



**MEDITERRANEAN ACTION PLAN
MED POL**

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME



WORLD HEALTH ORGANIZATION

**BIOGEOCHEMICAL CYCLES OF SPECIFIC POLLUTANTS (ACTIVITY K)
Survival of Pathogens**

**CYCLES BIOGEOCHIMIQUES DE POLLUANTS SPECIFIQUES (ACTIVITE K)
Survie des pathogènes**

Final reports on Research projects (1992-1993)

Rapports finaux sur les projets de recherche (1992-1993)

MAP Technical Reports Series No. 76

Note: The designations employed and the presentation of the material in this document do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO and UNEP concerning the legal status of any State, Territory, city or area, or of its authorities, or concerning the delimitation of their frontiers or boundaries. The views expressed in this volume are those of the authors and do not necessarily represent the views of either WHO or UNEP.

Note: Les appellations employées dans ce document et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'OMS et du PNUE aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites. Les vues exprimées dans ce volume sont celles de leurs auteurs et ne représentent pas forcément les vues de l'OMS ou du PNUE.

For bibliographic purposes this volume may be cited as:

UNEP/WHO: Biogeochemical Cycles of Specific pollutants (Activity K): Survival of pathogens. Final Reports on Research Projects (1992-1993). MAP Technical Reports Series No. 76. UNEP, Athens, 1993.

Pour des fins bibliographiques, citer le présent volume comme suit:

PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Survie des pathogènes. Rapports finaux sur les projets de recherche (1992-1993). MAP Technical Reports Series No. 76. UNEP, Athens, 1993.

This volume is the seventy sixth issue of the Mediterranean Action Plan Technical Report Series.

This Series will collect and disseminate selected scientific reports obtained through the implementation of the various MAP components: Pollution Monitoring and Research Programme (MED POL), Blue Plan, Priority Actions Programme, Specially Protected Areas and Regional Marine Pollution Emergency Response Centre.

Ce volume constitue le soixante seizième numéro de la série des Rapports techniques du Plan d'action pour la Méditerranée.

Cette série permettra de rassembler et de diffuser certains des rapports scientifiques établis dans le cadre de la mise en oeuvre des diverses composantes du PAM: Programme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution (MED POL), Plan Bleu, Programme d'actions prioritaires, Aires spécialement protégées et Centre régional pour l'intervention d'urgence contre la pollution marine accidentelle.

GENERAL INTRODUCTION

The United Nations Environment Programme (UNEP) convened an Intergovernmental Meeting on the Protection of the Mediterranean (Barcelona), 28 January - 4 February 1975), which was attended by representatives of 16 States bordering on the Mediterranean Sea. The meeting discussed the various measures necessary for the prevention and control of pollution of the Mediterranean Sea, and concluded by adopting an Action Plan consisting of three substantive components:

- Integrated planning of the development and management of the resources of the Mediterranean Basin (management component);
- Co-ordinated programme for research, monitoring and exchange of information and assessment of the state of pollution and of protection measures (assessment component);
- Framework convention and related protocols with their technical annexes for the protection of the Mediterranean environment (legal component).

All components of the Action Plan are interdependent and provide a framework for comprehensive action to promote both the protection and the continued development of the Mediterranean ecoregion. No component is an end in itself. The Action Plan is intended to assist the Mediterranean Governments in formulating their national policies related to the continuous development and protection of the Mediterranean area and to improve their ability to identify various options for alternative patterns of development and to make choices and appropriate allocations of resources.

MED POL - Phase I (1976-1980)

The Co-ordinated Mediterranean Research and Monitoring Programme (MED POL) was approved as the assessment (scientific/technical component of the Action Plan.

The general objectives of its pilot phase (MED POL - Phase I), which evolved through a series of expert and intergovernmental meetings, were:

- to formulate and carry out a co-ordinated pollution monitoring and research programme taking into account the goals of the Mediterranean Action Plan and the capabilities of the Mediterranean research centres to participate in it;
- to assist national research centres in developing their capabilities to participate in the programme;
- to analyse the sources, amounts, levels, pathways, trends and effects of pollutants relevant to the Mediterranean Sea;
- to provide the scientific/technical information needed by the Governments of the Mediterranean States and the EEC for the negotiation and implementation of the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution and its related protocols;

- to build up consistent time-series of data on the sources, pathways, levels and effects of pollutants in the Mediterranean Sea and thus to contribute to the scientific knowledge of the Mediterranean Sea.

MED POL - Phase I was implemented in the period from 1975 to 1980. The large number of national research centres designated by their Governments to participate in MED POL (83 research centres) from 15 Mediterranean States and the EEC), the diversity of the programme and its geographic coverage, the impressive number of Mediterranean scientists and technicians (about 200) and the number of co-operating agencies and supporting organizations involved in it, qualifies MED POL as certainly one of the largest and most complex co-operative scientific programmes with a specific and well-defined aim ever undertaken in the Mediterranean Basin.

MED POL - Phase II (1981-1990)

The Intergovernmental Review Meeting of Mediterranean Coastal States and First Meeting of the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against Pollution, and its related protocols (Geneva, 5-10 February 1989), having examined the status of MED POL - Phase I, recommended that during the 1979/80 biennium a Long-term pollution monitoring and research programme should be formulated.

Based on the recommendations made at various expert and intergovernmental meetings, a draft Long-term (1981-1990) Programme for pollution monitoring and Research in the Mediterranean (MED POL-Phase II) was formulated by the Secretariat of the Barcelona Convention (UNEP), in co-operation with the United Nations Agencies which were responsible for the technical implementation of MED POL-Phase I, and it was formally approved by the Second Meeting of the Contracting Parties of the Mediterranean Sea against pollution and its related protocols and Intergovernmental Review Meeting of Mediterranean Coastal States of the Action Plan held in Cannes, 2-7 March 1981.

The general long-term objectives of MED POL-Phase II were to further the goals of the Barcelona Convention by assisting the Parties to prevent, abate and combat pollution of the Mediterranean Sea area and to protect and enhance the marine environment of the area. The specific objectives were designed to provide, on a continuous basis, the Parties to the Barcelona Convention and its related protocols with:

- information required for the implementation of the Convention and the protocols;
- indicators and evaluation of the effectiveness of the pollution prevention measures taken under the Convention and the protocols;
- scientific information which may lead to eventual revisions and amendments of the relevant provisions of the Convention and the protocols and for the formulation of additional protocols;
- information which could be used in formulating environmentally sound national, bilateral and multilateral management decisions essential for the continuous socio-economic development of the Mediterranean region on a sustainable basis;

- periodic assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea.

The monitoring of, and research on, pollutants affecting the Mediterranean marine environment reflects primarily the immediate and long-term requirements of the Barcelona Convention and its protocols, but also takes into account factors needed for the understanding of the relationship between the socio-economic development of the region and the pollution of the Mediterranean Sea.

As in MED POL-Phase I, the overall co-ordination and guidance for MED POL-Phase II is provided by UNEP as the secretariat of the Mediterranean Action Plan (MAP). Co-operating specialized United Nations Agencies (FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC) are responsible for the technical implementation and day-to-day co-ordination of the work of national centres participating in monitoring and research.

The first eight volumes of the MAP Technical Reports Series present the collection of final reports of the principal Investigators who participated in the relevant pilot projects (MED POL I - MED POL VIII). The ninth volume of the MAP Technical Reports Series is the final report on the implementation of MED POL-Phase I, prepared, primarily, on the basis of individual final reports of the principal investigators with the co-operation of relevant United Nations Agencies (FAO, UNESCO, WHO, WMO, IAEA, IOC).

From the tenth volume onwards, the MAP Technical Report Series contains final reports on research projects, assessment documents, and other reports on activities performed within the framework of MED POL-Phase II, as well as documentation originating from other components of the Mediterranean Action Plan.

This seventy sixth volume of the MAP Technical Reports Series contains the final reports of three research projects on survival of pathogens completed within the framework of MED POL in Activity K - "Biogeochemical cycles of specific pollutants".

INTRODUCTION GENERALE

Le Programme des Nations Unies pour l'environnement (PNUE) a convoqué une réunion intergouvernementale sur la protection de la Méditerranée (Barcelone, 28 janvier - 4 février 1975) à laquelle ont pris part des représentants de 16 Etats riverains de la mer Méditerranée. La réunion a examiné les diverses mesures nécessaires à la prévention et à la lutte antipollution en mer Méditerranée, et elle s'est conclue sur l'adoption d'un Plan d'action comportant trois éléments fondamentaux:

- Planification intégrée du développement et de la gestion des ressources du bassin méditerranéen (élément "gestion");
- Programme coordonné de surveillance continue, de recherche, d'échange de renseignements et d'évaluation de l'état de la pollution et des mesures de protection (élément "évaluation");
- Convention cadre et protocoles y relatifs avec leurs annexes techniques pour la protection du milieu méditerranéen (élément juridique).

Tous les éléments du Plan d'action étaient interdépendants et fournissaient le cadre d'une action d'ensemble en vue de promouvoir, tant la protection que le développement continu de l'écorégion méditerranéenne. Aucun élément ne constituait une fin à lui seul. Le Plan d'action était destiné à aider les gouvernements méditerranéens à formuler leurs politiques nationales en matière de développement continu et de protection de zone de la Méditerranée et à accroître leur faculté d'identifier les diverses options s'offrant pour les schémas de développement, d'arrêter leurs choix et d'y affecter les ressources appropriées.

MED POL - Phase I (1976-1980)

Le programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution de la Méditerranée (MED POL) a été approuvé au titre de l'élément "évaluation" (scientifique/technique) du Plan d'action.

Sa phase pilote (MED POL-Phase I) avait les objectifs généraux ci-dessous, élaborés au cours d'une série de réunions d'experts et de réunions intergouvernementales:

- formuler et exécuter un programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution en tenant compte des buts du Plan d'action pour la Méditerranée et de l'aptitude des centres de recherche méditerranéens à y participer;
- aider les centres de recherche nationaux à se rendre plus aptes à cette participation;
- étudier les sources, l'étendue, le degré, les parcours, les tendances et les effets des polluants affectant la mer Méditerranée;
- fournir l'information scientifique et technique nécessaire aux gouvernements des pays méditerranéens et à la Communauté économique européenne pour négocier et

mettre en oeuvre la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et les protocoles y relatifs;

- constituer des séries chronologiques cohérentes de données sur les sources, les cheminements, les degrés et les effets des polluants de la mer Méditerranée et contribuer par là à la connaissance scientifique de cette mer.

La Phase I du MED POL a été mise en oeuvre au cours de la période 1975-1980. Le grand nombre de centres de recherche nationaux désignés par leurs gouvernements pour participer au MED POL (83 centres de recherche de 15 Etats méditerranéens et de la CEE), la diversité du programme et sa couverture géographique, l'effectif impressionnant de scientifiques et techniciens méditerranéens (environ 200) ainsi que la quantité d'organismes coopérants et d'organisations d'appui qui y étaient engagés permettent sans conteste de caractériser le MED POL comme l'un des programmes de coopération scientifique les plus vastes et les plus complexes, comportant un objectif spécifique et bien défini, qui ait jamais été entrepris dans le bassin méditerranéen.

MED POL-Phase II (1981-1990)

La réunion intergouvernementale des Etats riverains de la Méditerranée chargés d'évaluer l'état d'avancement du Plan d'action et première réunion des Parties contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et aux protocoles y relatifs (Genève, 5-10 février 1979), ayant examiné la situation de la Phase I du MED POL, a recommandé que, durant la période biennale 1979- 80, soit formulé un programme à long terme de surveillance continue et de recherche en matière de pollution.

Sur la base des recommandations énoncées lors des diverses réunions d'experts et réunions intergouvernementales, un projet de programme à long terme (1981-1990) de surveillance continue et de recherche en matière de pollution (MED POL - Phase II) a été formulé par le secrétariat de la Convention de Barcelone (PNUE), en coopération avec les organismes des Nations Unies chargés de l'exécution technique de MED POL - Phase I, et il a été officiellement approuvé lors de la deuxième réunion des Parties contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution et aux protocoles y relatifs et réunion intergouvernementale des Etats riverains de la mer Méditerranée chargée d'évaluer l'état d'avancement du Plan d'action, qui s'est tenue à Cannes du 2 au 7 mars 1981.

L'objectif général à long terme de la Phase II du MED POL était de concourir à la réalisation des objectifs de la Convention de Barcelone en aidant les parties contractantes à prévenir, réduire et combattre la pollution dans la zone de la mer Méditerranée ainsi qu'à protéger et améliorer le milieu marin dans cette zone. Les objectifs particuliers étaient de fournir constamment aux Parties contractantes à la Convention de Barcelone et aux Protocoles y relatifs:

- les renseignements dont elles avaient besoin pour appliquer la Convention et les protocoles;

- des indications et une évaluation de l'efficacité des mesures prises pour prévenir la pollution en application de la Convention et des protocoles;
- des renseignements scientifiques qui pourraient servir à réviser et modifier les dispositions pertinentes de la Convention et des protocoles et à rédiger des protocoles additionnels;
- des informations qui pourraient servir à formuler sur les plans national, bilatéral et multilatéral, les décisions de gestion, respectueuses de l'environnement, qui seraient indispensables à la poursuite du développement socio-économique de la région méditerranéenne;
- une évaluation périodique de l'état de pollution de la mer Méditerranée.

La surveillance continue des polluants affectant le milieu marin de la Méditerranée ainsi que la recherche menée à leur sujet répondent en premier lieu aux prescriptions immédiates et à long terme de la Convention de Barcelone et des protocoles y relatifs, mais elles tiennent également compte des facteurs requis pour la compréhension des relations existant entre le développement socio-économique de la région et la pollution de la mer Méditerranée.

Comme lors de la Phase I du MED POL, la coordination et la direction générales de la Phase II étaient assurées par le PNUE, par l'intermédiaire du secrétariat du Plan d'action pour la Méditerranée (PAM). Les organismes spécialisés coopérants des Nations Unies (FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI) étaient chargés de l'exécution technique et de la coordination quotidienne des travaux des centres de recherche nationaux participant au programme de surveillance continue et de recherche.

Les huit premiers volumes de la Série des rapports techniques du PAM rassemblent les rapports finaux de chercheurs responsables qui ont participé aux projets pilotes correspondants (MED POL I -MED POL VIII). Le neuvième volume de cette même Série se compose du rapport final sur la mise en oeuvre de la Phase I du programme MED POL, établi essentiellement sur la base des rapports finaux individuels des chercheurs responsables avec la coopération des organismes compétents des Nations Unies (FAO, UNESCO, OMS, OMM, AIEA, COI).

A partir du dixième volume, la Série des rapports techniques du PAM, comprend des rapports finaux sur les projets de "recherche", des documents d'évaluation et d'autres rapports d'activités effectués dans le cadre de MED POL-Phase II, ainsi que de la documentation prise dans d'autres domaines du Plan d'action pour la Méditerranée.

Ce soixante-seizième volume de la Série des rapports techniques du PAM comprend trois rapports finaux sur la survie des pathogènes exécutés dans le cadre de la Phase II du MED POL, dans l'Activité K - "Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques".

TABLE OF CONTENTS/TABLE DES MATIERES

	Page
The survival of human enteric viruses in seawater by A. Bosch, M. Gray, J.M. Diez, R. Gajardo, F.X. Abad, R.M. Pintó and M.D. Sobsey	1
Metabolic and structural changes in <i>E. coli</i> cells starved in seawater by M. Papapetropoulou, K. Zoumbou and A. Nicolopoulou	9
Expression génique chez les bactéries entériques dans les conditions marines by M.J. Gauthier, V.A. Breittmayer and A.S. Braux	39

THE SURVIVAL OF HUMAN ENTERIC VIRUSES IN SEAWATER

By

A. BOSCH⁽¹⁾, M. GRAY⁽¹⁾, J.M. DIEZ⁽¹⁾, R. GAJARDO⁽¹⁾,
F.X. ABAD⁽¹⁾, R.M. PINTÓ⁽¹⁾ and M.D. SOBSEY⁽²⁾

⁽¹⁾ Department of Microbiology, University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

⁽²⁾ Department of Environmental Sciences and Engineering, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27514, USA

1. INTRODUCTION

Human pathogenic viruses enter the marine environment primarily through the discharge of treated and untreated sewage into surface waters. Since current treatment practices do not provide virus-free effluents (WHO, 1979), enteric viruses are routinely discharged into estuarine and coastal waters. The critical question which arises, however, is whether or not these viruses can survive long enough and in high enough concentration to cause disease in individuals who are in contact with polluted recreational water or who consume contaminated seafood. The phenomenon that self purification processes are more pronounced in seawater than in river water has been reported by several authors (Lycke *et al.* 1965; Matossian and Garabedian 1967; Gironés *et al.*, 1989a). However, there appears to be no consensus on the nature of the factor(s) responsible for the virucidal capacity of seawater (Lycke *et al.* 1965; Shuval *et al.* 1971; Fujioka *et al.* 1980; Toranzo *et al.* 1983). Several observations demonstrate the potential involvement of native marine microorganisms in the inactivation of viruses in marine habitats (Magnusson *et al.* 1967; Shuval *et al.* 1971; Fujioka *et al.* 1980; Gironés *et al.*, 1989b), although data on the successful isolation of microorganisms with virucidal properties are scarce (Gunderson *et al.* 1968; Toranzo *et al.* 1983; Gironés *et al.*, 1989b). Additionally, the ability of bacteria to inactivate viruses is usually lost while subculturing the bacteria in the laboratory (Gunderson *et al.* 1968; Katzenelson 1978). The present report deals with the effect of different types of seawater on the survival of human enteric viruses, and the influence of the presence of marine bacteria on the virucidal capacity of seawater.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Viruses, cell cultures and viral assays

Echovirus 1, strain V-239 and human rotavirus, strain Ito' P13 were propagated and assayed in the MA-104 cell line. Poliovirus 1, strain LSc 2ab and coxsackievirus B5, strain Faulkner (ATCC VR-1036), were propagated and assayed in BGM cells. The cytopathogenic strain pHM-175 of hepatitis A virus (HAV) was propagated and assayed in FRhK-4 cells (Cromeans *et al.*, 1987). Infectious units were enumerated by plaque assay except human rotavirus which was assayed by an indirect immunofluorescence test

(Bosch *et al.*, 1988). The HM-175 strain of HAV was persistently propagated in BS-C-1 cells (Sobsey *et al.*, 1985) and assayed by radioimmunofocus assay (Lemon *et al.*, 1983).

2.2 Samples

Mediterranean marine waters were collected from Gavà (Barcelona) and Platja d'Aro (Girona). Atlantic estuarine sediment and seawater were collected respectively from Calico Creek and Beaufort Inlet, North Carolina. All samples were transported refrigerated to the laboratories and used within 24 hours of collection. Fifty percent (w/v) mixtures were made with settled sediment plus seawater.

2.3 Virucidal effect of seawater

Virus survival in the test samples was determined by calculating $\log(N_t/N_0)$, where N_0 is the titre of the virus at the time zero and N_t is the virus titre at various time periods post-inoculation. The equation was linearized for regression analysis and the difference between the slopes of any two inactivation curves was tested for significance at the 0.05 confidence level by applying the *F* test (Sokal and Rohlf, 1973). Regression lines were also used to determine the time required for 99% of inactivation (T_{99}).

2.4 Determination of the nature of the virucidal effect of Mediterranean seawater

Replicate 250-ml siliconized flasks, containing 100 ml of the water sample to be tested, were inoculated with suspensions of echovirus 1 so as to yield a final titre of approximately 10^5 PFU/ml. As a control, 100 ml of autoclaved seawater were inoculated with a similar amount of virus. Zero-time samples were removed after a 30-sec shaking period to disperse the virus. The flasks were incubated at 25E C with rotational agitation (120 rpm) for 7 days. In order to elucidate the size and nature of the inactivating substance(s), samples were filtered through 0.22 μm filter membranes (Millipore); some samples were additionally filtered through CX-30 immersible filters (Millipore). The antiviral activity of these filtered samples was compared with that of raw samples. Other treatments consisted of the addition to the samples of 100 U/ml of penicillin and 100 $\mu\text{g/ml}$ of streptomycin, or trypsin (20 $\mu\text{g/ml}$; tissue culture grade 1:250, Difco) prior to the inoculation of the virus. Although data from individual experiments are reported, all experimental results described in this study were reproduced in at least three separate experiments.

2.5 Isolation of bacteria with antiviral properties

One hundred-ml samples of freshly collected seawater from Gavà beach were filtered through 0.22- μm membrane filters (Millipore), the bacteria resuspended in 100 ml of sterile marine water containing echoviruses and cultured at 25E C. The bacteria were propagated in the laboratory for over one year, at weekly intervals. Bacteria were collected by filtration and resuspended in fresh sterile seawater. Aliquots were used to seed fresh 100-ml sterile seawater samples containing echoviruses, and to obtain cultures in TSA with 2% NaCl or Marine Agar (ADSA) at 25E C. The presence of an anti-echovirus activity were characterized according to morphological and physiological characteristics. Electron microscope observation of the bacteria was also performed. The isolated bacteria were also tested for antiviral activity against other human enteric viruses and compared with

other bacteria (strain 24) showing antiviral properties which were isolated in a previous study (Gironés *et al.*, 1989b).

