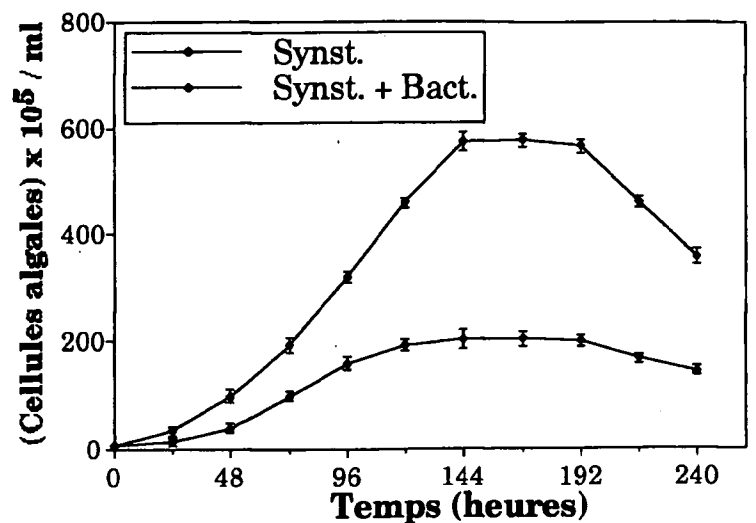


Fig. 4. Croissance de *Synechocystis sp.* (Intervalles de confiance, 95 % : n = 4) en présence (Synst. + Bact.) et en absence (Synst. : culture axénique) des bactéries hétérotrophes.

Fig. 4. Growth of *Synechocystis sp.* (Confidence intervals, 95 % : n = 4) in mixed algal-bacterial culture (Synst. + Bact.) and in axenic culture (Synst.).

éléments favoriseraient ainsi la photosynthèse et la croissance algale (Hino 1984, Dakhama 1991).

Si les bactéries hétérotrophes ont stimulé la croissance de *Synechocystis sp.*, cette même algue a exercé également un effet stimulateur sur la croissance des bactéries hétérotrophes (Fig. 5). Durant les 5 premiers jours de l'expérimentation correspondant à la phase exponentielle de *Synechocystis sp.*, les abondances des bactéries hétérotrophes ont été plus élevées en présence de cette microalgue qu'en son absence (différence significative au seuil de probabilité de 95 % :  $p < 0,05$ ). Leur taux de croissance, calculé durant les 4 premiers jours de l'expérimentation, en présence de *Synechocystis sp.* a été de  $1,75 \text{ j}^{-1}$  alors qu'en son absence, ce taux n'a été que de  $1,25 \text{ j}^{-1}$ . Cette augmentation des abondances bactériennes durant la phase exponentielle de croissance de *Synechocystis sp.*, peut s'expliquer par la production de matière organique par cette microalgue et qui pourrait être assimilée par les bactéries hétérotrophes. Dans la culture axénique de *Synechocystis sp.*, on a noté au 5ème jour de l'expérimentation, une teneur de 200 mg/l en carbone organique dissout. Par contre, dans la culture mixte, les bactéries ont assimilé la matière organique produite par *Synechocystis sp.* et la teneur en carbone organique dissout a été plus faible (114,4 mg/l) (Fig. 6 a). Certains auteurs (Burney et al. 1982, Larsson & Hagström 1982) ont estimé que jusqu'à 50 % de l'activité hétérotrophe bactérienne peut être réalisée grâce aux produits libérés par les algues.

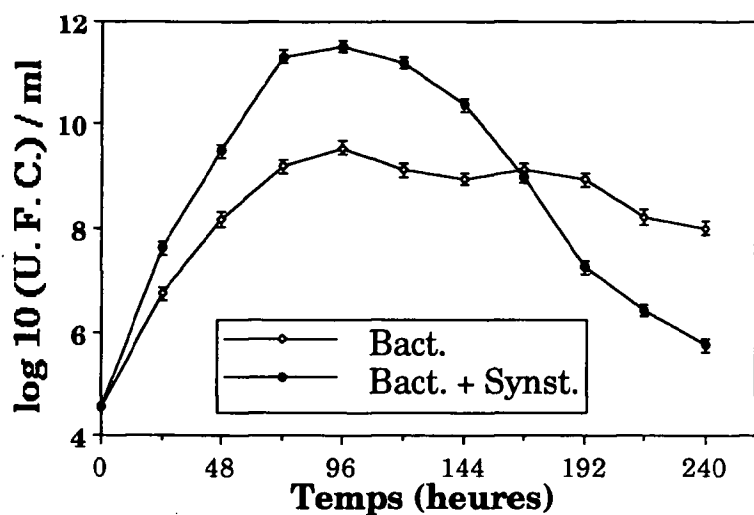


Fig. 5. Evolution temporelle des abondances des bactéries hétérotrophes (Intervalle de confiance, 95 % : n = 3) en présence (Bact. + Synst.) et en absence (Bact.) de *Synechocystis* sp..

Fig. 5. Temporal development of heterotrophic bacteria (Confidence intervals, 95 % : n = 3) in the presence (Bact. + Synst.) and the absence (Bact.) of *Synechocystis* sp..

Ce phénomène de stimulation de la croissance des bactéries hétérotrophes est analogue à celui observé avec *V. cholerae* non-O1 en présence des substances extracellulaires de cette picocyanobactérie (c. f. 3. 1.).

Si au cours des 5 premiers jours de l'expérimentation, on a assisté à une stimulation de la croissance des bactéries hétérotrophes en présence de *Synechocystis* sp., on a noté, au delà du 5ème jour (phase stationnaire de croissance de *Synechocystis* sp.), une réduction des abondances bactériennes, surtout au niveau du milieu réactionnel ensemencé par l'algue et les bactéries hétérotrophes (Fig. 5). On pourrait penser que durant la phase stationnaire de croissance de *Synechocystis* sp., cette algue a libéré dans le milieu des substances présentant une action antibactérienne. Cette diminution de survie bactérienne, en présence de *Synechocystis* sp., pourrait être également expliquée, par l'effet du facteur pH. Les valeurs de pH mesurées au cours de cette période d'étude, ont été élevées (pH > 9) en présence de cette microalgue (Fig. 6 b).

En ce qui concerne l'effet des bactéries hétérotrophes sur la production de substances extra et intracellulaires par la souche axénique de *Synechocystis* sp., on a remarqué qu'en présence de ces bactéries, les produits élaborés par cette algue, ont réduit significativement la croissance d'*E. coli* et de *Salmonella* sp. en comparaison avec ceux libérés par cette même souche algale mais en culture axénique (sans bactéries) (Figs 7 et 8). Les substances extracellulaires de la culture axénique de *Synechocystis* sp. ont réduit les abondances d'*E. coli* (souche 1) et de *Salmonella* sp. (souche 1)