3. RESULTS AND DISCUSSION

Among the many factors affecting virus survival in the marine environment are temperature (Akin *et al.*, 1971; Raphael *et al.*, 1985), virus association to solids (Gerba and Schaiberger, 1975; LaBelle and Gerba, 1980; Rao *et al.*, 1984) and the presence of microbial flora (Gundersen *et al.* 1968; Fujioka *et al.*, 1980; Toranzo *et al.* 1983; Gironés *et al.*, 1989b). The survival of poliovirus 1 and HAV at 5E C and 25E C is shown in Fig. 1 A. Little inactivation of any virus is observed at 5E C after 30 days. No significant differences in the decay rate of both virus strains are observed at this temperature. At 25E C, HAV persisted significantly ($p < 0.05$) longer than poliovirus. As expected, virus survival was higher at low temperature (5E C) than at high temperature (25E C).

The presence of marine sediment enhanced virus survival in seawater at 25E C (Fig. 1 B). The protective effect of solids was particularly significant ($p < 0.05$) for poliovirus after 30 days in marine water.

It seems reasonable to assume that environmental factors and the compositional make up of seawater may substantially differ from one geographical location to another. Fig 1 C shows the different persistence of poliovirus 1 when suspended in seawater from the Atlantic ocean at North Carolina, or from the Mediterranean sea at the Catalan coast. The decay rates were significantly ($p < 0.05$) more pronounced in Mediterranean water than in Atlantic water. It is highly likely that all seawater contains a variety of potential antiviral factors, and that the antiviral action observed is generally the expression of the most dominant factor(s) present in any given water source.

The presence of autoctonous bacteria was shown in previous studies to be the principal virus inactivating factor in water from Gavà beach (Gironés *et al.*, 1989b). Marine bacteria were isolated with virucidal activity addressed specifically versus poliovirus but not versus other enteric viruses. In the present study, a pronounced decrease in the titre of echovirus 1 was observed when the virus was suspended for 7 days at 25E C in seawater from Gavà beach (Table 1). The antiviral effect was removed, totally or partially, after autoclaving the water, or after treatments with antibiotics or trypsin. The anti-echovirus activity could be separated from the bacteria by filtration through 0.22 μm . From our data we may assume that the antiviral factor(s) must be of bacterial origin, proteinaceous nature and temperature sensitive. Concentration of the actual virucidal substance(s) was not achieved by filtration through CX-30 Millipore immersible units of filtered water. This observation leads to the conclusion that the molecular weight of the inactivating factor(s) must be below 30,000 Da.

Bacteria have been kept growing in sterile seawater for over one year and subcultured at weekly intervals, without losing their antiviral activity. Attempts to isolate these bacteria with antiviral activity were not successful until after 64 subcultures in seawater, when one isolate with properties anti-echovirus could be obtained. This isolated bacteria, strain 7-2A, grew at 20, 25, 30 and 37E C on TSA with 2% NaCl, and also on TSA with normal salt concentration, on marine agar and on McConkey agar. The Gram staining revealed Gram-negative bacilli, negative for the oxidase test, and

positive for the oxidation/fermentation test. Electron microscopy showed rod-shaped bacteria measuring approximately 1.5 µm x 0.5 µm. The ability of strain 7-2A to grow at 25E C in autoclaved seawater seeded with echovirus 1 was studied. Maximum bacterial numbers, as monitored on Marine Agar, were of around 10⁷ CFU/ml after the 7-day incubation period.

Table 2 shows the comparative stability of different virus strains in the presence of bacterial strains 24 (Gironés *et al.*, 1989b) and 7-2A (this study). Additionally, strain 7-2A showed a string inactivating capacity versus human rotavirus (data not shown).

In a previous study (Gironés *et al.*, 1989b), the strict association found between viable microorganisms and virucidal activity indicated that the active agent(s) either remained associated to the bacteria or had a very short lifetime, or both. In the present study, the virucidal capacity of marine water could be separated from the bacteria, suggesting a cell-free nature of the actual inactivating factor(s). The bacteria isolated by Gironés *et al.* exhibited an antiviral capacity specifically restricted to poliovirus (1989b). On the contrary strain 7-2A shows a broad range of antiviral activity. Whether this activity relies on a proteolytic digestion of capsid proteins by a bacterial exoenzyme, or on simple aggregation phenomena caused by a bacterial product is not known. Further characterization of the capacity of receiving marine waters to inactivate viral pollutants is required to ascertain the level of health risk posed by the disposal of virus contaminants in seawater.

Table 1

Inactivation of echovirus 1 in marine water at 25E C.

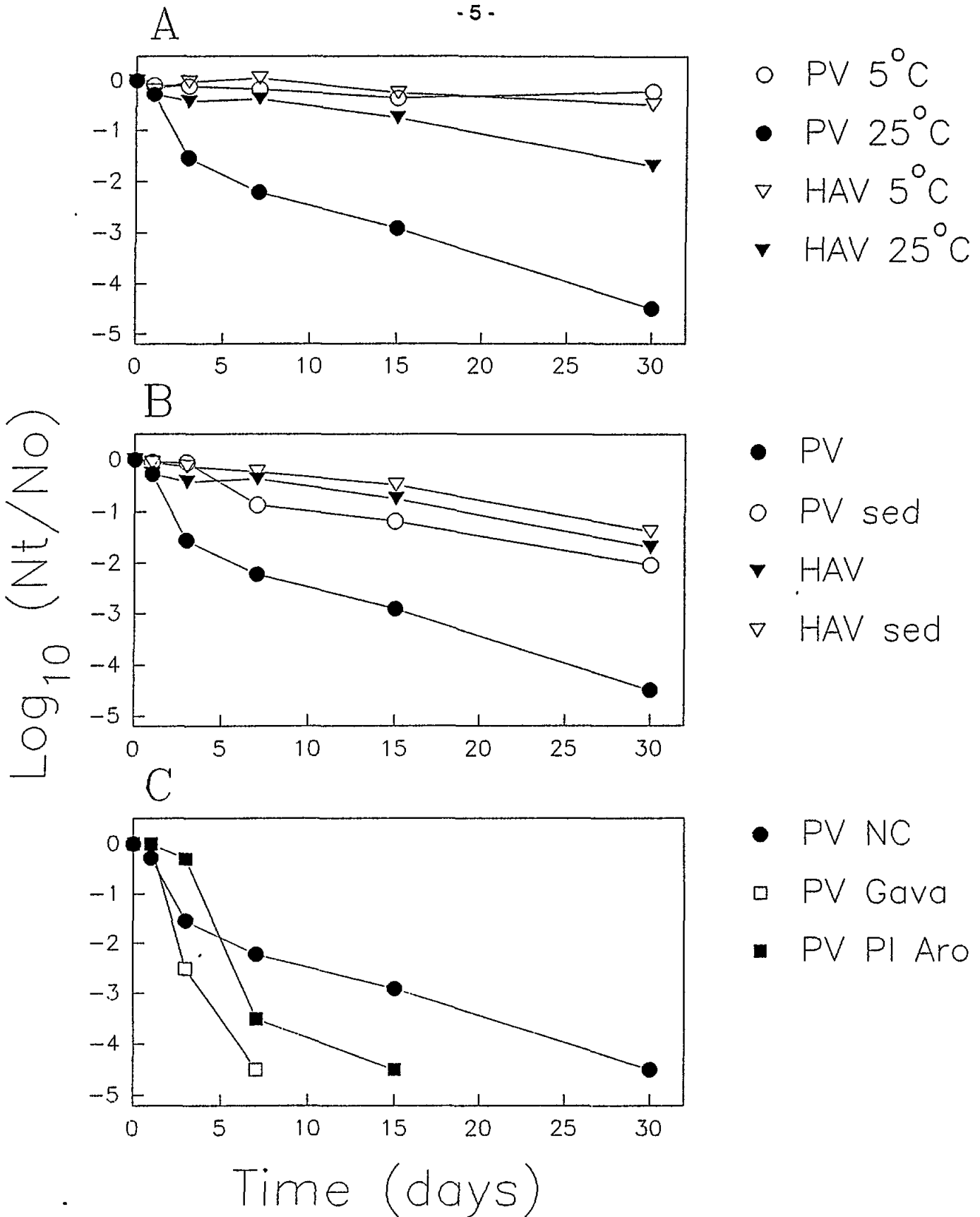
Sample	Percent inactivation after 7 days
Natural seawater	99
Natural autoclaved seawater	10
Filtered natural seawater	81
Natural seawater + antibiotics	25
Natural seawater + trypsin	55

Table 2

Comparative stability (T_{99}) of different picornaviruses in seawater in the presence of bacterial strains with antiviral properties at 25E C.

Sample	PV	CV	EV	HAV
Natural	3	5	4	>30
Autoclaved	65	61	73	NT
Autoclaved + strain 24	3	46	31	NT
Autoclaved + strain 7-2A	7	NT	7	7

PV: poliovirus 1
 CV: coxsackievirus B5
 EV: echovirus 1
 HAV: hepatitis A virus
 NT: not tested.



- A. Effect of water temperature on virus survival
- B. Effect of the presence of sediment on virus survival at 25° C
- C. Influence of the source of water on poliovirus survival at 25° C.

Figure 1. Stability of poliovirus 1 (PV) and hepatitis A virus (HAV) in seawater under different conditions.

4. REFERENCES

- Akin, E.W., Benton, W.H. and Hill, J.W. Jr. 1971. Enteric viruses in ground and surface waters: a review of their occurrence and survival, pp 59-74, In *Virus and water quality: Occurrence and control*, V. Griffin and J. Snoeyink (Eds), University of Illinois Press, Urbana, Il.
- Bosch, A., Pinto, R.M., Blanch, A.G. and Jofre, J. 1988. Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Wat. Res.* **22**: 343-348.
- Cromeans, T. Sobsey, M.D. and Field, H.A. 1987. Development of a plaque assay for a cytopathic rapidly replicating isolate of hepatitis A virus. *J. Med. Virol.* **22**, 45-46.
- Fujioka, R.S. Loh, P.C. and Lau, L.S. 1980. Survival of human enteroviruses in the Hawaiian Ocean: environment evidence for virus inactivating microorganisms. *Appl. Microbiol.* **39**: 1105-1110.
- Gerba, C.P. and Schaiberger, G.E. 1975. Effect of particulates on virus survival in seawater. *J. Wat. Pollut. Cont. Fed.* **47**: 93-103.
- Gironés, R., Jofre, J. and Bosch, A. 1989a. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *J. Environ. Qual.* **18**: 34-39.
- Gironés, R., Jofre, J. and Bosch, A. 1989b. Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can. J. Microbiol.* **35**: 1015-1021.
- Gunderson, K., Brandberg, A., Magnusson, S. and Lycke, E. 1968. Characterization of a marine bacterium associated with virus inactivating capacity. *Acta Path. et Microbiol. Scandinav* **71**: 281-286.
- Katzenelson, E. 1978. Survival of viruses. In *Indicators of viruses in water and food*. G. Berg (Ed.). Ann Arbor Sci. Inc. Michigan, pp 39-50.
- La Belle, R.L., Gerba, C.P., Goyal, S.M., Melnick, J.L., Lech, I. and Bogdan, G.F. 1980. Relationships between environmental factors, bacterial indicators and the occurrence of enteric viruses in estuarine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 588-596.
- Lemon, S.M., Binn, L.N. and Marchwicki, R.H. 1983. Radioimmunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell cultures. *J. Clin. Microbiol.* **17**, 834-839.
- Lycke, E., Magnusson, S. and Lund, E. 1965. Studies on the nature of virus inactivating capacity of seawater. *Arch. Ges. Virusforsch.* **17**: 409-413.
- Magnusson, S., Gunderson, K., Brandberg, A. and Lycke, E. 1967. Marine bacteria and their possible relation to the virus inactivating capacity of seawater. *Acta Path. et Microbiol. Scandinav.* **71**: 274-280.
- Matossian, A.M. and Garabedian, G.A. 1967. Virucidal action of seawater. *Am. J. Epidemiol.* **85**: 1-8.

- Rao, V.C., Seidel, K.N., Goyal, S.M., Metcalf, T.C. and Melnick, J.L. 1984. Isolation of enteroviruses from water, suspended solids and sediments from Galveston bay; survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 404-409.
- Raphael, R.A., Sattar, S.A. and Springthorpe, V.S. 1985. Long term survival of human rotavirus in raw and treated river water. *Can J. Microbiol.* **31**: 124-128.
- Shuval, H.I., Thompson, A., Fattal, B., Cymbalista, S. and Weiner, Y. 1971. Natural virus inactivation processes in seawater. *J. Sa. Eng. Div. Am. Soc. Civ. Eng.* **5**: 587-600.
- Sobsey, M.D., Oglesbee, S.E. and Waits, D.A. 1985. Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1457-1463.
- Sokal, R.R. and Rohlf, E.J. 1973. *Introduction to biostatistics*. W.H. Freeman, San Francisco.
- Toranzo, A.E., Barja, J.L. and Hetrick, F.M. 1983. Mechanism of poliovirus inactivation by cell-free filtrates of marine bacteria. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1481-1486.
- WHO Scientific Group of Human Viruses in Water and Soil. 1979. *Human viruses in water, waste water and soil*. WHO Technical Report Series 639.

EXPRESSION GENIQUE CHEZ LES BACTERIES ENTERIQUES DANS LES CONDITIONS MARINES

par

MICHEL J. GAUTHIER, VIOLETTE A. BREITTMAYER et ANNE-SOPHIE BRAUX
I.N.S.E.R.M. Unité 303 "Mer et Santé", Nice, France

1. BUTS DE L'ETUDE

Le but fondamental du travail proposé dans le cadre de ce contrat était d'analyser dans quelle mesure une bactérie entérique (ici l'espèce *Escherichia coli*, considérée comme modèle) est capable d'exprimer un certain nombre de ses gènes dans les conditions marines dans le but de s'y adapter, en focalisant donc l'étude sur les gènes ou groupes de gènes qui peuvent conférer une certaine protection à la bactérie vis à vis des facteurs de stress marins.

Il est utile de rappeler au préalable que la survie en mer des entérobactéries pathogènes dépend à la fois:

- de nombreux facteurs environnementaux (physiques, chimiques et biologiques) qui confèrent au milieu marin ce que l'on a appelé son "pouvoir auto épurateur" (Aubert *et al.*, 1980). Ces facteurs sont donc extrinsèques aux bactéries polluantes.
- de facteurs cellulaires, donc intrinsèques aux bactéries, par exemple leur état physiologique et énergétique. Sur la base de résultats obtenus à la fois dans notre Laboratoire et par diverses autres équipes, on peut dire d'un point de vue général que cette survie est d'autant plus longue que ces bactéries sont capables de maintenir ou de restaurer leur homéostasie dans les conditions marines. Ceci peut se faire soit à l'aide de mécanisme mis en place avant le rejet en mer (mécanismes "importés"), c'est à dire installés au cours de la croissance dans l'intestin ou pendant le transit dans les eaux usées, soit grâce à des mécanismes éventuellement synthétisés de novo dans le milieu marin (mécanismes "induits").

Il est clair que la signification et l'impact éco-physiologique de ces deux types de processus (importé ou induits) ne sont pas les mêmes: les premiers ne peuvent que limiter temporairement les effets des divers stress (osmotique, thermique, oxydatif, nutritionnel,...) subis par les cellules dans l'eau de mer, alors que les seconds permettraient en principe l'adaptation induite, donc beaucoup plus efficace, de ces cellules et leur implantation éventuelle dans le milieu marin. C'est la raison pour laquelle il est particulièrement intéressant de savoir si une bactérie entérique peut exprimer ses gènes dans les conditions marines.

2. PRINCIPES D'ETUDE - MATERIELS ET METHODES

Le projet proposé dans le cadre de ce contrat prévoyait l'abord de l'expression génique chez *Escherichia coli* dans l'eau de mer par deux voies moléculaires indépendantes et complémentaires:

Premier volet:

Analyse de l'état de surenroulement de l'ADN lui-même et sa modulation en fonction de l'état de stress des cellules dans l'eau de mer.

Les résultats obtenus au cours de cette partie du travail ont fait l'objet d'une publication dans la revue "Molecular Ecology". Le détail des buts poursuivis et des méthodes développées est donné dans cette publication, insérée dans ce rapport au chapitre Résultats-Discussion (voir chapitre 3.1).

Deuxième volet:

Mesure de l'expression dans l'eau de mer de gènes fusionnés à des gènes marqueurs (par l'utilisation de souches portant des fusions de gènes). Ce travail a été développé au cours de la deuxième partie de l'année. Il a porté sur deux types de gènes, dont l'expression est ou non liée à la régulation osmotique.

a) Gènes à expression osmorégulée, nécessaires à l'établissement de l'état de résistance osmotique, en grande partie responsable du maintien du caractère cultivable des entérobactéries (*E. coli*, *Salmonella*) dans l'eau de mer:

proU et *proP* (transport de la glycine bêtaïne)

Les molécules osmoprotectrices majeures se répartissent en trois familles:

- les sucres, dont le plus représenté est le tréhalose
- les polyols
- les acides aminés, dont la proline l'acide α -aminobutyrique et surtout les dérivés N-triméthylés: les bêtaïnes (la glycine bêtaïne en étant le représentant majeur).

Ces molécules sont accumulées à des concentrations élevées lorsque les cellules sont soumises à un stress hyperosmotique, en fonction des besoins de la cellule et non de leur concentration dans le milieu extérieur (Meury, 1988); elles sont incapables de traverser rapidement la paroi cellulaire sans l'aide d'un système de transport actif; la plupart d'entre elles ne font pas varier la charge électrique cellulaire pour un pH voisin de 7; elles ont un effet stabilisateur sur les conformations des protéines et permettent de maintenir ou de rétablir leur activité (Csonka, 1989).

La glycine bêtaïne (GB), ou N,N,N-triméthylglycine, est accumulée lors d'un stress osmotique en tant qu'osmoprotecteur par *E. coli* et d'autres bactéries entériques, mais aussi par des bactéries halophiles, des cyanobactéries et des organismes supérieurs halotolérants, végétaux ou animaux. Chez *E. coli*, l'accumulation se fait soit par transport actif à partir du milieu extérieur, soit par synthèse à partir d'un précurseur exogène, la choline La GB est l'osmoprotecteur

le plus efficace et le plus répandu chez les Entérobactéries qui, pour la plupart, ne l'utilisent pas comme source de carbone ni d'azote. Ainsi des cellules dont la division est stoppée ou ralentie en milieu hyperosmotique non carencé en matière organique rétablissent leur croissance après ajout dans le milieu de GB (Booth et coll., 1988, fig. 1; Meury, 1988). L'accumulation de GB provoque un efflux de potassium, une augmentation du volume cellulaire grâce à un appel d'eau, et permet de restaurer la croissance ou de diminuer le temps de génération (voir Chapitre 1.6.5??). De plus, une concentration élevée de GB stabilise *in vitro* la structure native des protéines contre une dénaturation chimique ou thermique (Cayley et coll., 1992).

Synthèse de la GB

Les gènes *bet* codent pour les enzymes impliquées dans la synthèse de GB et dans le transport de choline. L'oxydation de la choline puis de la bétaine aldéhyde est catalysée par la même enzyme codée par le gène *betA*⁺, liée à la membrane plasmique et couplée à un transport électronique qui nécessite donc un accepteur terminal d'électron comme l'oxygène. De ce fait, la choline ne peut pas être utilisée comme osmoprotecteur en milieu anaérobie (Csonka, 1989).

D'après Styrvold (1986), les enzymes impliquées dans la conversion de choline en GB ne sont synthétisées que dans les cellules en état de stress hyperosmotique, et les gènes *bet* sont absents chez *S. typhimurium* ainsi que dans de nombreuses souches d'*E. coli* (Sutherland et coll., 1986).

Transport de la GB

Il est effectué de façon active par deux systèmes de gènes responsables également du transport de la proline mais à plus faible affinité pour cette dernière.