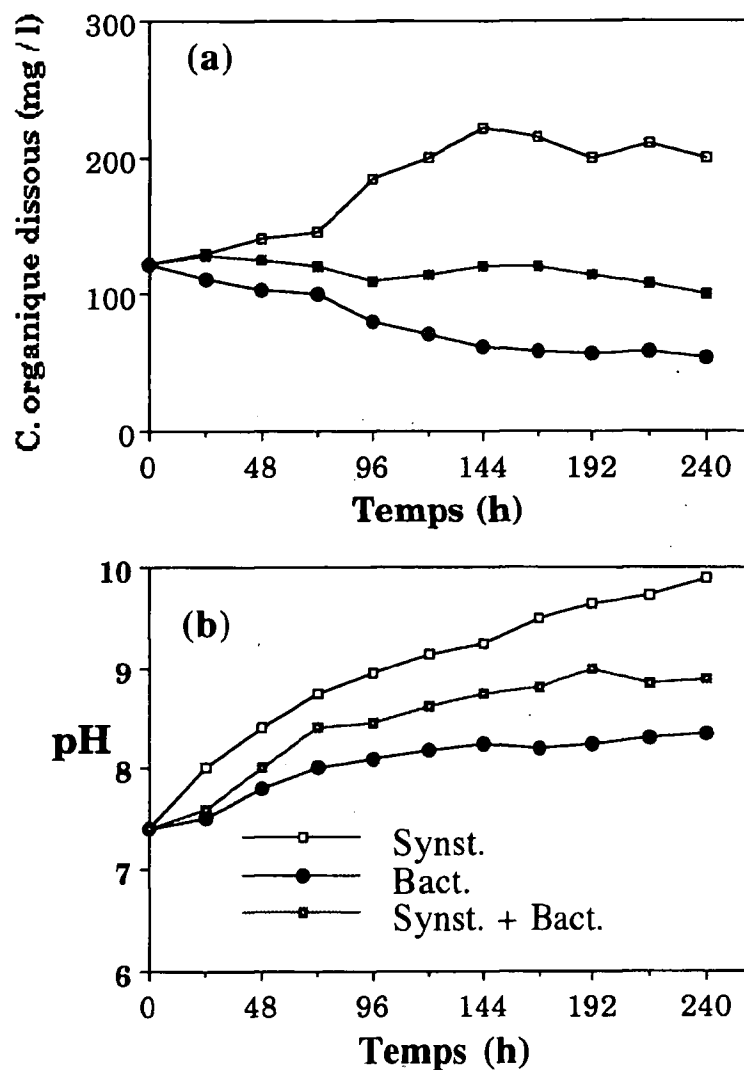


Fig. 6. Evolution temporelle du carbone organique dissous (Fig. 6a) et du pH (Fig. 6b) dans les microcosmes contenant *Synechocystis* sp. (Synst.), contenant les bactéries hétérotrophes (Bact.) et les bactéries-*Synechocystis* sp. en culture mixte (Synst. + Bact.).

Fig. 6. Temporal changes in dissolved organic carbon (Fig. 6a) and pH (Fig. 6b) in axenic *Synechocystis* sp. culture (Synst.), in bacterial culture (Bact.), and in mixed algal-bacterial culture (Synst. + Bact.).

avec des pourcentages respectifs de 85,5 % et de 89,9 %. Tandis qu'en présence de bactéries hétérotrophes, les substances extracellulaires de *Synechocystis* sp. ont entraîné une réduction significativement (test de MW,  $p < 0,05$ ) plus importante d'*E. coli* (souche 1) de 97,7 % et de *Salmonella* sp. (souche 1) de 98,3 % (Tableau 4). Cette importante réduction de la croissance d'*E. coli* et de *Salmonella* sp. en présence des produits élaborés par la culture non axénique de *Synechocystis* sp., pourrait être le résultat d'une compétition nutritionnelle entre *Synechocystis* sp. et les bactéries hétérotrophes, qui aggraverait encore l'inhibition due aux antibactériens éventuels.

Par contre, aucune augmentation significative des abondances de *V. cholerae* non-O1 n'a été observée en

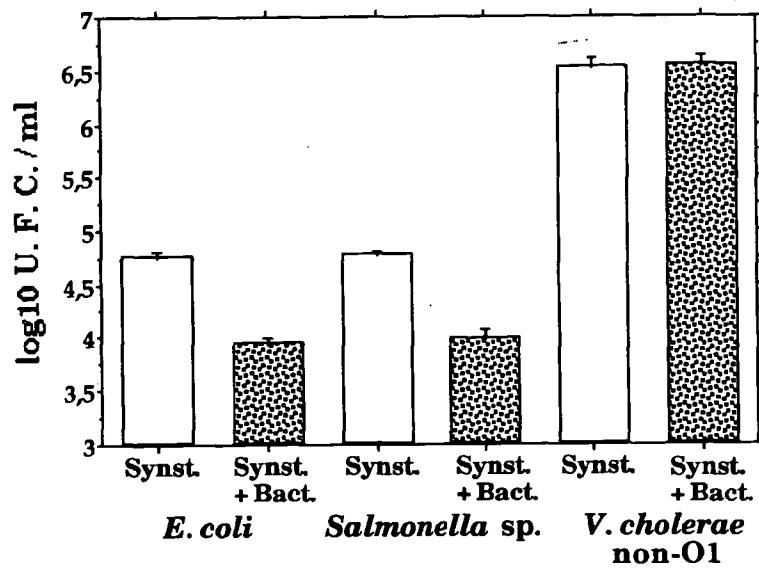


Fig. 7. Abondances moyennes, avec intervalles de confiance (95 %, n = 6), d'*E. coli* (souche 1), de *Salmonella sp.* (souche 1) et de *V. cholerae non-O1* (souche 1) en présence des substances extracellulaires de la culture axénique (Synst.) et non axénique (Synst. + Bact.) de *Synechocystis sp.*.

Fig. 7. Mean densities, with confidence intervals (95 %, n = 6), of *E. coli* (strain 1), *Salmonella sp.* (strain 1) and non-O1 *V. cholerae* (strain 1) in the presence of extracellular products of axenic (Synst.) and non axenic cultures (Synst. + Bact.) of *Synechocystis sp.*.