! le système *ProU*

Il est codé par un opéron de trois gènes d'environ 2,6 kb: *proV*, *proW*, *proX* codant pour trois protéines respectivement de 44, 35 et 33 kd, associées au transport de la proline et de la GB comme substrat principal ($K_{m\text{proline}}=1 \text{ mM}$; $K_{m\text{GB}}=0,5$ à $1 \mu\text{M}$). Selon Dattananda et Gowrishankar (1989), *proX* coderait pour la protéine affine de la GB localisée dans le périplasma. Les produits de *proU* et *proW* seraient deux protéines membranaires (Csonka, 1989). Ces trois protéines seraient nécessaires et suffisantes pour le transport actif de la GB ou de la proline (Dattananda et Gowrishankar, 1989).

proU est inductible à haute osmolarité et son niveau d'expression est déterminé de façon sensible par l'osmolarité du milieu de culture (Carney et coll. 1985b). Si la cellule n'est pas en état de stress, son niveau basal d'expression est très faible (Lucht et Bremer, 1991). La source d'énergie utilisée pour le transport de proline ou de GB est l'hydrolyse d'ATP (Higgins et coll., 1986). Aucune protéine de régulation n'a été identifiée pour *ProU* mais l'accumulation cellulaire de glutamate de potassium serait seule impliquée dans le contrôle de son expression (Ramirez et Villarejo, 1991). La façon dont agit le glutamate de potassium pour activer l'expression de *ProU* n'est encore qu'hypothétique (Sutherland et coll., 1986; Lucht et Bremer, 1991). Selon Sutherland et coll. (1986), l'expression de

proU est atténuée de façon significative lorsqu'on ajoute de la GB ou de la proline dans le milieu de culture.

! le système *ProP*

Beaucoup moins étudié et connu que *ProU*, il est codé par un ensemble de gènes impliqués dans le transport actif de la GB et de la proline dont la source d'énergie est la force promotrice. Ce système joue un rôle très important ç haute osmolarité dans l'accumulation de GB qui est son substrat principal. Par contre, son affinité pour la proline est estimée entre 10 et 300 μM : il ne semble pas contribuer de façon significative à l'accumulation intracellulaire de cette molécule (Cairney et coll., 1985a). Son affinité pour la GB est déterminée par l'osmolarité du milieu: on observe une augmentation importante de l'accumulation de GB à haute osmolarité alors qu'à faible osmolarité, le taux d'accumulation est faible. Ce phénomène ne s'applique pas à la proline. On estime que le K_m de la GB est de l'ordre du mM à basse osmolarité et de 30 à 44 μM à haute osmolarité (NaCl 0,3 M). *ProP* serait le système majeur pour l'accumulation de GB pendant la phase initiale d'adaptation à un choc hyperosmotique (Booth et coll., 1988; Cairney et coll., 1985b). L'augmentation d'activité de ce système en réponse à un choc hyperosmotique pourrait être dû aux effets de la "stringent response", mécanisme de régulation mis en place en réponse à un déficit en acides aminés ou en source d'énergie, et qui pourrait également être provoqué par un stress hyperosmotique (Booth et coll., 1988; Meury, 1988). Les mécanismes d'induction de *ProP* sont encore mal connus et très discutés, de même que l'hypothèse de son inhibition sous forme de rétrocontrôle par la GB accumulée (Koo et coll., 1991).

ompC (synthèse des porines OmpC dans la paroi, permettant une meilleure adaptation des mouvements ioniques transmembranaires à haute osmolarité).

Les bactéries Gram négatif possèdent un certain nombre de porines insérées dans la paroi. Ce sont des trimères protéiques qui font office de canaux aux travers desquels les petites molécules hydrophiles diffusent vers l'espace périplasmique. Certaines grosses molécules comme des nucléosides ou des disaccharides peuvent diffuser à travers les porines mais leur seul transport par diffusion facilitée est insuffisant pour répondre aux besoins de la cellule (Nikaido et Vaara, 1987).

E. coli et *S. typhimurium* possèdent deux porines majeures qui déterminent en grande partie la perméabilité de la paroi, principale barrière entre la cellule et le milieu extérieur. Ce sont les protéines OmpF et OmpC (Omp=Outer Membrane Protein) dont la synthèse est régulée en fonction des conditions du milieu extérieur comme l'osmolarité, la source de carbone ou la température. Ces deux protéines ont une forte homologie de séquence, de même que leurs gènes correspondants: *ompF* et *ompC* (Csonka, 1989). Les diamètres des pores de OmpF et de OmpC sont respectivement de 1,16 et 1,08 nm permettant une diffusion de sucres ou de peptides dont la taille est inférieure à 600 daltons (estimation moyenne). Ce sont les cations ou les sucres neutres qui diffusent le mieux par ces porines. Ces propriétés sont idéales pour empêcher la diffusion des sels biliaires, grosses molécules hydrophobes et chargées négativement qui peuplent l'intestin. Ainsi la synthèse de OmpF est inhibée à haute température et forte salinité qui sont les conditions du milieu intestinal. Dans ce milieu riche en source de carbone, le

diamètre des porines OmpC suffit amplement à la diffusion (Nikaido et Vaara, 1987) (Fig. 2).

La synthèse des porines OmpF et OmpC est régulée par l'opéron OmpB constitué de deux gènes: ompR et envZ. EnvZ est une protéine insérée dans la membrane plasmique qui serait un osmosenseur. Sa phosphorylation en présence d'ATP conduit à un transfert du groupement phosphoryl sur la protéine OmpR qui appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels et qui interagit avec les régions en amont des promoteurs de ompF et ompC. OmpR subit une phosphorylation ou une déphosphorylation sous l'action de EnvZ et va réguler ensuite l'activation ou l'inhibition de ompF ou ompC.

L'osmorégulation de ces deux gènes est un mécanisme complexe dont l'étude reste aujourd'hui incomplète (Kanamaru et coll., 1989).

Les bactéries *E. coli* de type sauvage montrent un spectre continu allant du phénotype OmpF⁺/OmpC⁻ à des température et pression osmotique élevées (Stock et coll., 1989).

b) Gène *cstA*, à expression non osmorégulée, permettant l'acquisition d'un état de résistance aux situations de stress multiples (comme c'est le cas dans l'eau de mer) induit par la carence alimentaire (=stress nutritionnel). L'expression de ce gène conduit à l'élargissement du potentiel d'utilisation des substrats organiques par la bactérie en milieux carencés, en particulier pendant la phase stationnaire des cultures.

De nombreux gènes dont l'expression requiert la présence d'AMPc sont impliqués dans des fonctions cataboliques ou de prélèvement de molécules dans le milieu extérieur. C'est la raison pour laquelle on suppose les protéines Cst responsables de l'augmentation du potentiel métabolique cellulaire.

Le gène *cstA* contient trois phases ouvertes de lecture régulées par la fixation en amont des promoteurs, du complexe AMPc-CRP*, et codant pour trois protéines impliquées dans le transport de peptides. On n'a pas établi de corrélation stricte entre le taux d'induction des gènes *cst* et la concentration en AMPc mais cette concentration est inversement proportionnelle à l'importance des réserves énergétique cellulaires et à la disponibilité en substrat carboné. On suppose que l'induction des gènes *cst* en phase stationnaire fait intervenir d'autres facteurs comme des molécules générées par le catabolisme de substrats endogènes pendant la carence nutritive, ou des facteurs mineurs spécifiques de la phase stationnaire.

S)))))))))))))))))))))))))))))) Q

* CRP="cAMP receptor protein" formant un complexe AMPc-CRP responsable de l'induction de la transcription de gènes possédant un site de fixation de ce complexe en amont de leurs promoteurs.

L'insertion d'un phage lambda dans ce gène limite la croissance d'*E. coli* sur un milieu contenant des peptides comme seule source de carbone et d'énergie. Ainsi l'induction de *cstA* pendant une pénurie de substrat facilement métabolisable permettrait à *E. coli* d'augmenter ses chances d'échapper à la carence nutritive en utilisant d'autres substrats pour sa croissance (Matin, 1991; Schultz et coll., 1988).

2.1 Principe des expériences

Pour cette étude, les bactéries ont été placées, pour une période d'environ 10 jours, dans un milieu de survie hyperosmotique où trois paramètres ont été alternativement modifiés:

- expérience de type 1: étude de l'expression des gènes en fonction de l'osmolarité du milieu de survie, à 20E C. Sept milieux de survie, constitués d'un mélange d'eau de mer naturelle stérile et d'eau distillée stérile, ont été utilisés, leur osmolarité allant de 130 à 1000 mOsm/kg environ (1000 mOsm/kg et 20E C étant respectivement l'osmolarité et la température moyennes de l'eau de mer en Méditerranée).
- expériences de type 2 étude de l'expression des gènes en fonction de la température. Le milieu de survie permettant l'expression optimale du gène étudié dans l'expérience de type 1 a été employé pour ces expériences de type 2, l'incubation étant faite à trois températures différentes: 9E C, 20E C et 30E C.
- expériences de type 3 étude de l'expression des gènes en fonction de la concentration en matière organique (MO) du milieu de survie, incubé à 20E C, permettant une expression optimale dans l'expérience de type 1. L'étude a été réalisée à cinq concentrations différentes en bactotryptone (Difco) allant de 0 à 500 mg/l.

2.2 Principe de la fusion de gènes

L'expression d'un gène peut être quantifiée par l'intermédiaire du dosage de la β -galactosidase, enzyme codée par le gène *lacZ* de l'opéron lactose. Ce gène traceur est fusionné en position 3' du promoteur du gène étudié: la souche étant par ailleurs *LacZ*, toute synthèse de β -galactosidase résultera nécessairement de la transcription de *lacZ*, donc de l'activation du promoteur du gène étudié. Le dosage de la β -galactosidase est exprimé par rapport à la quantité en protéines totales et par ml de suspension cellulaire.

Une des méthodes utilisées pour réaliser la fusion de gènes repose sur le ciblage du gène voulu par insertion d'un phage Mu lysogène, puis de la recombinaison de ce phage avec un autre phage appelé *éplac* et portant l'opéron lactose (Figure 1) (Schwartz, 1985).

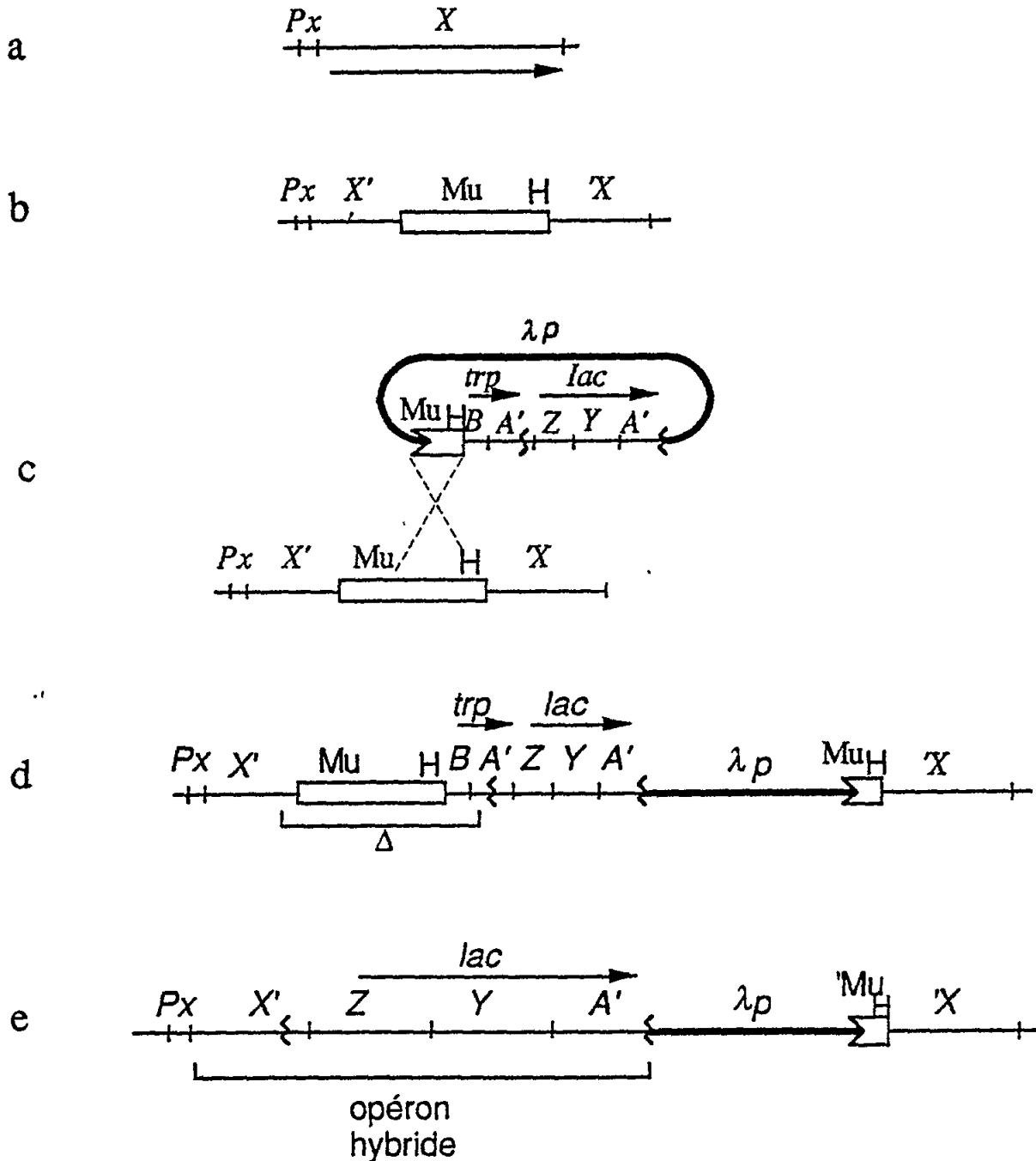


Figure 1. Fusion de l'opéron lactose avec le gène X en utilisant les phages Mu et λlac .

- a Gène X et son promoteur. La souche employée est Lac-.
- b Un phage Mu thermoinductible (Ts) et lysogène est inséré dans le gène X
- c Mu est lysogénisé par le phage λlac par recombinaison homologue. Le phage est dérivé d'une fusion trp-lac ; il ne possède pas de promoteur intact du gène lac .
- d Le phage Mu étant Ts, la sélection de souches Lac+ à 42° C fournit généralement des souches portant la délétion Δ .
- e Le résultat de cette délétion est la fusion de l'opéron lactose sans son promoteur, à la partie 5' du gène X.

(d'après Schwartz, 1985)

2.3 Matériels et méthodes

Souches et conditions de croissance

Toutes les expériences ont été réalisées à l'aide de souches appartenant à l'espèce *E. coli*, la plupart dérivées de la souche K12 MC4100 de Casadaban (1976) (génotype: F- araD139 Δ (arg-lac)U169 rpsL150 relA1 deoC1 ptsF25 rbsR flbB5301).

Ces souches étaient les suivantes:

- * souche à fusion proU-lacZ : EF063 [MC4100 Δ (putPA)101 Δ (proU)600 Δ (proP-lacZ)1 (ëplacMu55)]
- * souche à fusion proP-lacZ : BK16 [M4100 Δ (proU-lacZ) Hyb2 (ëplac Mu 15)]
- * souche à fusion cstA-lacZ : ASM28 [F- Δ lacU169 cst-2::ëplac Mu9 Kn']

Les souches ont été stockées à -80°C en bouillon Nutrient Broth (Difco)(NB) additionné de glycérol (20%, V/V) et conservées sur milieu Nutrient Agar (Difco)(NA). Toutes les cultures ont été incubées pendant 24h à 37°C.

La croissance des souches BK16, EF063 et PLB3261 avant inoculation des milieux de survie a été réalisée en milieu M9 (pH 7,4), dont la composition est la suivante:

Na ₂ HPO ₄	6,0 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
NaCl	0,5 g
NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄ (solution à 1M)	2,0 ml
Glucose (solution à 20%)	10,0 ml
CaCl ₂ (solution à 1M)	0,1 ml
Thiamine (solution à 1 g/l)	1,0 μ l
Eau distillée: QSP: 1 litre	

La souche BK16 a été cultivée en milieu M9 additionné de 2 g/l de "Vitamin free Casamino acids" Difco (M9 CASA) pour la deuxième série d'expériences concernant la fusion proU-lacZ.

La souche AMS28 a été cultivée en milieu M9 additionné de 50 μ g/ml de kanamycine afin de maintenir la pression de sélection des cellules possédant la fusion cstA::lacZ.

Osmolarité du milieu M9: 95 mOsm/kg
Osmolarité du milieu M9 CASA: 107 mOsm/kg

Tests de survie dans l'eau de mer

Ils ont été réalisés dans des flacons erlenmeyer de 2 litres, contenant 600 ml des milieux de survie constitués de mélanges d'eau de mer naturelle filtrée stérile (EMS) et d'eau distillée stérile (EDS) aux proportions calculées pour obtenir les salinités voulues,

sachant que l'eau de la mer Méditerranée a une salinité d'environ 37 g de sel pour 1000 g d'eau.

Salinité en g de sels/kg d'eau	Osmolarité en mOsm/kg*	Molarité NaCl
37	1074	0,50
30	808	0,40
25	701	0,34
20	592	0,27
15	410	0,20
10	253	0,13
5	131	0,07

* L'osmolarité des milieux de survie a été mesurée par un microosmomètre ROEBLING des laboratoires Bioblock.

Les cellules bactériennes, préalablement cultivées sur NA (Difco) ont été incubées pendant 18 h à 37E C en milieu M9. Elles ont été lavées trois fois en eau de mer par centrifugation (10000 x g, 10 min, 20E C et le culot final a été suspendu dans 2ml d'eau de mer. Les microcosmes ont été inoculés à l'aide de ces suspensions, jusqu'à l'obtention d'une concentration cellulaire d'environ 10^7 à 10^8 unités formant colonies (UFC)/ml, soit une DO (600nm) de 0,6-0,7, puis incubés à la température ambiante (20E à 25E C) à l'obscurité pendant environ 10 jours.

Immédiatement après cette inoculation (T_0), puis après un nombre croissant de jours d'incubation dans l'eau de mer, l'expression des gènes ciblés a été mesurée par dosage de l'activité β -galactosidase des cellules, rapportée à leur concentration en protéines.

Mesure de la concentration cellulaire en protéines

Des aliquots de 1,5 ml ont été centrifugés 20 min à 8600 g et à 20E C dans des tubes Eppendorf. Les surnageants ont été jetés et à nouveau 1,5 ml a été prélevé et centrifugé dans le même tube afin d'obtenir un culot cellulaire équivalent à 3 ml de suspension bactérienne. Les surnageants ont été prélevés à la pipette Pasteur et éliminés. Les culots peuvent alors être conservés 1 à 3 jours à -80E C.

Chaque culot a été remis en suspension dans 0,5 ml de NaOH 01, N et placé 10 min à 100E C afin de lyser les cellules.

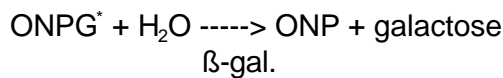
Les protéines totales ont été dosées par la méthode de Pierce (dérivée de la réaction de Biuret) en utilisant le kit "BCA⁺ Protein Assay Reagent". Ce dosage se traduit par une lecture de la DO au spectrophotomètre à 562 nm qui, ramenée à une courbe étalon: $DO_{562} = f(\text{mg de SAB}^{**}/l)$, permet de connaître la quantité de protéines totales en mg de protéine par ml de suspension cellulaire.

Chaque dosage a été effectué en deux exemplaires afin d'obtenir une moyenne significative.

- * BCA=Acide bicinchoninique hautement spécifique des ions Cu⁺⁺
- ** SAB=Sérum albumine bovine

Mesure de l'activité β -galactosidase

Le principe de cette mesure est basé sur le dosage spectrophotométrique à 405 nm d'un substrat chromogène de couleur jaune, l'orthonitrophénol (ONP), produit de la réaction:



- * ONPG=Orthonitrophényl- β -D-galactopyrannoside

La β -galactosidase hydrolyse les β -D-galactosides et son substrat naturel est le lactose. L'activité de la β -galactosidase et par la même le taux d'expression du gène fusionné sont proportionnels à la quantité d'ONP formé.

Protocole

- 2,5 ml de suspension cellulaire sont incubés 30 min à 37°C dans la solution suivante:
 - . 10 ml de tampon phosphate de potassium 0,1M, pH7
 - . 1 mg de chloramphénicol pour stopper la synthèse protéique
 - . 20 μ l de toluène pour perméabiliser les cellules
 - . 20 μ l de désoxycholate de sodium à 1% (détergent puissant)
 - . 100 μ l de β -mercaptoéthanol réducteur des ponts disulfure.
- 2 ml de cette suspension sont ajoutés à 1 ml d'une solution d'ONPG 5mM dans le tampon phosphate de potassium.
- Après un temps d'hydrolyse de trois heures, la réaction est stoppée par 2 ml de Na₂CO₃ 1M qui inactive la β -galactosidase en augmentant le pH et avive la coloration jaune.
- La lecture à 405 nm est faite après centrifugation pour précipiter les cellules et clarifier la suspension.
- La DO mesurée est traduite en quantité d'ONP libéré grâce à une courbe étalon: DO₄₀₅=f(μ moles d'ONP formées en 3 h).
- L'activité de la β -galactosidase est exprimée en nmoles d'ONP formées par minute; cette quantité est rapportée aux mg de protéines totales; le tout exprimé par ml de suspension cellulaire initiale. Cette activité sera légendée sur les courbes en "unités β -gal."

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Influence du superenroulement négatif de l'ADN sur la survie d'*Escherichia coli* dans l'eau de mer

Au cours des trois dernières années, il a été montré que l'état d'enroulement de l'ADN joue un rôle très important dans l'adaptation des entérobactéries (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*) aux stress environnementaux (température, salinité, anaérobiose) en facilitant l'expression de leurs gènes dans les situations extrêmes. Cet état d'enroulement est également impliqué dans l'expression du pouvoir pathogène.

Le but de notre analyse était plus précisément de rechercher s'il existe une relation entre le niveau de superenroulement négatif de l'ADN de cellules d'*E. coli* et leur niveau de résistance à l'eau de mer, évalué par la mesure de la perte de leur pouvoir de culture sur milieu bactériologique. On sait en effet que le maintien de ce superenroulement négatif est indispensable à l'expression des gènes chromosomiques, car il aide à la linéarisation locale de celui-ci et permet ainsi une meilleure fixation de l'ARN polymérase et une facilitation de la transcription. Le degré de superenroulement négatif est modulé par l'activité opposée de deux enzymes principales, la topoisomérase I (activité relaxante, relâchant l'enroulement de l'ADN et contrebalçant le superenroulement négatif) et la topoisomérase II, ou ADN gyrase (qui introduit des supertours négatifs favorables l'expression génique).

Au plan technique, le principe de l'étude était donc d'analyser le comportement en mer de souches mutantes possédant ou non ces enzymes, en examinant parallèlement le degré d'enroulement de l'ADN des cellules dans les mêmes conditions. Cet état d'enroulement a été visualisé en utilisant diverses techniques de biologie moléculaire, à l'aide de souches portant un plasmide à petit poids moléculaire (puC8, 2,5 kb), dénommé "plasmide rapporteur", dont il est plus aisé d'analyser l'ADN (et sa topologie) par électrophorèse en gel d'agarose.

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans la revue "*Molecular Ecology*" (Gauthier *et al.*, 1992). Nous ne détaillerons pas les résultats et la discussion, développés dans cet article, mais donnons ci-après un simple résumé des principales acquisitions découlant du travail effectué.

Le transfert à l'eau de mer de cellules préalablement cultivées à basse osmolarité a provoqué une diminution classique de leur capacité à cultiver sur les milieux bactériologiques, mais sans modification apparente de la superhélicité de leur ADN. Les cellules d'*E. coli* pouvaient être protégées de cette perte de pouvoir de culture par une augmentation du superenroulement négatif de leur ADN en réponse à divers facteurs environnementaux: c'était le cas lorsque les cellules étaient préalablement adaptées par culture en milieu à haute osmolarité (milieu LB + NaCl 0.5M), ou lorsqu'elles étaient incubées dans une eau de mer additionnée de matières organiques (peptone bactériologique, 50 mg/l).

Par ailleurs, diverses situations ont été décrites dans lesquelles il existait une coïncidence entre l'augmentation de la sensibilité des cellules à l'eau de mer et une relaxation induite de l'ADN. Ainsi, l'inactivation de la sous-unité A ou de la sous-unité B de l'ADN gyrase, qui provoque une importante relaxation (ou déroulement) de l'ADN, était accompagnée dans les deux cas par une augmentation de la perte du pouvoir être

expliquée par la seule augmentation de température nécessaire à l'inactivation de la gyrase. De même, une souche portant une mutation sur le topoisomérase I, compensée par une autre mutation dans la sous-unité B de la gyrase, était plus sensible à l'eau de mer que la souche parentale sauvage correspondante. Cette plus grande sensibilité était en outre corrélée à une profonde relaxation de l'ADN. Dans ces cas encore, une préadaptation des cellules en milieu à haute osmolarité avant leur transfert à l'eau de mer leur a conféré une plus grande résistance à ce milieu.

Ces résultats nous ont conduit à proposer et à étayer l'idée selon laquelle la capacité qu'ont les cellules d'*E. coli* à survivre dans l'eau de mer et à maintenir dans ces conditions leur pouvoir de culture sur les milieux bactériologiques, peut être, au moins en partie, liée à l'état topologique de leur ADN, et en particulier à son degré de surenroulement négatif. Cet état pourrait gouverner l'expression des gènes dont les produits permettent la restauration de l'homéostasie cellulaire dans les conditions marines.

3.2 Mesure de l'expression dans l'eau de mer de gènes impliqués dans la protection d'*E. coli*

3.2.1 Limites à l'interprétation des résultats

3.2.1.1 Rinçage des cellules avant inoculation des milieux de survie

Avant d'effectuer les premiers dosages au temps zéro, les cellules ont subi trois rinçages. Il s'est écoulé en moyenne 1 heure entre le premier rinçage de la suspension bactérienne et l'inoculation des milieux de survie. Au cours de cette période, les cellules ont été soumises à divers stress dont les conséquences sur le métabolisme ne peuvent pas être appréciées. De plus, les cellules ont été rincées dans le milieu de survie salé, et non dans de l'eau distillée stérile, afin d'éviter le choc hypoosmotique. Il est donc important de noter qu'au temps zéro, les cellules ont déjà débuté leur adaptation au milieu de survie depuis 1 heure environ.

3.2.1.2 Phénotypes

Une souche portant une fusion X-lacZ possède un gène X non fonctionnel (ou dysfonctionnel): elle a par conséquent un phénotype X- (ou X+ perturbé). Les souches utilisées dans ces expériences ne peuvent donc pas employer correctement les systèmes de régulation codés par leur gène fusionné, ce qui peut ne pas faciliter leur survie en milieu hyperosmotique. Les résultats sont donc vraisemblablement plus significatifs pour les premiers jours de survie, dans toutes les expériences.

D'autre part, si une diminution de l'expression d'une gène est observée, elle ne peut être due à un rétrocontrôle négatif exercé par le produit de ce gène.

3.2.1.3 Dosage des protéines

L'expression des gènes fusionnés est quantifiée en nmoles d'ONP produites par minute et par mg de protéine. Or le dosage des protéines totales révèle d'importantes fluctuations au cours du temps (Figure 2). Ces fluctuations sont dues à un manque de reproductibilité des dosages et donc artéfactuelles.

De ce fait, certains points des courbes représentant la variation des unités β -gal. en fonction du temps ont été supprimés s'ils représentaient des valeurs très élevées, ou très basses, par rapport à l'ensemble des autres points, ces écarts correspondant respectivement à un "creux" ou à un "pic" de la courbe "mg de protéine/ml de suspension cellulaire en fonction du temps".

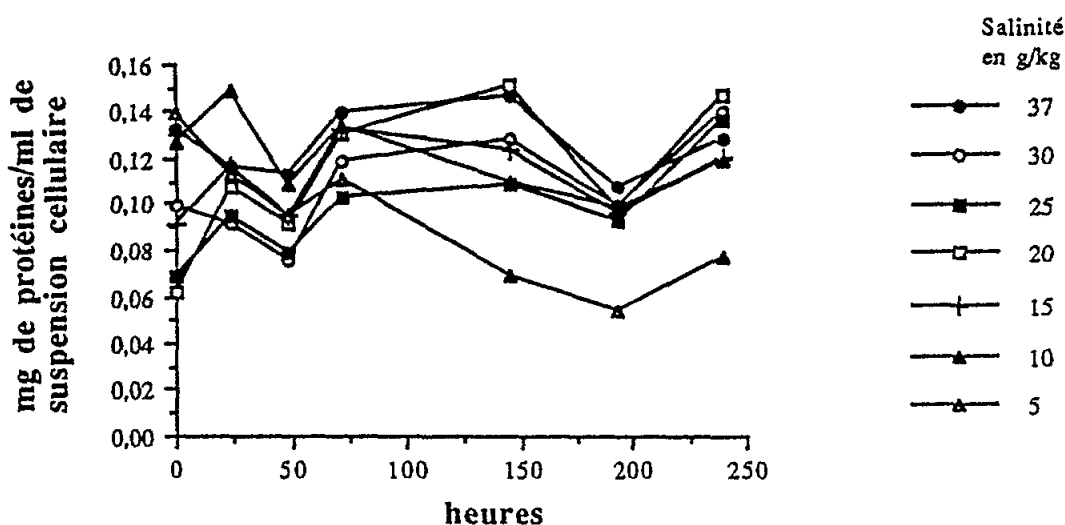


Figure 2. Exemple de la fluctuation au cours du temps de la quantité de protéines totales chez *E. coli* en milieu de survie hyperosmotique. Souche EF063 incubée dans 7 milieux de survie à osmolarité croissante.

Se rapporter à la masse de protéines totales pour exprimer l'activité de la β -galactosidase ne nous a pas paru satisfaisant pour plusieurs raisons:

- variations importantes au cours du temps;
- pas de distinction entre les protéines des cellules vivantes et celles des cellules mortes;
- différences significatives d'un "kit" de dosage protéique à l'autre.

Cette procédure est cependant plus rapide et plus facile à mettre en place, raisons pour lesquelles elle est employée couramment pour ce type d'étude.

3.2.1.4 Valeur statistique et présentation des courbes

Chaque expérience s'étalant sur une dizaine de jours, plusieurs expériences différentes ont été menées en parallèle mais il a été matériellement impossible de reproduire plusieurs fois la même expérience afin d'obtenir des données exploitables statistiquement. Les courbes obtenues ne peuvent donc être présentées que point par point, sans valeur moyenne ni écart-type.

Les milieux de survie sont légendés par salinité (en g/kg) et non pas en osmolarité équivalente pour des raisons de commodité. Mais il faut noter que c'est

milieux de survie et non leur salinité qui entre en jeu dans les phénomènes d'osmorégulation.

3.2.1.5 Etat physiologique et concentration des cellules

Les bactéries étudiées au cours de ces expériences étaient les cellules métaboliquement actives mais la distinction entre les bactéries cultivables et les bactéries viables non cultivables n'a pas été faite. On sait cependant que la quantité de cellules vivantes décroît très vite dès les premiers jours de survie en eau de mer, avec une augmentation du rapport: nombre de cellules VNC/nombre de cellules vivantes (Xu *et al.*, 1982). Les courbes obtenues traduisent donc l'activité d'un nombre de bactéries de plus en plus faible au cours du temps. Si cette quantité cellulaire restait constante, les pentes des courbes seraient beaucoup plus élevées et les phénomènes observés amplifiés.

3.2.2 Résultats

3.2.2.1 Expression des gènes osmorégulés

3.2.2.2.1 Expression de proU

- **Expérience de type 1: expression de proU en fonction du temps, dans l'eau de mer à différentes dilutions**

La souche BK16, qui porte la fusion proU-lacZ, a une croissance très lente en milieu M9 avec un temps de latence d'environ 9 heures et un temps de génération d'environ 3h30. L'expression de proU en fonction du temps d'incubation en milieu de survie, quelle que soit sa salinité, n'a pas dépassé 5 unités β -gal., ce qui peut être considéré comme son niveau minimal d'expression (Figure 3). Ceci pourrait être lié à une déficience génétique causée par la fusion: en principe, les souches BK16 et MC4100 sont isogènes (sauf en ce qui concerne la fusion) et les cellules BK16 devraient se développer facilement en milieu M9 mais la transduction de la fusion a pu perturber une ou plusieurs fonctions cellulaires impliquées dans la croissance sur glucose.

Dans le milieu de culture additionné de Casamino Acids, la croissance de cette souche était plus rapide, avec un temps de latence d'environ 6 heures et un temps de génération d'environ 1 heure. On observait également une activation de l'expression de proU en fonction du temps et de l'osmolarité des milieux de survie, conformément aux résultats décrits dans la littérature (Figure 4).

D'après la Figure 4, l'expression de proU a augmenté avec l'osmolarité du milieu jusqu'à 40 nmoles d'ONP/min/mg de protéine = unités β -gal.), puis a décliné pour les salinités supérieures.

On peut considérer l'activité de la β -galactosidase dans les milieux de survie à salinité de 5, 10, 30 et 37 g/kg comme très faible car inférieure à 10 unités β -gal. (la courbe obtenue avec le milieu de survie de salinité 5 g/kg peut être assimilée à un témoin).

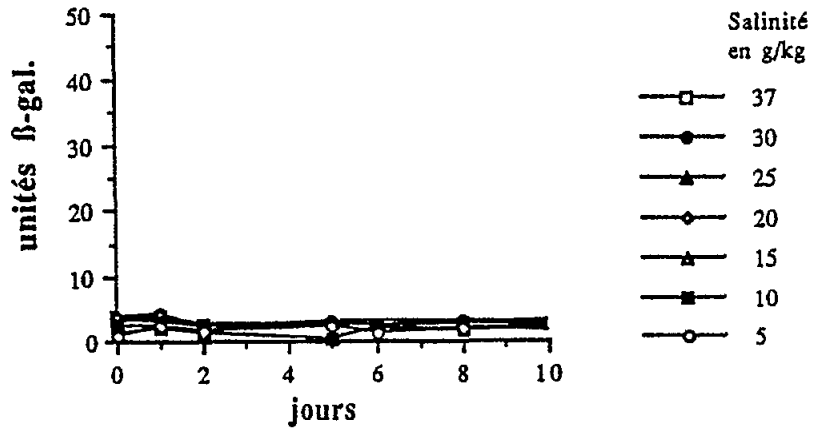


Figure 3. Expression de proU chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer à différentes dilutions, en fonction du temps. Souche BK16 précultivée en milieu M9 et inoculée dans 7 milieux de survie à osmolarité croissante.

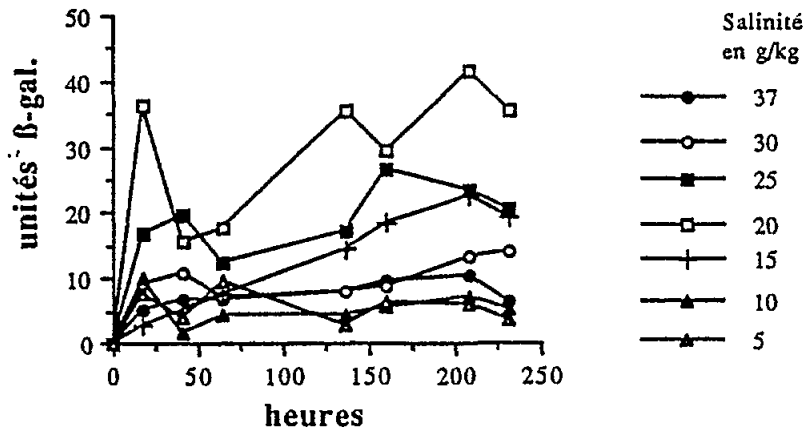


Figure 4. Expression de proU chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer à différentes dilutions, en fonction du temps. Souche BK16 précultivée en milieu M9 et inoculée dans 7 milieux de survie à osmolarité croissante.

Il semble exister un seuil d'activation de l'expression de proU en deçà duquel cet opéron n'est pas ou est très faiblement induit, seuil qui correspondrait à une osmolarité supérieure ou égale à 250 mOsm/kg (soit une salinité de 10 g/kg). D'après Csonka (1989), proU serait induit à partir d'environ 200 mOsm/kg et d'après Cairney et coll. (1985), le seuil d'induction étant d'environ 0,1M de NaCl chez *S. typhimurium*. Ces deux valeurs correspondent à la valeur obtenue en tenant compte des différences de conditions expérimentales. Ce résultat suggère que le transport de GB par le système inductible et à haute affinité ProU peut se faire dans les eaux de mer diluées au 1/4, donc déjà dans les eaux estuariennes.

L'induction maximale de proU s'est produite à une osmolarité d'environ 600 mOsm/kg avec une expression très faible aux osmolarités supérieures à 800 mOsm/kg. L'activité de proU ne serait donc pas optimale dans l'eau de mer. Pourtant Jovanovich et coll. (1988) ont montré que l'expression maximale de proU chez *S. typhimurium* en milieu de croissance supplémenté en NaCl, sur un laps de temps de 120 minutes, se situe à une salinité proche de celle de l'eau de mer (=0,5 M NaCl) avec une diminution de l'expression à des salinités supérieures. Il s'agit cependant de tests de croissance or, outre la carence alimentaire, il est possible que la matrice saline complexe de l'eau de mer joue un rôle non négligeable dans les divergences observées.

Le maximum d'expression observé durant les premiers jours d'incubation des cellules dans l'eau de mer a été retrouvé dans l'expérience de type 2 mais pas dans l'expérience de type 3. On ne peut dire s'il s'agit d'un artéfact de manipulation ou d'une véritable induction en réponse rapide au stress hyperosmotique. L'importance des maxima n'étant pas corrélée à l'osmolarité des milieux de survie, il s'agirait plutôt d'un artéfact.

Après 10 jours de survie, on n'a pas observé de diminution de l'expression de proU. Or la présence de GB intracellulaire atténue cette induction (Sutherland et coll. 1986). La souche étant ProU- et l'eau de mer ne contenant pas de GB, si proU a continué à être activé après 10 jours en milieu hyperosmotique, c'est que les bactéries n'ont ni accumulé, ni synthétisé de GB après ce laps de temps. Elles devaient donc utiliser un autre moyen de préserver leur pression de turgescence (accumulation de glutamate de potassium ou d'un autre osmoprotecteur comme le tréhalose par exemple).

- Expérience de type 2: expression de proU en fonction du temps pour différentes températures d'incubation.

Le milieu de survie utilisé était celui qui a permis une expression optimale dans l'expérience de type 1, soit le milieu de salinité 20 g/kg (osmolarité de 592 mOsm/kg).

Selon la Figure 5, l'induction de proU a augmenté avec la température, ce qui est en accord avec le caractère thermophile d'*E. coli* (optimum de croissance à 37E - 40E C).

On remarque cependant qu'à 9E C, l'induction de proU n'était pas négligeable (elle a atteint 21 unités β -gal. après 4 jours d'incubation).

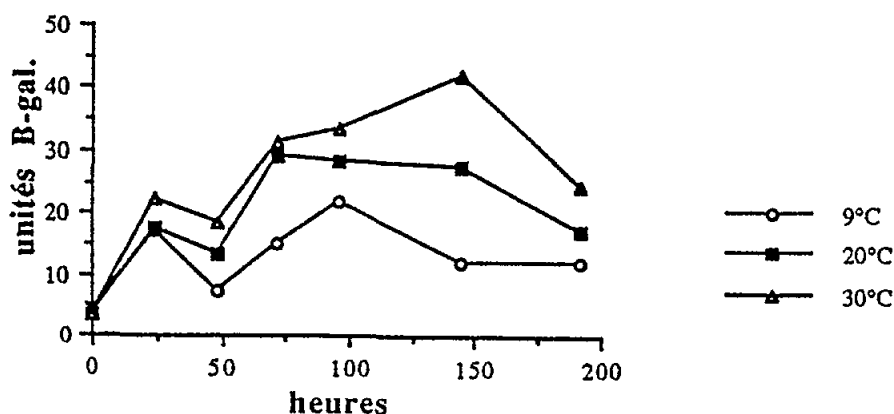


Figure 5. Expression de proU chez *E. coli* en survie en milieu hyperosmotique, en fonction du temps pour différentes températures. Souche BK16 précultivée en milieu M9 CASA et inoculée dans 3 milieux de survie de 592 mOsm/kg placés à 3 températures différentes.

- Expérience de type 3: expression de proU en fonction du temps pour différents teneurs en matière organique.

Les mesures de l'activité β -gal. dans l'eau de mer contenant 500 mg/l de bactotryptone n'ont pu être effectuées après les deux premiers prélèvements (T₀ et 24h) car les cellules ont été lysées par le phage introduit dans le génome des cellules BK16 pour générer la fusion, et devenu lytique dans les conditions de l'expérience.

D'après la Figure 6, l'expression de proU était identique dans les cellules témoin (milieu de survie sans apport de matière organique et aux concentrations inférieures ou égales à 10 mg/l de bactotryptone: elle ne dépassait pas 25 unités β -gal. (excepté le "pic" à 192 h pour la concentration de 1 mg/l qui semble être un artefact de manipulation), et les droites de régression des courbes pour 0 et 10 mg/l étaient parallèles.

Les courbes obtenues pour les milieux de survie contenant 0, 10 et 100 mg de bactotryptone /l peuvent être assimilées à des droites avec un risque α inférieur à 5%. D'après les équations de ces droites, on observe qu'à la concentration de 100 mg/l de bactotryptone, l'expression de proU était 4 fois plus forte qu'en absence de matière organique. Selon les observations antérieures de Gauthier et Le Rudulier (1990), l'expression de proU dans les mêmes conditions de préculture et de survie était également environ 4 fois supérieure dans un milieu de survie supplémenté avec 21,3 mg/l de matière organique que dans un milieu de survie n'en contenant que 4,8 mg/l.

L'induction de proU a été beaucoup plus importante en présence de 100 et 500 mg/l de bactotryptone:

- après 10 jours d'incubation, l'expression de proU en présence de 100 mg/l de bactotryptone a atteint 85 unités β -gal. alors qu'elle n'a pas dépassé 40 unités dans les autres types d'expérience;
- après 1 jour seulement, l'induction de proU en présence de 500 mg/l de bactotryptone a atteint 200 unités β -gal.