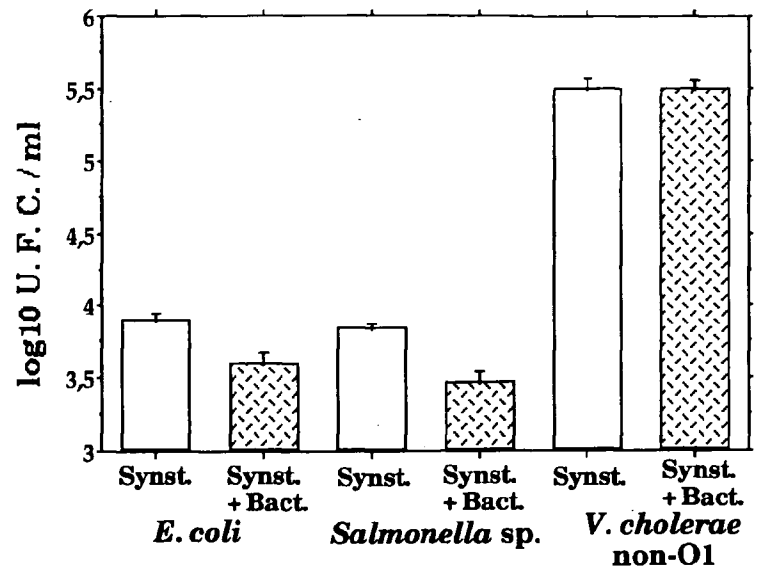


Fig. 8. Abondances moyennes, avec intervalles de confiance (95 %, n = 6), d'*E. coli* (souche 1), de *Salmonella sp.* (souche 1) et de *V. cholerae non-O1* (souche 1) en présence des substances intracellulaires de la culture axénique (Synst.) et non axénique (Synst. + Bact.) de *Synechocystis sp.*.

Fig. 8. Mean densities, with confidence intervals (95 %, n = 6), of *E. coli* (strain 1), *Salmonella sp.* (strain 1) and non-O1 *V. cholerae* (strain 1) in the presence of intracellular products of axenic (Synst.) and non axenic cultures (Synst. + Bact.) of *Synechocystis sp.*.

présence des produits élaborés par la culture non axénique (en présence de bactéries hétérotrophes) ou axénique de *Synechocystis sp.*.

#### 4. Conclusion

L'analyse globale des résultats obtenus montre que la picocyanobactérie unicellulaire, *Synechocystis sp.*, libère au cours de la phase stationnaire de croissance des substances antibactériennes vis-à-vis d'*E. coli* et de *Salmonella sp.* et des substances stimulatrices vis-à-vis de *V. cholerae non-O1* (bactérie autochtone). Les substances intracellulaires exercent un effet antibactérien plus important sur la survie d'*E. coli* et de *Salmonella sp.* que celui dû aux substances extracellulaires.

Quant aux bactéries hétérotrophes, il s'avère que leur présence, au niveau des eaux usées, stimule la croissance de la souche axénique de *Synechocystis sp.* et augmente l'effet inhibiteur exercé par les substances extracellulaires et intracellulaires libérées par cette algue, sur la croissance d'*E. coli* et de *Salmonella sp.*.

L'ensemble de ces résultats suggère que les efflorescences de *Synechocystis sp.* jouent un rôle écologique important dans la réduction des abondances bactériennes au cours du traitement des eaux usées par lagunage. La présence de cette microalgue et son évolution

temporelle dans cet écosystème épurateur peut expliquer l'évolution cyclique des abondances des bactéries étudiées et le comportement inverse des abondances observées entre les coliformes fécaux et *Salmonella sp.* d'une part, et *V. cholerae non-O1* d'autre part.

#### Travaux cités

- Akiyama T. 1973. — Indexes of water pollution and their application. *Wat. Purif. Liquid Waste Treat.*, 14 : 361-368.
- Boussaïd A. 1987. — Evolution des bactéries pathogènes *Salmonella* et *Aeromonas* en comparaison avec les bactéries témoins de contamination fécale dans les bassins expérimentaux d'épuration par lagunage sous climat aride de Marrakech. Thèse 3ème cycle. Fac. Sci. Semlalia. Marrakech : 95 p.
- Burney C. M., Davis P. G., Johnson K. M. & Sieburth J. McN. 1982. — Diel relationships of microbial trophic groups and in situ dissolved carbohydrate dynamics in the Caribbean sea. *Mar. Biol.*, 67 : 311-322.
- Caire G. Z. De, Cano M. M. S. De, Mulé M. C. Z. De & Halperin D. R. De. 1993. — Screening of cyanobacterial bioactive compounds against human pathogens. *Internat. J. Experim. Botany (Phyton)*, 54 (1) : 59-65.
- Cannell R. J. P., Owsianka A. M. & Walker J. M. 1988. — Results of a large-scale screening programme to detect antibacterial activity from fresh water algae. *British Phycol. J.*, 23 : 41-44.
- Cano M. S. De, Mulé M. C. Z. De, Caire G. Z. De & Halperin D. R. De. 1986. — Growth control of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* by *Nostoc muscorum* (Cyanophyta). *Internat. J. Experim. Botan. (Phyton)*, 46: 153-156.