La bactotryptone est constituée d'un mélange de petits peptides et d'acides aminés dont la présence à de forte concentration favorise donc l'induction de proU, vraisemblablement en augmentant le potentiel énergétique des cellules (Gauthier et coll., 1991). Cette augmentation du potentiel métabolique et énergétique peut agir de différentes façons: en augmentant la réponse osmorégulatrice primaire (accumulation de potassium) responsable de l'induction de proU, en agissant directement sur les mécanismes responsables de la transcription de proU, en favorisant la mise en place du système ProU au niveau des enveloppes, ou simplement en augmentant le nombre de cellules vivantes métaboliquement actives par rapport aux nombre de cellules mortes.

Il faut considérer que, dans une eau de mer contenant 500 mg de bactotryptone/l, les cellules se trouvent en condition de croissance. Ceci n'est probablement jamais le cas en mer: la concentration en matière organique de l'eau de mer est égale, en moyenne à 4 mg/l et dépasse rarement 10 mg/l (Brisou et coll., 1965). De plus, cette matière naturelle n'est pas en totalité assimilable par les bactéries. Les courbes obtenues à 0,1 et 10 mg/l de bactotryptone reflètent donc les conditions de survie en milieu marin oligotrophe et l'expression de proU y est faible.

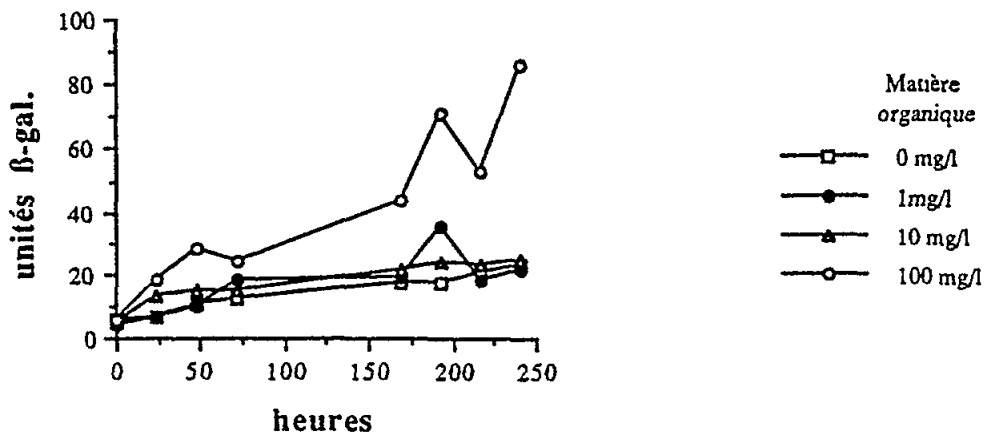


Figure 6. Expression de proU chez *E. coli* en survie en milieu hyperosmotique, en fonction du temps, pour différentes teneurs en matière organique. Souche BK16 précultivée en milieu M9 CASA et inoculée dans 5 milieux de survie de 592 mOsm/kg supplémentés en concentrations croissantes de bactotryptone.

Dans l'eau de mer contenant 100 mg de matière organique/l, aucune diminution de l'expression de proU n'a été observée au cours du temps; la GB ne serait donc pas suffisamment synthétisée par les cellules malgré l'apport de substrats métabolisables. Cette synthèse dépend en fait de l'expression des gènes bet (non étudiés ici), et de l'existence dans le milieu (ou dans les cellules) du précurseur de la GB, la choline.

3.2.2.1.2 Expression de proP

- Expérience de type 1: expression de proP en fonction du temps, dans l'eau de mer à différentes dilutions

Selon les données de la Figure 7, le taux d'expression de proP a augmenté avec l'osmolarité du milieu de survie. Aux salinités de 5 et 10 g/kg, on peut considérer l'expression comme négligeable car inférieure à 10 unités β -gal. et restant à peu près constante pendant 10 jours (la courbe obtenue à la salinité 5 peut être assimilée à un témoin).

D'après Koo et coll. (1991), la concentration saline à partir de laquelle la GB est accumulée via proP est de 0,15 M de NaCl, ce qui correspond au seuil observé ici: supérieur ou égal à 10 g/kg, soit 253 mOsm/kg (0,13 M de NaCl).

L'activité maximale de proP (50 unités β -gal.) a été observée pour une osmolarité de 808 mOsm/kg (sal.30). Elle n'a atteint que 35 unités β -gal. environ dans l'eau de mer non diluée. Dans l'eau de mer naturelle, les cellules seraient donc en conditions voisines de l'optimum pour l'expression de proP.

Aux salinités élevées (supérieures ou égales à 20 g/kg), un maximum d'expression de proP a été observé le premier jour, suivi d'une baisse de l'activité qui s'est stabilisée à un niveau à peu près constant pendant les neuf jours suivants. Comme pour l'expression de proU, il est difficile de savoir s'il s'agissait d'un artefact ou d'une induction initiale de proP en réponse immédiate au choc hyperosmotique.

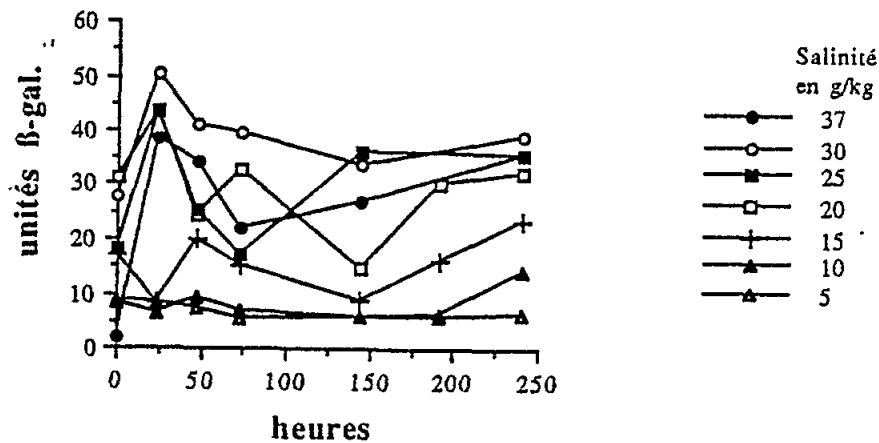


Figure 7. Expression de proP chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer à différentes dilutions, en fonction du temps.

Souche EF063 précultivée en milieu M9 et inoculée dans 7 milieux de survie à osmolarité croissante.

Durant les 10 jours de survie, on n'a pas observé de diminution de l'expression de proP. Si l'accumulation de GB ou de proline peut inhiber proP par rétrocontrôle, ce mécanisme n'a pu exister ici car les cellules EF063 ont un phénotype ProP-/ProU-.

- **Expérience de type 2: expression de proP dans l'eau de mer en fonction du temps pour différentes températures d'incubation.**

Le milieu de survie utilisé était dans ce cas l'eau de mer stérile non diluée, où l'expression de proP était voisine de l'optimum (1074 mOsm/kg).

D'après la Figure 8, l'induction de proP, comme celle de proU, augmente avec la température, avec une activité non négligeable à 9° C allant jusqu'à 40 unités β -gal.

Une baisse de l'expression a été observée après environ 150 heures de contact avec l'eau de mer, peut-être due au rétablissement de la pression de turgescence des cellules.

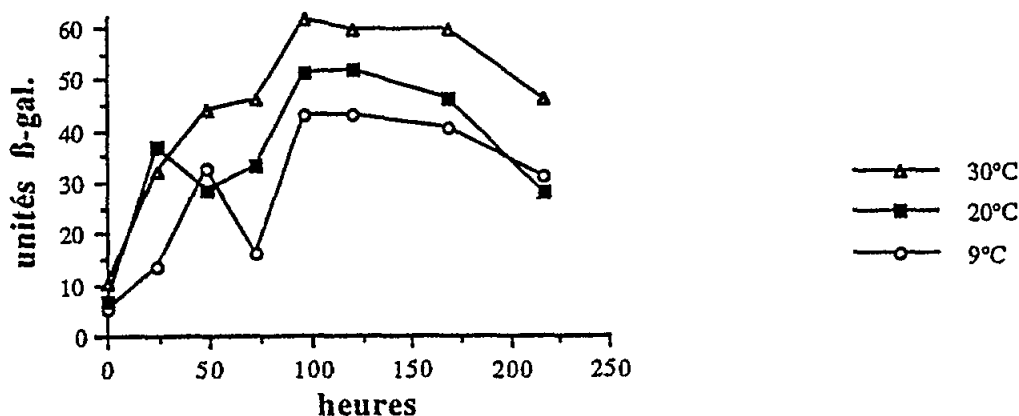


Figure 8. Expression de proP chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer en fonction du temps, pour différentes températures d'incubation. Souche EF063 précultivée en milieu M9 et inoculée dans 3 milieux de survie (1074 mOsm/kg) placés à 3 températures différentes.

Expérience de type 3: expression de proP dans l'eau de mer en fonction du temps pour différentes teneurs en matière organique

Les données de la Figure 9 montrent que, contrairement à proU, l'expression de proP n'a pas augmenté en présence de bactotryptone. Les courbes aux concentrations de 0 à 100 mg/l de matière organique ne sont pas significativement différentes. L'expression de proP pourrait même avoir été inhibée en présence de 500 mg/l de bactotryptone.

Des taux similaires d'expression de proP ont été obtenus chez des bactéries carencées en acides aminés, ou incubées dans un milieu hyperosmotique de 510 mOsm/kg (Booth et coll., 1988). L'induction de ce gène ne serait donc pas dépendante de la concentration en matière organique du milieu, mais serait plutôt liée à l'état de stress cellulaire.

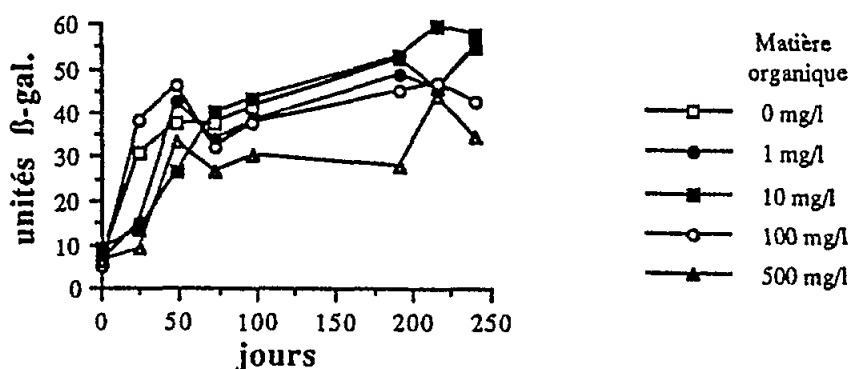


Figure 9. Expression de proP chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer, en fonction du temps, pour différentes teneurs en matière organique. Souche EF063 pré-cultivée en milieu M9 et inoculée dans 5 milieux de survie de 1074 mOsm/kg supplémentés par des concentrations croissantes de bactotryptone.

Des taux similaires d'expression de proP ont été obtenus chez des bactéries carencées en acides aminés, ou incubées dans un milieu hyperosmotique de 510 mOsm/kg (Booth et coll., 1988). L'induction de ce gène ne serait donc pas dépendante de la concentration en matière organique du milieu, mais serait plutôt liée à l'état de stress cellulaire.

- Expression moyenne de proP chez *E. coli* dans des conditions de survie proches de celles du milieu marin

La Figure 10 présente la moyenne des valeurs d'expression obtenues aux trois conditions reflétant au plus près celles de l'eau de mer naturelle: 20° C, osmolarité d'environ 1000 mOsm/kg, absence de matière organique. On y observe une expression très importante du gène proP dès les premières 24 heures (35 unités β-gal.), correspondant à la réponse immédiate des cellules au choc hyperosmotique. Ce taux d'induction augmente ensuite plus lentement jusqu'à atteindre 50 unités β-gal. au bout des 10 jours.

Malgré les écarts-types importants des trois dernières valeurs, l'allure de cette courbe reflète assez bien l'allure générale des courbes des figures 7, 8 et 9.

On peut donc supposer qu'il puisse exister une première induction rapide et importante de l'expression de proP en réponse immédiate à un choc hyperosmotique, visant à rétablir au plus vite la pression de turgescence. Selon Booth et coll. (1988), ProP est le système majeur pour l'accumulation de la GB pendant la phase initiale d'adaptation des cellules au choc hyperosmotique.

Les cellules EF063 ne pouvant ni transporter, ni synthétiser la GB ou la proline, l'induction de proP se maintient tant que les cellules n'ont pas rétabli leur pression de turgescence par d'autres moyens.

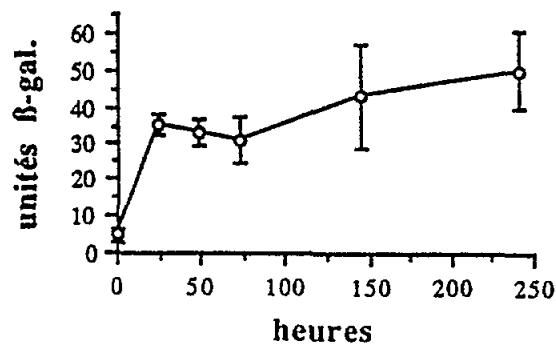


Figure 10. Expression moyenne en fonction du temps de proP chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer (1074 mOsm/kg), à 20°C et en absence de MO.

Les valeurs représentées sont la moyenne des valeurs des 3 courbes des figures 10, 11 et 12 dans les conditions ci-dessus, avec leurs écarts types.

Comparaison de l'expression des gènes proU et proP

ProU et ProP sont deux systèmes impliqués dans le transport de GB en réponse secondaire à la perte de turgescence. Leurs gènes ou opérons respectifs subissent tous deux une induction corrélée positivement à l'osmolarité du milieu et donc à la perte de turgescence des cellules. Le seuil d'activation est supérieur ou égal à 250 mOsm/kg pour les deux ensembles de gènes et l'activité maximale se produit aux environs de 600 mOsm/kg pour proU (environ 40 unités β-gal.) et de 800 mOsm/kg pour proP (environ 50 unités β-gal.).

Dans l'eau de mer, proP serait donc le plus proche de son optimum d'expression chez *E. coli*. Ce système reste cependant beaucoup moins efficace que ProU pour le transport de la GB et, par voie de conséquence, pour la protection des entérobactéries dans l'eau de mer. En effet, l'affinité de proU pour cette molécule est environ 50 fois supérieure à celle de proP et les concentrations de GB dans l'eau de mer sont vraisemblablement très faibles, sauf dans certains sédiments à forte teneur en matière organique.

3.2.2.1.3 Expression de ompC

- Expérience de type 1: expression de ompC en fonction du temps, dans l'eau de mer à différentes dilutions

La Figure 11 montre des courbes établissant une relation polynomiale entre les valeurs en abscisse et en ordonnée pour chaque salinité étudiée (risque < 1%), excepté pour la courbe 5 qui montre une indépendance des unités β -gal. par rapport au temps d'incubation (coefficient de détermination nul). On observe sur cet ensemble de courbes, une nette activation de l'expression de ompC en fonction de l'osmolarité du milieu. L'expression était très faible à 5 g/kg et représentait le niveau basal d'activation de ompC à 50 unités β -gal. Elle a atteint 100 unités β -gal. pour la salinité 10 g/kg et 200 unités β -gal. environ pour les salinités 15, 20, 30 et 37 kg (courbes non significativement différentes).

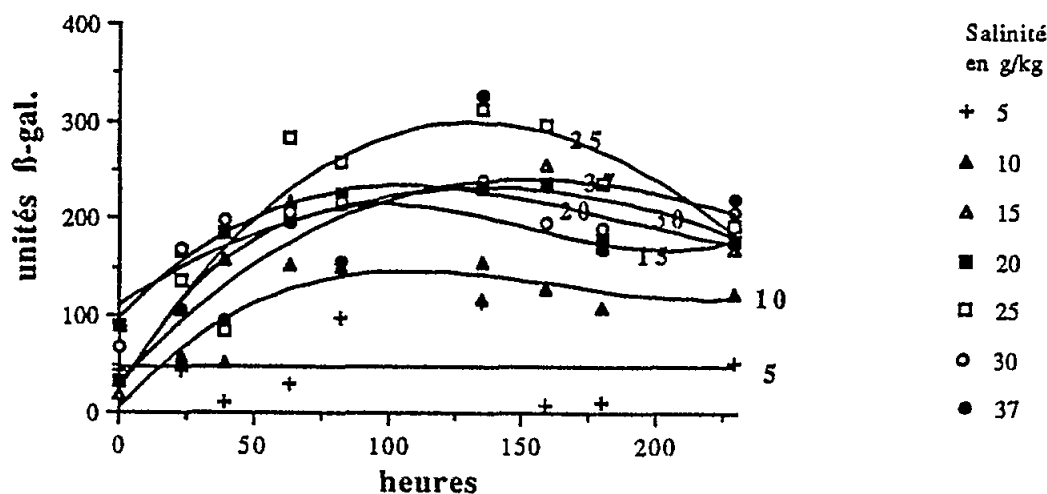


Figure 11. Expression de ompC chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer à différentes dilutions, en fonction du temps. Souche PLB3261 précultivée en milieu M9 et inoculée dans 7 milieux de survie à osmolarité croissante. Les chiffres en caractères gras indiquent la salinité du milieu de survie employé.

L'allure générale des courbes suggère que l'activation de ompC était lente et progressive pendant les 75 premières heures d'incubation, puis qu'elle s'est ensuite stabilisée. Cette stabilisation de l'activation de ompC n'a pas été observée dans les expériences de types 2 et 3 (Figures 12, 13 et 14).

- **Expérience de type 2: expression de ompC chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer en fonction du temps, pour différentes températures d'incubation**

Selon la Figure 12, une température supérieure à 20° C a favorisé l'expression de ompC: pour les incubations à 9 et 20° C, les droites de régression étaient pratiquement parallèles (pentes respectives de 0,67 et 0,71); le taux d'expression de ompC était donc identique à ces deux températures.

A 30° C, par contre, le taux d'expression était deux fois plus élevé, ce qui confirme les données de la littérature selon laquelle ompC est induit à haute osmolarité et haute température, conditions reflétant celles du milieu intestinal.

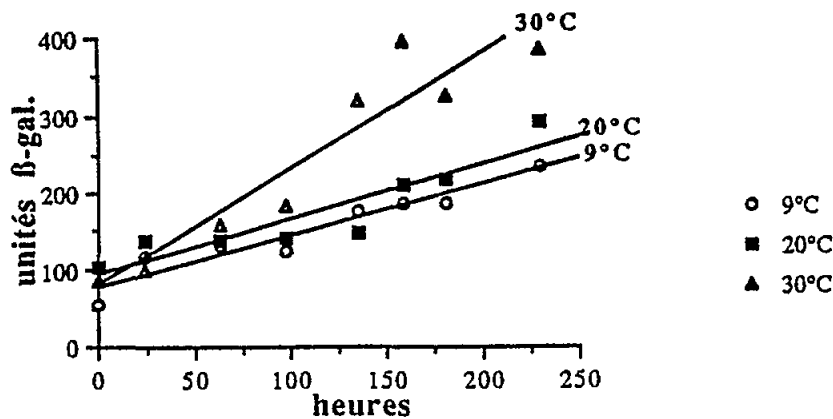


Figure 12. Expression de ompC chez *E. coli* en conditions de survie en milieu hyperosmotique, en fonction de la température.

Souche PLB3261 précultivée en milieu M9 et inoculée dans 3 milieux de survie de 1074 mOsm/kg placés à 3 températures différentes.

Les droites de régression sont tracées avec un risque α inférieur à 1%.

- **Expérience de type 3: expression de ompC en fonction de la concentration en matière organique**

Comme le montrent les données représentées dans la Figure 13, l'expression de ompC s'est révélée indépendante de la concentration en matière organique du milieu de survie.

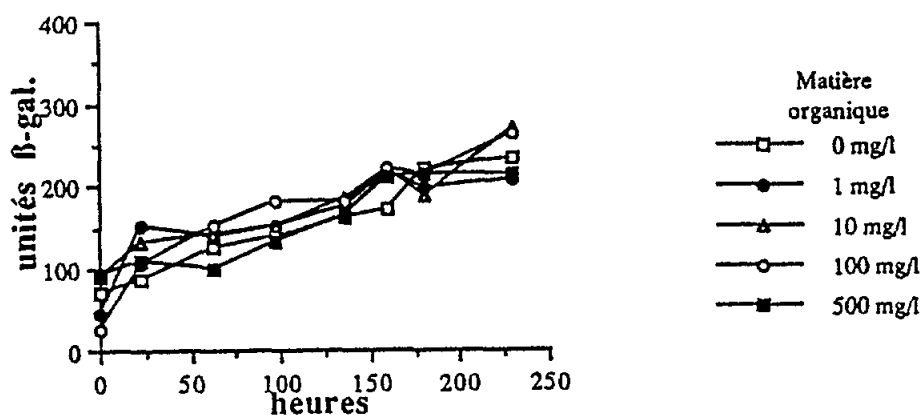


Figure 13. Expression de *ompC* chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer, en fonction du temps, pour différentes teneurs en matière organique. Souche PLB3261 précultivée en milieu M9 et inoculée dans 5 milieux de survie de 1074 mOsm/kg additionnés de quantités croissantes de bactotryptone.