Tableau 4. Pourcentages de réduction ou de stimulation de la croissance d'*E. coli*, de *Salmonella* sp. et de *V. cholerae* non-O1 en présence des substances extracellulaires et intracellulaires de la culture axénique et non axénique de *Synechocystis* sp..

Table 4. Reduction or stimulation (in percentage) of growth in *E. coli*, *Salmonella* sp. and non-O1 *V. cholerae* in the presence of extracellular and intracellular products of axenic and non axenic cultures of *Synechocystis* sp..

	Substances extracellulaires		Substances intracellulaires	
	culture axénique	culture non axénique	culture axénique	culture non axénique
<i>E. coli</i>				
Souche 1	- 85,5	- 97,7	- 98	- 99
Souche 2	- 86,8	- 95,2	- 97,3	- 98,5
<i>Salmonella</i> sp.				
Souche 1	- 89,9	- 98,3	- 98,8	- 99,5
Souche 2	- 90	- 97,8	- 97,8	- 99,4
<i>V. cholerae</i> non-O1				
Souche 1	+ 91	+ 91,4	+ 6,2*	+ 4,7*
Souche 2	+ 88	+ 87	+ 3,2*	- 3,3*

\* Réduction ou stimulation de croissance bactérienne non significative (test de Mann-Whitney, p. > 0,05).

- : Réduction de croissance bactérienne ; + : Stimulation bactérienne.

- Cano M. S. De, Mulé M. C. Z. De, Caire G. Z. De & Halperin D. R. De. 1990. — Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. *J. Appl. Phycol.*, 2 : 79-81.
- Chirac C., Casadevall E., Largeau C. & Metzger P. 1985. — Bacterial influence upon growth and hydrocarbon production of the green alga *Botryococcus braunii*. *J. Phycol.*, 21 : 380-387.
- Cole J. J. 1982. — Interactions between bacteria and algae in aquatic ecosystems. *Ann. Rev. Ecol. Syst.*, 13 : 291-314.
- Coleman J. R. & Colman B. 1980. — Effect of oxygen and temperature on the efficiency of photosynthetic carbon assimilation in two microscopic algae. *Plant Physiol.*, 65 : 980-983.
- Colwell F. S. & Speidel H. K. 1985. — Diffusion through a double-sided plate : development of a method to study alga-bacterium interactions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 50 (6) : 1357-1360.
- Dakhama A. 1991. — Etude de cas de stimulation et d'inhibition de la croissance de micro-algues par des bactéries. Doctorat Ph. D. Univ. Laval. Fac. Sci. Génie. Québec. Canada : 92 p.
- Escher A. & Characklis W. G. 1982. — Algal-bacterial interactions within aggregates. *Biotechnol. Bioengin.*, 24 : 2283-2290.
- Fabregas J. & Veiga M. 1984. — Effect of extracellular and endocellular products from the marine microalgae *Tetraselmis suecica* and *Navicula laevissima* on the growth of four marine bacteria. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, LXXIII-LXXIV : 59-64.
- Ferris J. M. & Hirsch C. F. 1991. — Method for isolation and purification of cyanobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57 (5) : 1448-1452.
- Fish S. A. & Codd G. A. 1994. — Bioactive compound production by thermophilic and thermotolerant cyanobacteria (blue-green algae). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10 : 338-341.
- Flores E. & Wolk C. P. 1986. — Production, by filamentous, nitrogen-fixing cyanobacteria, of a bacteriocin and other antibiotics that kill released strains. *Archiv. Microbiol.*, 145 : 215-219.
- Fogg G. F. 1971. — Extracellular products of algae in freshwater. *Archiv. Hydrobiol.*, 5 : 1-25.
- Forlani G., Tosti E. & Volterra L. 1989. — Growth interactions of phytoplanktonic algae and enteric bacteria. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, LXXXIII-LXXXIV : 15-30.
- Guillard R. R. L. 1973. — Division rates. In : *Handbook of physiological methods-culture methods & growth measurements*. Stein J. R. (ed.), Cambridge University Press : 289-311.
- Hellebust J. A. 1974. — Extracellular products. In : *Algal Physiology and Biochemistry*. Stewart W. D. P. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford : 838-863.
- Hino S. 1984. — Algal stimulation by heterotrophic bacteria with lake sediment extract. *Jap. J. Phycol.*, 32 : 124-129.
- Imzilen B. & Hassani L. 1990. — Effet de quelques facteurs physiques et chimiques sur la dissociation des agrégats bactériens en vue du dénombrement indirect de la flore totale des eaux usées. *Rev. Fac. Sci. Semlalia, Marrakech*, 5 : 42-54.
- Larsson U. & Hagström A. 1982. — Fractionated phytoplankton primary production, exudate release and bacterial production in a Baltic eutrophication gradient. *Mar. Biol.*, 67 : 57-70.
- Mason C. P., Edwards K. R., Carlson R. E., Pignatello J., Gleason F. K. & Wood J. M. 1982. — Isolation of chlorine containing antibiotic from the freshwater cyanobacterium *Scytonema hofmanni*. *Science*, 215 : 400-402.
- Mezrioui N. 1995. — Dynamique et antibiorésistance de certaines bactéries d'intérêt sanitaire au cours de l'épuration des eaux usées par lagunage naturel (Marrakech) et étude expérimentale de leur survie dans différents milieux aquatiques. Thèse de Doctorat. Fac. Sci. Semlalia, Marrakech : 229 p.
- Mezrioui N. & Oufdou K. 1996. — Abundance and antibiotic resistance of non-O1 *Vibrio cholerae* strains in domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds in an arid region (Marrakesh, Morocco). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 21 : 277-284.