Selon certains résultats antérieurs (non publiés) obtenus dans notre Laboratoire avec la même souche PLB3261 précultivée en milieu M9 additionné de NaCl 0,5 M (osmolarité de 1027 mOsm/kg) et inoculée en eau de mer stérile dans les mêmes conditions qu'ici, l'expression de *ompC* augmentait 4,25 fois en présence de 50 mg/l de matière organique. Il y aurait donc activation de l'expression de ce gène en présence de substrats organiques assimilables, mais uniquement dans des cellules préadaptées à l'hyperosmolarité, c'est à dire dans lesquelles les mécanismes permettant de rétablir la pression de turgescence à haute osmolarité sont déjà installés. La cellule peut ainsi utiliser son énergie pour d'autres fonctions, dont la synthèse de porines, lorsqu'elle est confrontée à une osmolarité élevée comme celle de l'eau de mer.

- Expression moyenne de *ompC* chez *E. coli* dans des conditions de survie proches de celles du milieu marin

Les expériences de types 2 et 3 ont été effectuées à partir de la même suspension bactérienne cultivée en milieu M9, ce qui explique la similitude des courbes: la pente moyenne des droites de régression (significatif au seuil < 1%) des courbes de la Figure 13 est égale à la pente moyenne des droites de régression des courbes de la Figure 12 aux températures de 9 et 20° C. On peut en déduire que le taux d'expression de *ompC* était identique, dans ces conditions d'expériences, à 9 ou 20° C, et quelle que soit la concentration en matière organique assimilable.

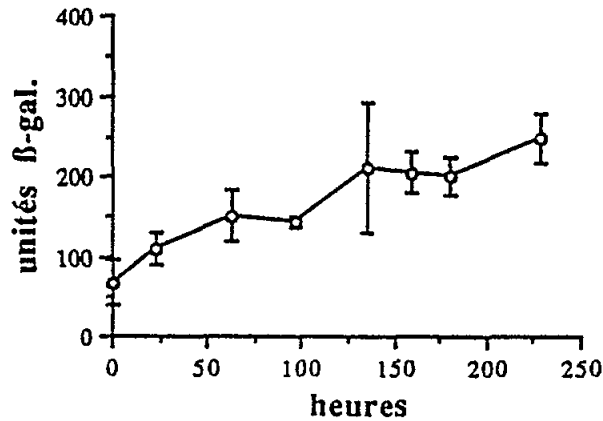


Figure 14. Expression moyenne en fonction du temps de *ompC* chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer (1074 mOsm/kg), à 20° C et en absence de MO. Les valeurs représentées sont la moyenne des valeurs des 3 courbes des figures 11, 12 et 13 dans les conditions ci-dessus, avec leurs écarts types.

3.2.2.2 Expression du gène non osmorégulé *cstA*

3.2.2.2.1 Expression de *cstA* chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer à différentes dilutions, en fonction du temps

La figure 15 montre que l'augmentation de l'osmolarité a abaissé le taux d'expression de *cstA* dans les cellules carencés en carbone: en effet, dans les milieux de survie d'osmolarité supérieure à 592 mOsm/kg (salinité 20), le taux d'expression de ce gène était environ deux fois plus faible qu'aux osmolarités inférieures ou égal à 253 mOsm/kg (salinités 10 et 15), avec un taux d'expression intermédiaire pour la salinité 15.

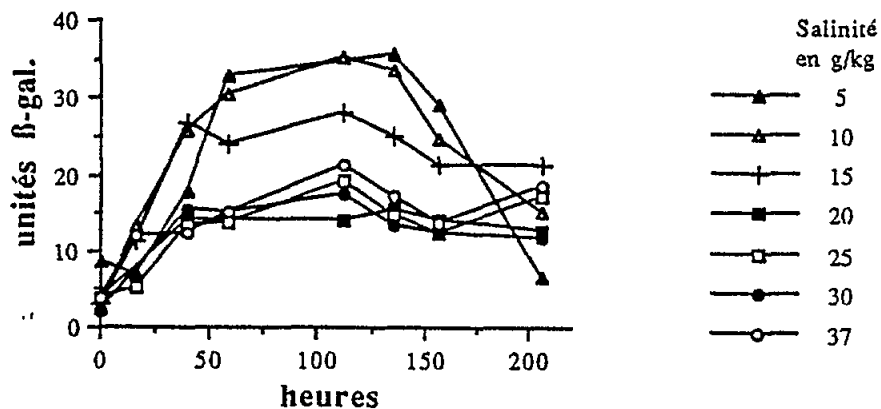


Figure 15. Expression de *cstA* chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer à différentes dilutions, en fonction du temps. Souche AMS28 précultivée en milieu M9 + 50 µg/ml de Kn, et inoculée dans 7 milieux de survie à osmolarité croissante.

La pente des courbes représentant le taux d'expression en fonction du temps a été forte durant les deux premiers jours, puis s'est atténuée et un maximum d'activité a été atteint environ après 100 heures d'incubation dans l'eau de mer. Dès lors, le taux d'expression s'est à peu près stabilisé aux hautes osmolarités alors qu'il a fortement décliné aux basses osmolarités. Cette décroissance ne pouvait être due à un rétrocontrôle négatif puisque les cellules portant la fusion avaient un phénotype CstA-.

L'induction de *cstA* et des autres gènes appartenant à cette famille dépend, nous l'avons signalé plus haut, de la présence d'AMPc. Le faible taux d'expression de *cstA* aux hautes osmolarités, ou même sa décroissance à long terme aux osmolarités plus faibles, pourraient être dus à l'épuisement du pool d'AMPc dans les cellules en survie dans l'eau de mer oligotrophe, ou résulter d'un défaut de fixation de cet élément en amont du promoteur du gène *cstA* dans ces conditions.

3.2.3 Conclusions

Les gènes ou opérons étudiés ont montré un faible taux d'expression chez *E. coli* en survie dans l'eau de mer. La carence nutritionnelle et/ ou l'hyperosmolarité réduisent donc considérablement le potentiel d'expression des gènes nécessaires à la survie dans ces conditions. Ce taux d'expression peut cependant être augmenté lorsque les cellules sont préadaptées à la haute osmolarité (croissance ou séjour préalable en milieu salé). Il faut donc tenir compte des étapes suivies par les bactéries avant d'arriver en milieu marin pour estimer leur potentiel adaptatif dans ce milieu. On sait que le milieu entérique est caractérisé par une forte osmolarité, ce qui prédisposerait à la survie en eau de mer les bactéries qui en sont issues. Leur transit préalable dans les eaux usées, froides et à basse osmolarité, peut cependant modifier cette propriété et augmenter leur sensibilité à l'eau de mer (Combarro *et al.*, 1991).

Les trois gènes ou opérons osmorégulés *proU*, *proP* et *ompC* sont induits directement ou indirectement par la perte de turgescence et voient leur expression augmenter avec l'osmolarité. Il semblent présenter un maximum d'expression pour une osmolarité proche de celle de l'eau de mer naturelle. De même, leur degré d'expression s'élève lorsque la température se rapproche de l'optimum thermique de l'espèce considérée, ici *E. coli*, avec cependant un taux d'expression non négligeable dans les basses températures (9E C). Si la concentration en matière organique assimilable de l'eau de mer n'a aucun rôle dans l'induction de *ompC* et de *proP*, elle active fortement l'expression du système de transport à haute affinité de la glycine bêtaïne *proU*. Elle permet en outre le maintien du potentiel énergétique et métabolique des cellules, qui favorise l'utilisation optimale des fonctions cellulaires sollicitées pour l'adaptation aux conditions marines et réduit du même coup les stress nutritionnel et osmotique. Les risques de pollution des eaux marines par *E. coli*, et par extension, par les entérobactéries pathogènes pour l'homme sont par conséquent plus importants dans les eaux chaudes et riches en matières organiques.

Le gène non osmorégulé *cstA*, qui intervient dans l'adaptation à la carence en source de carbone, est très faiblement exprimé dans l'eau de mer à son osmolarité normale. Dans le milieu marin, *E. coli* (et probablement les autres bactéries entériques) doit faire face à deux types de stress majeurs (si l'on excepte l'irradiation lumineuse, qui génère des désordres drastiques mais procède de mécanismes très différents): les stress osmotique et nutritionnel, et il semble logique de supposer que la priorité métabolique soit

le rétablissement de la pression de turgescence plutôt que l'adaptation à la carence alimentaire, car le rétablissement de l'homéostasie nécessite avant tout celui de l'équilibre osmotique. Ce de fait, les bactéries sont d'autant plus capables de surmonter le stress nutritionnel que le choc osmotique a été bien compensé.

4. REFERENCES

- Benson, S.A., A. Decloux. Isolation and characterization of outer membrane permeability mutants in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1985, **161**:361-367.
- Booth, I.R., J. Cairney, L. Sutherland, C.F. Higgins. Enteric bacteria and osmotic stress: an integrated homeostatic system. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.*, 1988, 355-495.
- Brisou, J., Y. De Rautlin de la Roy, D. Rigomier. Teneur en matière organique du milieu marin et vie microbienne. *Comptes Rendus des séances de la Société de Biologie*, 27 Février 1965, **159(3)**:745.
- Cairney, J., I.R. Booth, C.F. Higgins. *Salmonella typhimurium proP* gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine. *J. Bacteriol.*, 1985a, **164(3)**: 1218-1223.
- Cairney, J., I.R. Booth, C.F. Higgins. Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium* : proU encodes an osmotically induced betaine transport system. *J. Bacteriol.*, 1985b, **164(3)**: 1224-1232.
- Casadaban, M.J. Transposition and fusion of the lac genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage Lambda and Mu. *J. Mol. Biol.*, 1976, **104**: 541-555.
- Cayley, S., B.A. Lewis, M.T. Record Jr. Origins of the osmoprotective properties of betaine and proline in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.*, 1992, **174(5)**: 1586-1595.
- Combarro Combarro, M.P. Adaptacion de bacterias entericas (modelo *Escherichia coli*) en el medio ambiente marino (Abril 1991-Agosto 1991). *Memoria de Posdoctorado*, 1991, 67 p.
- Csonka, L.N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.*, 1989, **53(1)**: 121-147.
- Dattananda, C.S., J. Gowrishankar. Osmoregulation in *Escherichia coli*: complementation analysis and gene-protein relationships in the proU locus. *J. Bacteriol.*, 1989, **171(4)**: 1915-1922.
- Gauthier, M.J., S.A. Benson, G.N. Flatau, R.L. Clément, V.A. Breittmayer, P.M. Munro. OmpC and OmpF porins influence viability and culturability of *Escherichia coli* cells incubated in seawater. *Microb. Releases*, 1992, **1**: 47-50.

- Gauthier, M.J., G.N. Flatau, V.A. Breittmayer. Protective effect of glycine betaine on survival of *Escherichia coli* cells in marine environments. *Wat. Sci. Tech.*, 1991, **24(2)**: 129-132.
- Gauthier, M.J., B. Labedan, V.A. Breittmayer. Influence of DNA supercoiling on the loss of culturability of *Escherichia coli* cells incubated in seawater. *Microbial Ecology*, 1992, **1**: 183-190.
- Gauthier, M.J., P. Thomas, P.M. Munro. Modification de la structure des enveloppes et du contenu en protéines d'*Escherichia coli* en survie dans l'eau de mer. *Can. J. Microbiol.*, 1989, **35**: 843-849.
- Grimes, D.J., R.W. Atwell, P.R. Brayton, L.M. Palmer, D.M. Rollins, D.B. Roszak, F.L. Singleton, M.L. Tamplin, R.R. Colwell. The fate of enteric pathogenic bacteria in estuarine and marine environments. *Microbiol. Sci.*, 1986 **3(11)**: 324-326.
- Groat, R.G., A. Matin. Synthesis of unique polypeptides at the onset of carbon starvation in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.*, 1986, **1**: 69-73.
- Jovanovich, S.B., M. Martinell, M.T., Record Jr, R.R. Burgess. Rapid response to osmotic upshift by osmoregulated genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1988, **170(2)**: 534-539.
- Kanamaru, K., H. Aiba, S. Mizushima, T. Mizuno. Signal transduction and osmoregulation in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 1989, **264(36)**: 21633-21637.
- Koo, S.P., C.F. Higgins, I.R. Booth. Regulation of compatible solute accumulation in *Salmonella typhimurium* : evidence for a glycine betaine efflux system. *J. Gen. Microbiol.*, 1991, **137**: 2617-2625.
- Le Rudulier, D., A.R. Strom, A.M. Dandekar, L.T. Smith, R.C. Valentine. Molecular biology of osmoregulation, *Science*, 1984, **224**: 1064-1068.
- Lucht, J.M., E. Bremer. Characterization of mutations affecting the osmoregulated proU promoter of *Escherichia coli* and identification of 5' sequences required for high-level expression. *J. Bacteriol.*, 1991, **173(2)**: 801-809.
- Matin, A. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*, 1991, **5(1)**: 3-10.
- May, G., E. Faatz, M. Villarejo, E. Bremer. Binding protein dependent transport of glycine betaine and its osmotic regulation in *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.*, 1986, **205**: 225-233.
- McKay, A.M. Viable but non-culturable forms of potentially pathogenic bacteria in water. *Lett. Appl. Microbiol.*, 1992, **14**: 129-135.
- Meury, J. Glycine betaine reverses the effects of osmotic stress on DNA replication and cellular division in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.*, 1988, **149**: 232-239.

- Nikaido, H., M. Vaara. 3. Outer Membrane. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and Molecular Biology*. 1987, 7-22.
- Ramirez, R.M., M. Villarejo. Osmotic signal transduction to proU is independent of DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1991, **173(2)**: 879-885.
- Reeve, C.A., A.T. Bockman, A. Matin. Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.*, 1984, **157(3)**: 758-763.
- Schaechter, M., F.C.1. Neidhardt. Introduction. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and Molecular Biology*. 1987, 1-2.
- Schultz, J.E., G.I. Latter, A. Matin. Differential regulation by cyclic AMP of starvation protein synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 1988, **170(9)**: 3903-3909.
- Schwartz, M. Chapter 5 : Gene Fusions in Bacteria. In: *Genetics of Bacteria*, 1985, 65-84.
- Selander, R.K., D.A. Caugant, T.S. Whittam. 3. Genetic Structure and Variation in Natural Populations of *Escherichia coli*. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Cellular and Molecular Biology*. 1987, 1625-1648.
- Stock, J.B., A.J. Ninfa, A.M. Stock. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 1989, **53(4)**: 450-490.
- Sutherland, L., J. Cairney, M.J. Elmore, I.R. Booth, C.F. Higgins. Osmotic regulation of transcription: induction of the proU betaine transport gene is dependent on accumulation of intracellular potassium. *J. Bacteriol.*, 1986, **168(2)**: 805-814.
- Xu, H.S., N. Roberts, F.L. Singleton, R.W. Attwell, D.J. Grimes, R.R. Colwell. Survival and viability of nonculturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. *Microb. Ecol.*, 1982, **8**: 313-323.

METABOLIC AND STRUCTURAL CHANGES IN *E. COLI* CELLS STARVED IN SEAWATER

By

M. PAPANETROPOULOU, K. ZOUMBOU and A. NICOLOPOULOU
Environmental Microbiology Division, Public Health Laboratory,
Medical School, University of Patras, Greece

1. INTRODUCTION

Escherichia coli (*E. coli*) is one of the commonest causative agents for human infections. Although not an indigenous water bacterium, it is very important for public health and has long been used as an indicator organism for water quality (Hunt 1972).

However, nutrient concentration and energy sources in water are different from those within the human body. Starving *E. coli* cells have sensing systems and switching mechanisms to select alternative responses. When enteric bacteria are exposed to an oligotrophic environment they might be killed, survive, or be injured so as to be unable to produce colonies on standard media (APHA 1989). Failure to recover stressed cells after exposure to the marine environment can lead to underestimation of the associated health risk (Rhodes and Kator 1988). The disappearance of β -galactosidase activity in *E. coli* cells starved in seawater and the appearance of gelatinase activity makes them unidentifiable on the second day of starvation. This has a significant implication for their enumeration by conventional methods (Munro *et al.* 1987). In order to survive under starvation conditions, the microbial cells undergo structural and physiological changes.

The aim of this work was to follow these modifications (enzymatic activities, alterations of protein synthesis of the outer membrane, modification of hemagglutination test of human group A erythrocytes and changes of sensitivity pattern to antibiotics of clinical *E. coli* strains) in order to illustrate their cellular alterations during starvation in seawater over time.

An understanding the pathways of starvation-survival of pathogens related to public health is of fundamental importance.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Bacterial strains and media

Thirteen *E. coli* strains of different biotype, all isolated from bench positive urine and stool cultures, were used in this study (Bench collection of our laboratory).

Biotyping was performed by API 20 E system (Analytical Profile Index) (La Balme Les Grottes, 38390 Montalieu - Vercieu - France) while serotyping of *E. coli* strains was performed by specific Difco antisera (Table I).

All *E. coli* isolates used in this study are listed in table I. Bench cultures were maintained in skimmed milk - 70E C. MacConkey agar (Difco) was used for subculturing *E. coli* strains and Mueller Hinton broth (Difco) for their initial inoculation. Sea salts (S 9883 Sigma), an artificial salt mixture closely resembling the composition of the dissolved salt of ocean water was used for washing *E. coli* cells. Seawater from Allissos bay was taken during the period of experiments. The water was filtered first through three layers of Whatman No 1 filter paper then through a 0.45 µm, membrane filter (millipore corp). The system for measuring the enzymatic activities of the strains studied was Api ZYM strips (La Balme Les Grottes, 38390 Montalieu - Vercieu France).

2.2 Starvation procedure

Each strain was inoculated in 5 ml Mueller-Hinton broth and incubated at 37E C for 6 hours. After centrifugation, the deposit was washed with artificial seawater. The deposit was diluted in 50 ml filtered seawater to a density of approximately 10⁵ CFU/ml. Api 20 E system modified by Mc Donald (1992) was used for biotyping *E. coli* strains during their starvation in seawater over time and Api ZYM was used for following the modification of the enzymatic activities of the tested strains with time.

2.3 Preparation of protein samples

Cells were disrupted by sonication four times (15 sec each time) on ice. Unbroken cells and large fragments were removed by centrifugation for 10 min at 1200 xg. The supernatant fluid was centrifuged for 90 min at about 4500 xg. The pellet obtained, was resuspended in a buffer 50 mM. Trissarcosine pH 7.6 containing 1.7% SDS and remained for 40 min at room temperature. The suspension was centrifuged again for 90 min at 45.000 x g. The resulting pellet was finally suspended in a volume of 4% SDS depending on the size of the pellet (Achtman *et al.* 1983).

Protein was determined by the Folin reaction, with bovine serum albumin as standard (Lowry *et al.* 1951).

2.4 SDS - Page electrophoresis

SDS PAGE electrophoresis over time was performed according to Laemmli (1970). Aliquots of 100 µl (sample buffer) containing up to 100 µg protein, were boiled with 5% 2-mercaptoethanol for 3 min. If necessary, the samples were stored at -20E C and boiled again before application. Samples containing a mixture standard protein of known molecular weight were prepared as described previously and contained 1 µl of each protein per 10 µl of samples. The electrophoresis was carried out at room temperature using a constant current of 2 mA per gel and stopped when the tracking dye was about 5 mm from the bottom of the gel. At the end of electrophoresis, gels were left for 1-2 h in 12% of cold trichloroacetic acid and then washed with 7% acetic acid twice. Proteins were stained with a solution of 0.25% PAGE blue 83 in 43% methanol 7% acetic acid. Gels were destained in 40% methanol, 7% acetic acid, overnight, under gentle shaking. Molecular weights of the standard proteins (Sigma) are indicated in the figures and refer to the following proteins. Phosphorylase - b (94 kDa), bovine serum albumin (67 kDa), Ovalbumin (43 kDa), Carbon anhydrase (30 kDa). Trypsine inhibitor (26.1 kDa) and a-lactalbumin (14.4 kDa).

Chemicals: All chemicals were purchased from Sigma chemical Co.

Hemagglutination of human group A erythrocytes was measured by the method described by Evans *et al.* (1972). Twenty days after seawater starvation measurement of hemagglutination was reperformed.

Sensitivity to antibiotics was performed over time (0,2,6,9,16 and 21 days of starvation) on Mueller Hinton agar (Difco) by standard Bauer-Kirby method (1966) and by using biodisks obtained from Pasteur Institute. The antibiotics used were Ampicillin, Cephalothin, Gentamicin, Tobramycin, Nalidixic acid, Chloramphenicol, Tetracyclin, Vancomycin, Erythromycin, Penicillin G, Streptomycin.