- Mezrioui N., Oufdou K. & Baleux B. 1995. — Dynamics of non-O1 *Vibrio cholerae* and fecal coliforms in experimental stabilization ponds in the arid region of Marrakesch, Morocco, and the effect of pH, temperature and sunlight on their experimental survival. *Can. J. Microbiol.*, 41 : 489-498.
- Mezrioui N. & Echab K. 1995. — Drug resistance in *Salmonella* strains isolated from domestic wastewater before and after treatment in stabilization ponds in an arid region (Marrakech, Morocco). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11 : 287-290.
- Mulé M. C. Z. De, Caire G. Z. De & Cano M. S. De 1996. — Bioactive substances from *Spirulina platensis* (Cyanobacteria). *Internat. J. Experim. Botan. (Phyton)*, 58: 93-96.
- Oudra B. 1990. — Bassins de stabilisation anaérobie et aérobie facultatif pour le traitement des eaux usées à Marrakech. Dynamique du phytoplancton (Microplancton et Picoplancton) et évaluation de la biomasse primaire. Thèse 3ème cycle, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech : 144 p.
- Oufdou K. 1994. — Etude de la dynamique et de la survie de *V. cholerae*, d'*E. coli* et de *P. aeruginosa* au cours d'un traitement des eaux usées par lagunage naturel sous climat aride à Marrakech. Thèse 3ème cycle, Fac. Sci. Semlalia, Marrakech : 132 p.
- Patterson G. M. L., Baker K. K., Baldwin C. L., Bolis C. M., Caplan F. R., Larsen L. K., Levine I. A., Moore R. E., Nelson C. S., Tschappat K. D. & Tuang G. D. 1993. — Antiviral activity of cultured blue-green algae (Cyanophyta). *J. Phycol.*, 29 : 125-130.
- Somiya I. & Fujii S. 1984. — Material balances of organics and nutrients in an oxidation pond. *Wat. Res.*, 18 (3) : 325-333.
- Sournia A. 1987. — *Phytoplanktonic Manual*. Unesco (ed.) Paris : 337 p.
- Stewart W. D. P. & Daft M. J. 1977. — Microbial pathogens of Cyanophycean blooms. In : *Advances in aquatic Microbiology*. Droop M. R. & Jannasch J. W. (ed.), Academic Press, London and New York : 177-218.
- Tison D. L. & Lingg A. L. 1979. — Dissolved organic matter utilization and oxygen uptake in algal-bacterial microcosms. *Can. J. Microbiol.*, 25 : 1315-1320.