Reproducibility of results. All tests were performed in duplicate.

3. RESULTS

3.1 Metabolic characters

Using API 20E batteries of tests, we followed the changes of metabolic character of *E. coli* strains during their starvation at different times (0,2,5,9,16,21 days) (Table 2).

Five out of thirteen *E. coli* strains lost the β -galactosidase activity during the first 48 hours of starvation. Another six strains lost this activity between the 2nd and 5th day of starvation while the remaining 2 strains lost it between the 5th and 9th day of starvation.

Nine of the *E. coli* strains lost the ability to decarboxylate lysine between the 9th and 21st day of starvation while four strains showed no change with respect to this ability. Four of *E. coli* strains acquired the ability to degrade gelatin during the first 48 hours while the remaining strains acquired this ability between the 2nd and 9th day of starvation. Seven out of thirteen *E. coli* strains lost the ability to acidify melibiose during the first two days of starvation, two strains lost this ability between the 5th and 9th day and four *E. coli* strains didn't loose this ability even after 3 weeks of starvation.

Only three *E. coli* strains lost the ability to acidify arabinose and rhamnose between the 5th and 21st day of starvation.

3.2 Enzymatic activities

Figure 1 shows the modification of starved *E. coli* strains with time measured on API-ZYM system of some enzymatic activities.

Esterase C4, Esterase lipase and Leucine arylamidase increased to a maximum during the first two days of starvation and then a slight increase was noticed until the 21st day of starvation. Valine arylamidase increased to a maximum during the first 48 hours and then remained unchanged until the 21st day of starvation.

Agglutination of human group A erythrocytes by mannose resistant or sensitive *E. coli* strains disappeared after 21 days of starvation in seawater (Table 3).

3.3 Sensitivity pattern

The sensitivity of *E. coli* strains to Ampicillin, Cephalothin and Nalidixic acid progressively increased until the 6th, 9th and 16th day of starvation respectively and appeared to remain unchanged from then on (Figure 2).

The sensitivity to Gentamicin, Tobramycin, Streptomycin and Chloramphenicol also increased slightly until the 9th day of starvation and then decreased only slightly until the 21st day.

In the case of Tetracycline, Erythromycin, Penicillin and Vancomycin the difference in the diameter of zone of inhibition is minima or zero.

3.4 SDS - Page protein pattern

Twelve strains of *E. coli* isolated from urine and faeces (one of the studied strains was lost) were analyzed by SDS - PAGE before and after starvation in seawater for twenty one days. All strains were sonicated and underwent the procedure revealing the major outer membrane proteins described above.

Proteins of apparent molecular weights between 30000 and 40000 Da are known to be the major outer membrane proteins (M. Achtman *et al.* 1983).

The protein patterns of the *E. coli* strains isolated from urine are presented in figure 3. Strains EU1 and EU33 lost their cytoplasmic proteins, strain EU12 showed decreased synthesis of the cytoplasmic proteins and the major outer membrane proteins were decreased while two new proteins of low molecular weight were synthesized. Strains EU38 suffered complete loss of cytoplasmic and major outer membrane proteins and large amounts of a 29 kDa protein appeared instead.

However four strains of *E. coli* isolated from urine did not show any changes in protein pattern after starvation as is shown in figure 4, despite the fact that their biotype changed also after starvation.

We also examined three strains isolated from faeces from patients with diarrhoea and the protein pattern shown in figure 5 revealed that strains EF5 and EF12 lost their cytoplasmic proteins after starvation but not the major outer membrane proteins.

4. DISCUSSION

Nutritional limitation is a common environmental condition to which bacteria adapt (Harder and Dijkhuizen 1983). The response of *E. coli* cells to starvation conditions is a two-phase process (Kjelleberg *et al.* 1987) first a series of morphological and physiological changes occurs followed by long-term survival alterations characterized by low endogenous metabolism. It has been postulated that the changes during the initial phase prepare the cell for long-term survival and rapid recovery when substrate becomes available (Marden *et al.* 1987).

To survive in seawater, bacteria must respond to a variety of physical and chemical variables which frequently are less than optimal for bacterial growth. A considerable

portion of the bacterial population in the sea must be in an ungrowing, resting stage (Roszak and Colwell 1987). During starvation the different *E. coli* strains of our laboratory collection showed variable patterns of enzymatic activity confirming the idea that most bacteria can use different survival strategies (Boylen and Ensign 1970).

A number of enzyme activities involved in energy metabolism are known to be lost during starvation, probably due to proteolysis (Switzer 1977). Most of the *E. coli* strains studied lost some metabolic characteristics on API 20E system (β -galactosidase, lysine decarboxylase, acidification of melibiose and to a lesser degree acidification of arabinose and rhamnose). These results are in agreement with the results of Munro *et al.* (1987). Enzymatic activities are necessary for the identification of the tested bacterium and any changes make it unidentifiable. Such was the case for our strains which became unidentifiable on the 2nd day of starvation.

In all *E. coli* strains studied, a repression of β -galactosidase activity was noticed although at different times and this can be attributed to a catabolic repression - like mechanism. This activity progressively decreased to an undetectable level between 9th and 16th day of starvation in seawater. Our results are in agreement with those described by Anderson *et al.* (1979).

On the other hand all *E. coli* strains studied progressively acquired the ability to degrade gelatin. The synthesis of gelatinase from starving *E. coli* cells in seawater is probably due to *de novo* synthesis of proteins during the initial reorganization phase of starvation (Nystron *et al.* 1988).

Mandelstam (1958) determined that nongrowing populations of *E. coli* were able to synthesize new enzymes at a rate of approximately equal to protein breakdown indicating that protein synthesis occurs at the expense of utilization of endogenous material.

The synthesis of gelatinase seems to be advantageous for *E. coli* strains because the release of this extracellular protease would allow substrate scavenging over a large area (Poindexter 1981).

Synthesis of gelatinase may be an important factor in the recovery ability of starved bacteria (Geesey and Morita 1987, Albertson *et al.* 1990).

The modification of additional enzymatic activities of *E. coli* strains starving in seawater over time using API ZYM showed the effort of these cells to adapt to the environment. Alkaline phosphatase decreased during the first 2 days of starvation. These results are in disagreement with those of Munro *et al.* (1987) which note an increase of this enzymatic activity.

The increase of Esterase (C4), Esterase lipase, Lipase (C14), Leucine arylamidase and Valine arylamidase as well as the decrease of acid phosphatase, β -galactosidase and phosphoamidase activity are results which fully agree with those of Munro *et al.* (1987).

According to our results, haemagglutination of all mannose-sensitive or resistant *E. coli* strains disappeared after 21 days of starvation in seawater. This is probably due to the deficient production of the fimbriae or their damage. As a result of the above phenomenon, the adhering capacity of *E. coli* strains onto female uroepithelial cells

($p < 0.005$) decreased in the presence of seawater conditions (manuscript in preparation). Therefore the probability of seawater derived urinary tract infections is minimized.

As many investigations claim (Mandelstam 1960, Reeve *et al.* 1984), the rate of protein degradation increases significantly in starving as compared with growing cells, allowing starved bacteria to be better adjusted to nutrient deprivation and fluctuation in substrate levels.

Most starvation - survival experiments suggest that the protein content is reduced with time of starvation as inhibitors of protein synthesis become more effective, and result in greater loss of viability as the period of starvation increases (Kjelleberg *et al.* 1987).

The electrophoretic pattern of the proteins of our strains depicts the status of the strains after 3 weeks of starvation in seawater (long term starvation).

It is obvious that there is a considerable variation in the behaviour of the laboratory strains used in this study. The results enhance the conviction that it is not possible to generalize about the ability of the strains to adapt to starvation conditions (Kjelleberg *et al.* 1987).

Some of the strains lose their cytoplasmic or/and outer membrane proteins. On the other hand others do not show any protein degradation after long-term starvation (21 days).

It is well known that the way *E. coli* responds to starvation conditions is controlled by a special genetic locus (Ramey and Ishiguro 1978).

In one strain, the loss of proteins and the appearance of a novel 30 KDa protein correlate with the results of Jouper-Jaan *et al.* (1986). The observation that this strain was the only one which possessed type I fimbriae is of special interest.

The 30 KDa low molecular size protein could be the PBP7 (Spatt) which is a physiologically significant target for beta lactum antibiotics which lyses non-growing *E. coli* (Tuomanen 1986).

In this study, we followed the sensitivity pattern of *E. coli* strains starving in seawater over time and compared this sensitivity with that of the strains in prestarving conditions designed for the quick growing bacteria according to the general rule that antibiotics kill bacteria at a rate which is strictly proportional to the rate of bacterial growth. Thus, slowly growing bacteria require progressively longer exposures to antibiotics before killing is achieved.

However, as there is no standard method for monitoring the sensitivity of the environmental strains, we used the Bauer Kirby (1966) method for testing the *E. coli* strains starved in seawater over time. That means that the studied bacterial strains from starving conditions are inoculated in a nutritionally complete medium which give the opportunity to the portion of the starved cells that have lost some of the proteins to resynthesize them. The transient phase between the nongrowth and growth status of the heterotrophic bacteria studied is long enough to give the opportunity to antibiotics to be spread for longer time than usual. This explains the larger inhibition zones around the disks.

The absence of any significant difference in the some of inhibition of tetracycline, vancomycin, penicillin and erythromycin may be due to the limitation of the method and the low concentration of the antibiotic on the disk (1xMIC).

This study demonstrated that clinical *E. coli* strains entering starvation in seawater faeces an altered physiological situation leading to different changes of the cells. These changes are referred to modification of enzymatic activities (biotyping changes), alteration of proteins synthesis, loss of some virulence factors i.e. adherence in epithelium cells and changes of their sensitivity pattern.

Further studies which facilitate the understanding of the starvation-survival mechanism of pathogens related to Public Health will show us the way to isolate them from the aquatic environment, as well as explain how infections occurs in this microenvironment.

Additionally, the need for a standardized method used to monitor environmental strains is imperative.

5. SUMMARY

Thirteen *E. coli* strains of different biotype isolated from bench cultures were followed for metabolic and structural changes during starvation in seawater at different time (0,2,6,9,16,21 days of starvation). Additionally sensitivity to antibiotics of the starved *E. coli* cells was performed over time on Mueller-Hinton agar.

β -Galactosidase activity of starved cells disappeared gradually with time. Nine (69.2%) of the *E. coli* strains lost the ability to decarboxylate lysine and seven (53.8%) to acidify melibiose. All *E. coli* strains acquired the ability to degrade gelatine at different time of starvation. Esterase 4, Esterase lipase, Leucine arylamidase and Lipase C14 increase during starvation while Alkaline and Acid phosphatase and Phosphoamidase decrease.

Some of the strains lost their cytoplasmic proteins and in others the synthesis of the major outer membrane proteins was decreased. In one strain a large amount of 30 kDa proteins appeared.

The sensitivity of *E. coli* strains to ampicillin, cephalothin, nalidixic acid, gentamicin, tobramycin, streptomycin and chloramphenicol increase slightly. In the case of tetracyclin, erythromycin, penicillin and vancomycin the difference in the diameter of zone of inhibition is minimum or zero. The traditionally used Bauer Kirby method has been proven to be inadequate for testing sensitivity of environmental strains. The understanding of the starvation-survival mechanism of pathogens related to Public Health is discussed.

Table 1

Escherichia Coli strains studied

Isolates code number	Source of isolation	Biotype	Serotype
EU1	urine	5144552	-
EU4	"	5044572	01
EU15	"	5044472	022
EU12	"	5044552	04
EU16	"	5144572	-
EU28	"	5144511	R*
EU30	"	5140542	R
EU31	"	1044552	-**
EU33	"	5044552	-
EU38	"	5544572	-
EF5	faeces	5544112	02
EF6	"	5044552	R
EF12	"	5144172	014

* Rough

**(-) Not identifiable

Table 2

Changes with time of metabolic characters of *E. coli* strains starved
in seawater measured on API 20 E system

Metabolic characters^á

Strain's code number	ONPG	LDC	GEL	MEL	ARA	RHA
	Days of starvation					
	0 2 5 9 16 21	0 2 5 9 16 21	0 2 5 9 16 21	0 2 5 9 16 21	0 2 5 9 16 21	0 2 5 9 16 21
EU1	+ + - - - -	+ + + + + -	- - + + + +	+ - - - - -	+ + + + + +	+ + + + + -
EU4	+ - - - - -	+ + + + - -	- - - + + +	+ - - - - -	+ + + + + -	+ + + + + -
EU15	+ + - - - -	+ + + - - -	- - + + + +	+ - - - - -	+ + + - - -	+ - - - - -
EU12	+ + - - - -	+ + + + + +	- - + + + +	+ - - - - -	+ + + + + +	+ + + + + +
EU16	+ + + - - -	+ + + + - -	- - - + + +	+ - - - - -	+ + + - - -	+ + - - - -
EU28	+ + - - - -	+ + + + + -	- - + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +
EU30	+ - - - - -	+ + + + + +	- + + + + +	+ - - - - -	+ + + + + +	+ + + + + +
EU31	+ + - - - -	- - - - - -	- - - + + +	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +
EU33	+ + + - - -	+ + + + + +	- + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +
EU38	+ - - - - -	+ + + + + -	- + + + + +	+ - - - - -	+ + + + + +	+ + + + + +
EF5	+ - - - - -	+ + + - - -	- - + + + +	+ + + - - -	+ + + + + +	+ + + + + +
EF6	+ - - - - -	+ + + + - -	- + + + + +	+ + + - - -	+ + + + + +	+ + + + + -
EF12	+ + - - - -	+ + + + + +	- - + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +	+ + + + + +

^á **ONPG:** beta-galactosidase
LDC: argentine dehydrolase
GEL: gelatinase

MEL: melibiose
ARA: arabinose } acidifications
PRA: rhamnose

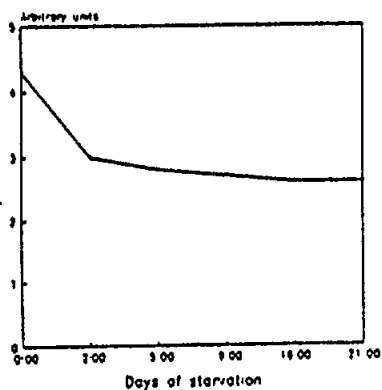
Table 3

Agglutination of human group A erythrocytes by *E. coli* strains

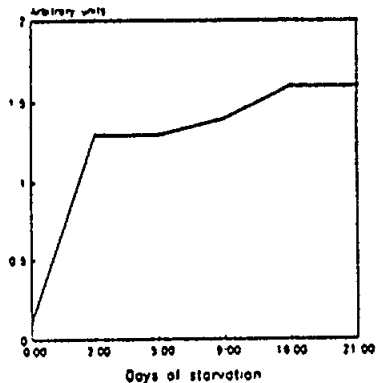
<i>E. coli</i> strains Code number	Time of starvation in seawater/days	
	0	21
EU1	0	-
EU4	-	-
EU15	-	-
EU12	-	-
EU16	-	-
EU28	R+*	-
EU29	R+*	-
EU31	R+*	-
EU33	S+**	-
EU38	-	-
EF5	-	-
EF6	-	-
EF12	R+*	-

* mannose resistant
** mannose sensitive

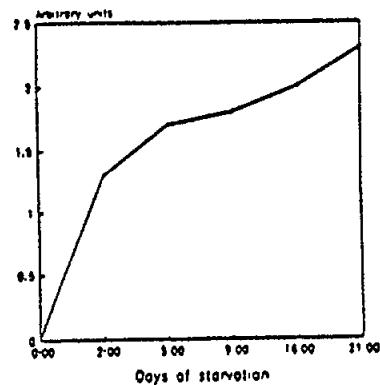
Alkaline phosphatase



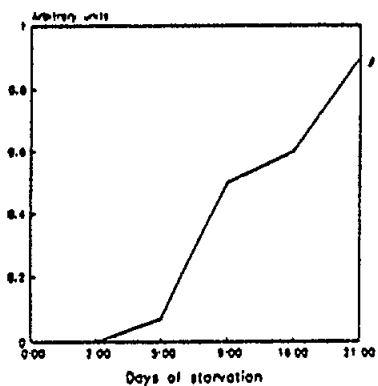
Esterase (C4)



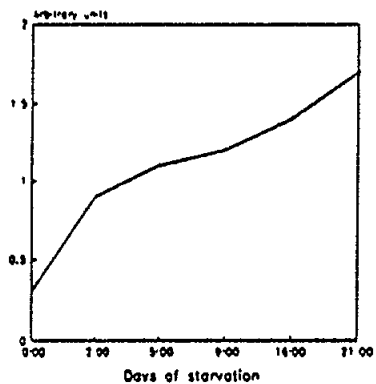
Esterase lipase



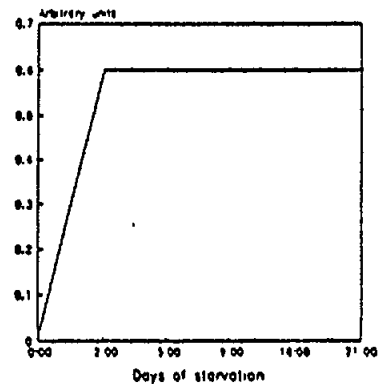
Lipase (C14)



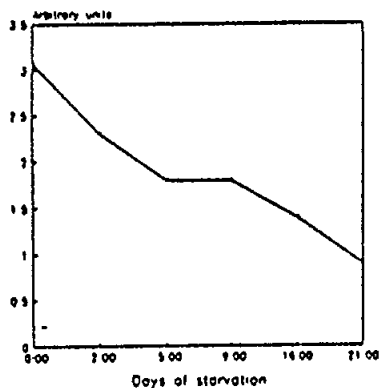
Leucine arylamidase



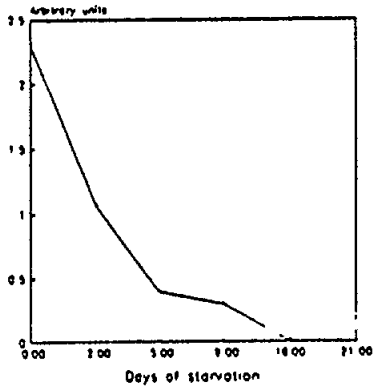
Valine arylamidase



Phosphatase acid



β -galactosidase



Phosphomidase

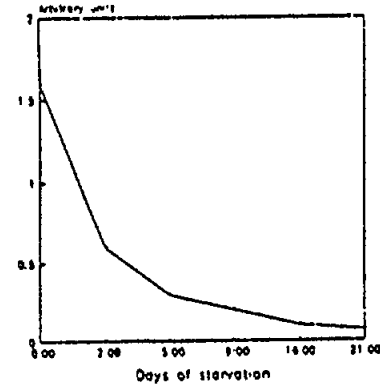


Figure 1. Modification with time of some enzymatic activities of starved *E. coli* strains measured on API ZYM system

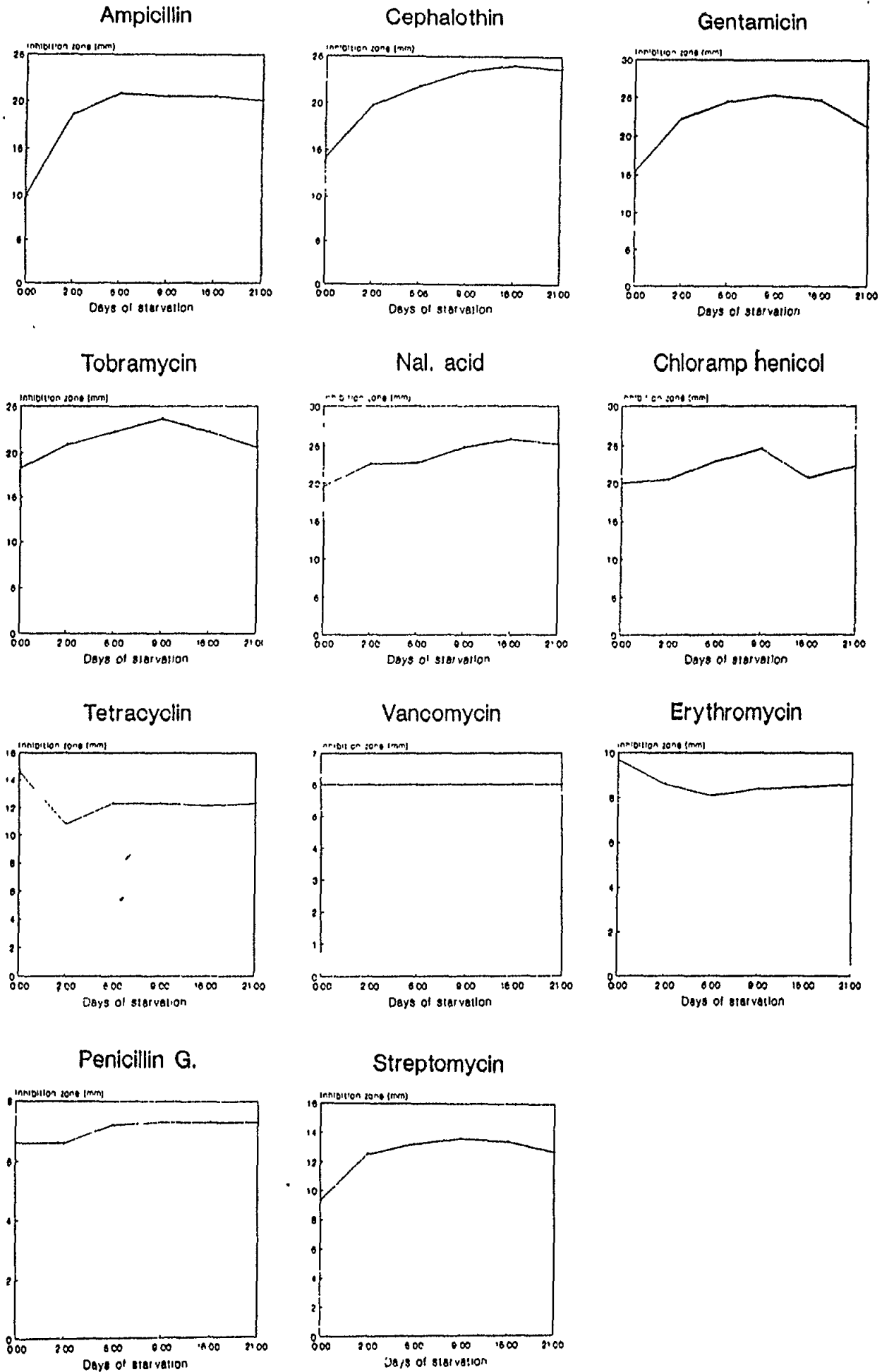


Figure 2. Sensitivity of *E. coli* strains starved in seawater at different days (0, 2, 5, 9, 16, 21)

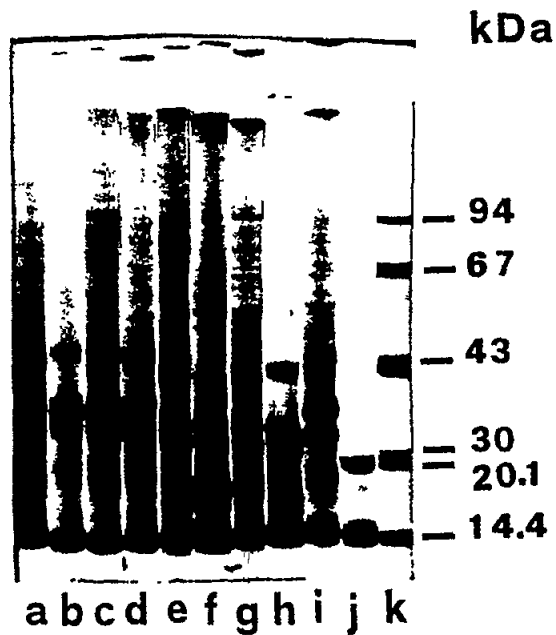


Figure 3. SDS-PAGE pattern of *E. coli* strains isolated from urine before and after starvation

Lanes: a. strain EU1 before starvation, b. strain EU1 after starvation, c. strain EU12 before starvation, d. strain EU12 after starvation, e. strain EU16 before starvation, f. strain EU16 after starvation, g. strain EU33 before starvation, h. strain EU33 after starvation, i. strain EU38 before starvation, j. strain EU38 after starvation.

Lanes K contain the following MW standards: Phosphorylase b 94.000, albumin 67.000, ovalbumin 43.000, carbonic anhydrase 30.000, trypsin inhibitor 20.100, α -lactalbumine 14.400.

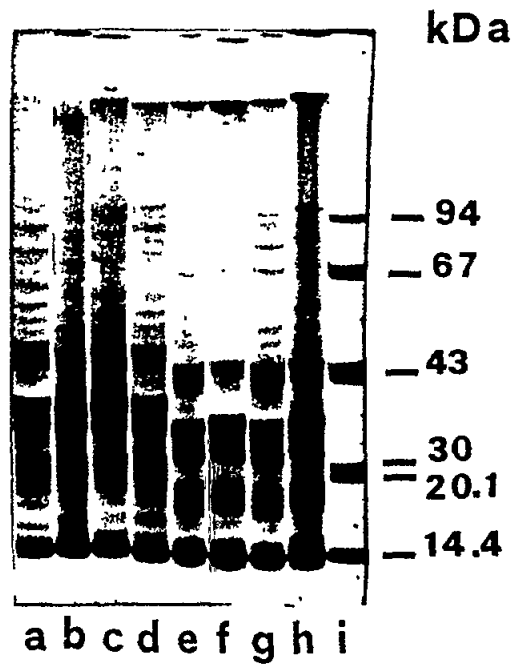


Figure 4. SDS-PAGE pattern of *E. coli* strains isolated from urine before and after starvation without changes of proteins pattern

Lanes: **a.** strain EU4 before starvation, **b.** strain EU4 after starvation, **c.** strain EU15 before starvation, **d.** strain EU15 after starvation, **e.** strain EU28 before starvation, **f.** strain EU28 after starvation, **g.** strain EU31 before starvation, **h.** strain EU31 after starvation, **i.** MW standards (designation are the same as in figure 3).

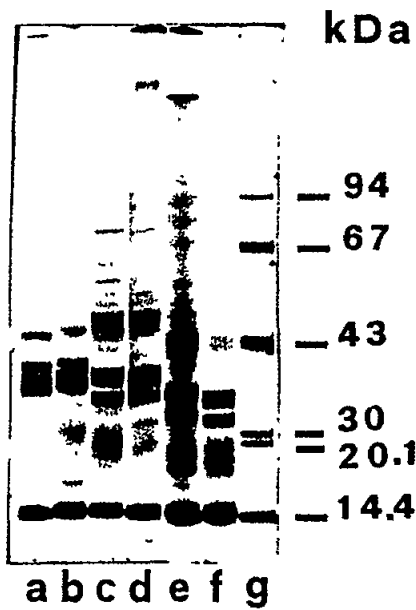


Figure 5. SDS-PAGE pattern of *E. coli* strains isolated from stool

Lanes: **a.** strain EF5 before starvation, **b.** strain EF5 after starvation, **c.** strain EF6 before starvation, **d.** strain EF6 after starvation, **e.** strain EF12 before starvation, **f.** strain EF12 after starvation, **g.** MW standards (designation are the same as in figure 3).

6. REFERENCES

- Achtman, M., A. Mercer, B. Kusecek, A. Pohl, M. Heuzenroeder, W. Aaronson, A. Sutton, R.P. Silver (1983). Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infection and immunity*. **39**: 315-335.
- Albertson, N.H., T. Nystrom & S. Kjelleberg (1990). Exoprotease activity of two marine bacteria during starvation. *Applied and Environmental Microbiology*. **56**: 218-223.
- Anderson, I.C., M. Rhodes & H. Kator (1979). Sublethal stress in *Escherichia coli*: a function of salinity. *Applied and Environmental Microbiology*. **38**: 1147-1152.
- APHA (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. American Public Health Association, Washington D.C. 16th ed. pp **9**: 41-45.
- Boylen, C.W. & J.C. Ensign (1970). Intracellular substrates for endogenous metabolism during long-term starvation of rod and spherical stage cells of *Arthrobacter crystallopoietes*. *Journal of Bacteriology*. **103**: 578-587.
- Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turk (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. **45**: 493-496.
- Evans, D.G., D.J. Evans & W. Tjoa (1972). Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxinogenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhoea: correlation with colonization factor. *Infection and Immunity* **18**: 330-337.
- Geesey, G.G. & R.Y. Morita (1979). Capture of arginine at low concentrations by a marine psychrophilic bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. **38**: 1092-1097.
- Harder, W. & Z.Dijkhuizen (1983). Physiological responses to nutrient limitation. *Annual Review of Microbiology*. **37**: 1-23.
- Hunt, D.A. (1977). *Indicators of quality for shellfish waters*. American society for testing Materials, Specific Technical Bulletin, **635**: 337-345.
- Jouper-Jaan, A., B. Dahlof, & S. Kjelleberg (1986). Changes in the protein composition of three bacterial isolates from marine waters during short term energy and nutrient deprivation. *Applied and Environmental Microbiology*. **42**: 1419-1421.
- Kjelleberg, S. M. Hermansson, P. Marden & G.W. Jones (1987). The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annual Review of Microbiology*. **41**: 25-49.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr & R.J. Randall (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**: 265-275.
- Macdonell, M.T., F.L. Singleton & M.A. Hood, (1982). Diluent composition for use of API in characterizing marine and estuarine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **44**: 423-427.
- Mandelstam, J. (1958). The intracellular turnover of protein and nucleic acids and its role in biochemical differentiation. *Bacteriological Reviews*. **24**: 289-308.
- Mandelstam, J. (1960). Turnover of protein in growing and nongrowing populations of *Escherichia coli*. *The Biochemical Journal*. **69**: 110-119.
- Marden, P.T., T. Nystrom, S. Kjelleberg (1987). Uptake of leucine by marine gram-negative heterotrophic bacterium during exposure to starvation conditions. *FEMS Microbial Ecology*. **45**: 233-241.
- Munro, P.M., M.J. Gauthier, & F.M. Laumond (1987). Changes in *Escherichia coli* cells starved in seawater or grown in seawater - wastewater mixtures. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**: 1476-1481.
- Nystrom, T.M., N. Albertson, S. Kjelleberg (1988). Synthesis of membrane and periplasmic proteins during starvation of a marine *Vibrio* sp. *Journal of General Microbiology*. **134**: 1654-1651.
- Poindexter, J.S. (1981). Oligotrophy: fast and famine existence. *Advances in Microbial Ecology*. **5**: 63-89.
- Ramey, W.D., E.E. Ishiguro (1978). Site of inhibition of peptidoglycan biosynthesis during the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **135**: 71-77.
- Reeve, C.A., A.T. Bockman and A. Matin (1984). Role of protein degradation in the survival of carbon-starved *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. **157**: 758-763.
- Rhodes, M.W. & H. Kator, (1988). Survival of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp in Estuarine Environments. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**: 2902-2907.
- Roszak, D. & R.R. Colwell (1987). Survival strategies of Bacteria in the natural environment. *Microbiological Reviews*. **51**: 365-379.
- Spratt, B.G. (1977). Properties of penicillin - binding proteins of *Escherichia coli* K12. *European Journal of Biochemistry*. **72**: 341-352.

Switzer, R.L. (1977). The inactivation of microbial enzymes in vivo. *Annual Review of Microbiology*. **31**: 135-157.

Tuomanen, E. & J. Schwartz (1987). Penicillin - Binding Protein 7 and its relationship to lysis of nongrowing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. **169**: 4912-4915.

PUBLICATIONS OF THE MAP TECHNICAL REPORTS SERIES

1. UNEP/IOC/WMO: Baseline studies and monitoring of oil and petroleum hydrocarbons in marine waters (MED POL I). MAP Technical Reports Series No. 1. UNEP, Athens, 1986 (96 pages) (parts in English, French or Spanish only).
2. UNEP/FAO: Baseline studies and monitoring of metals, particularly mercury and cadmium, in marine organisms (MED POL II). MAP Technical Reports Series No. 2. UNEP, Athens, 1986 (220 pages) (parts in English, French or Spanish only).
3. UNEP/FAO: Baseline studies and monitoring of DDT, PCBs and other chlorinated hydrocarbons in marine organisms (MED POL III). MAP Technical Reports Series No. 3. UNEP, Athens, 1986 (128 pages) (parts in English, French or Spanish only).
4. UNEP/FAO: Research on the effects of pollutants on marine organisms and their populations (MED POL IV). MAP Technical Reports Series No. 4. UNEP, Athens, 1986 (118 pages) (parts in English, French or Spanish only).
5. UNEP/FAO: Research on the effects of pollutants on marine communities and ecosystems (MED POL V). MAP Technical Reports Series No. 5. UNEP, Athens, 1986 (146 pages) (parts in English or French only).
6. UNEP/IOC: Problems of coastal transport of pollutants (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens, 1986 (100 pages) (English only).
7. UNEP/WHO: Coastal water quality control (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens, 1986 (426 pages) (parts in English or French only).
8. UNEP/IAEA/IOC: Biogeochemical studies of selected pollutants in the open waters of the Mediterranean (MED POL VIII). MAP Technical Reports Series No. 8. UNEP, Athens, 1986 (42 pages) (parts in English or French only).
8. Add. UNEP: Biogeochemical studies of selected pollutants in the open waters of the Mediterranean (MED POL VIII). Addendum, Greek Oceanographic Cruise 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens, 1986 (66 pages) (English only).
9. UNEP: Co-ordinated Mediterranean pollution monitoring and research programme (MED POL - PHASE I). Final report, 1975-1980. MAP Technical Reports Series No. 9. UNEP, Athens, 1986 (276 pages) (English only).
10. UNEP: Research on the toxicity, persistence, bioaccumulation, carcinogenicity and mutagenicity of selected substances (Activity G). Final reports on projects dealing with toxicity (1983-85). MAP Technical Reports Series No. 10. UNEP, Athens, 1987 (118 pages) (English only).
11. UNEP: Rehabilitation and reconstruction of Mediterranean historic settlements. Documents produced in the first stage of the Priority Action (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 11. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1986 (158 pages) (parts in English or French only).
12. UNEP: Water resources development of small Mediterranean islands and isolated coastal areas. Documents produced in the first stage of the Priority Action (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 12. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parts in English or French only).

13. UNEP: Specific topics related to water resources development of large Mediterranean islands. Documents produced in the second phase of the Priority Action (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 13. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parts in English or French only).
14. UNEP: Experience of Mediterranean historic towns in the integrated process of rehabilitation of urban and architectural heritage. Documents produced in the second phase of the Priority Action (1986). MAP Technical Reports Series No. 14. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (500 pages) (parts in English or French only).
15. UNEP: Environmental aspects of aquaculture development in the Mediterranean region. Documents produced in the period 1985-1987. MAP Technical Reports Series No. 15. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (101 pages) (English only).
16. UNEP: Promotion of soil protection as an essential component of environmental protection in Mediterranean coastal zones. Selected documents (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 16. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (424 pages) (parts in English or French only).
17. UNEP: Seismic risk reduction in the Mediterranean region. Selected studies and documents (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 17. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (247 pages) (parts in English or French only).
18. UNEP/FAO/WHO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by mercury and mercury compounds. MAP Technical Reports Series No. 18. UNEP, Athens, 1987 (354 pages) (English and French).
19. UNEP/IOC: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by petroleum hydrocarbons. MAP Technical Reports Series No. 19. UNEP, Athens, 1988 (130 pages) (English and French).
20. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and health effects (1983-86). MAP Technical Reports Series No. 20. UNEP, Athens, 1988 (156 pages) (English only).
21. UNEP/UNESCO/FAO: Eutrophication in the Mediterranean Sea: Receiving capacity and monitoring of long-term effects. MAP Technical Reports Series No. 21. UNEP, Athens, 1988 (200 pages) (parts in English or French only).
22. UNEP/FAO: Study of ecosystem modifications in areas influenced by pollutants (Activity I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988 (146 pages) (parts in English or French only).
23. UNEP: National monitoring programme of Yugoslavia, Report for 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988 (223 pages) (English only).
24. UNEP/FAO: Toxicity, persistence and bioaccumulation of selected substances to marine organisms (Activity G). MAP Technical Reports Series No. 24. UNEP, Athens, 1988 (122 pages) (parts in English or French only).

25. UNEP: The Mediterranean Action Plan in a functional perspective: A quest for law and policy. MAP Technical Reports Series No. 25. UNEP, Athens, 1988 (105 pages) (English only).
26. UNEP/IUCN: Directory of marine and coastal protected areas in the Mediterranean Region. Part I - Sites of biological and ecological value. MAP Technical Reports Series No. 26. UNEP, Athens, 1989 (196 pages) (English only).
27. UNEP: Implications of expected climate changes in the Mediterranean Region: An overview. MAP Technical Reports Series No. 27. UNEP, Athens, 1989 (52 pages) (English only).
28. UNEP: State of the Mediterranean marine environment. MAP Technical Reports Series No. 28. UNEP, Athens, 1989 (225 pages) (English only).
29. UNEP: Bibliography on effects of climatic change and related topics. MAP Technical Reports Series No. 29. UNEP, Athens, 1989 (143 pages) (English only).
30. UNEP: Meteorological and climatological data from surface and upper measurements for the assessment of atmospheric transport and deposition of pollutants in the Mediterranean Basin: A review. MAP Technical Reports Series No. 30. UNEP, Athens, 1989 (137 pages) (English only).
31. UNEP/WMO: Airborne pollution of the Mediterranean Sea. Report and proceedings of a WMO/UNEP Workshop. MAP Technical Reports Series No. 31. UNEP, Athens, 1989 (247 pages) (parts in English or French only).
32. UNEP/FAO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K). MAP Technical Reports Series No. 32. UNEP, Athens, 1989 (139 pages) (parts in English or French only).
33. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of organotin compounds as marine pollutants in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 33. UNEP, Athens, 1989 (185 pages) (English and French).
34. UNEP/FAO/WHO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by cadmium and cadmium compounds. MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989 (175 pages) (English and French).
35. UNEP: Bibliography on marine pollution by organotin compounds. MAP Technical Reports Series No. 35. UNEP, Athens, 1989 (92 pages) (English only).
36. UNEP/IUCN: Directory of marine and coastal protected areas in the Mediterranean region. Part I - Sites of biological and ecological value. MAP Technical Reports Series No. 36. UNEP, Athens, 1990 (198 pages) (French only).
37. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with eutrophication and plankton blooms (Activity H). MAP Technical Reports Series No. 37. UNEP, Athens, 1990 (74 pages) (parts in English or French only).
38. UNEP: Common measures adopted by the Contracting Parties to the Convention for the Protection of the Mediterranean Sea against pollution. MAP Technical Reports Series No. 38. UNEP, Athens, 1990 (100 pages) (English, French, Spanish and Arabic).
39. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by organohalogen compounds. MAP Technical Reports Series No. 39. UNEP, Athens, 1990 (224 pages) (English and French).

40. UNEP/FAO: Final reports on research projects (Activities H,I and J). MAP Technical Reports Series No. 40. UNEP, Athens, 1990 (125 pages) (English and French).
41. UNEP: Wastewater reuse for irrigation in the Mediterranean region. MAP Technical Reports Series No. 41. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1990 (330 pages) (English and French).
42. UNEP/IUCN: Report on the status of Mediterranean marine turtles. MAP Technical Reports Series No. 42. UNEP, Athens, 1990 (204 pages) (English and French).
43. UNEP/IUCN/GIS Posidonia: Red Book "Gérard Vuignier", marine plants, populations and landscapes threatened in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 43. UNEP, Athens, 1990 (250 pages) (French only).
44. UNEP: Bibliography on aquatic pollution by organophosphorus compounds. MAP Technical Reports Series No. 44. UNEP, Athens, 1990 (98 pages) (English only).
45. UNEP/IAEA: Transport of pollutants by sedimentation: Collected papers from the first Mediterranean Workshop (Villefranche-sur-Mer, France, 10-12 December 1987). MAP Technical Reports Series No. 45. UNEP, Athens, 1990 (302 pages) (English only).
46. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on project on relationship between microbial quality of coastal seawater and rotavirus-induced gastroenteritis among bathers (1986-88). MAP Technical Reports Series No.46, UNEP, Athens, 1991 (64 pages) (English only).
47. UNEP: Jellyfish blooms in the Mediterranean. Proceedings of the II workshop on jellyfish in the Mediterranean Sea. MAP Technical Reports Series No.47. UNEP, Athens, 1991 (320 pages) (parts in English or French only).
48. UNEP/FAO: Final reports on research projects (Activity G). MAP Technical Reports Series No. 48. UNEP, Athens, 1991 (126 pages) (parts in English or French only).
49. UNEP/WHO: Biogeochemical cycles of specific pollutants. Survival of pathogens. Final reports on research projects (Activity K). MAP Technical Reports Series No. 49. UNEP, Athens, 1991 (71 pages) (parts in English or French only).
50. UNEP: Bibliography on marine litter. MAP Technical Reports Series No. 50. UNEP, Athens, 1991 (62 pages) (English only).
51. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with mercury, toxicity and analytical techniques. MAP Technical Reports Series No. 51. UNEP, Athens, 1991 (166 pages) (parts in English or French only).
52. UNEP/FAO: Final reports on research projects dealing with bioaccumulation and toxicity of chemical pollutants. MAP Technical Reports Series No. 52. UNEP, Athens, 1991 (86 pages) (parts in English or French only).
53. UNEP/WHO: Epidemiological studies related to environmental quality criteria for bathing waters, shellfish-growing waters and edible marine organisms (Activity D). Final report on epidemiological study on bathers from selected beaches in Malaga, Spain (1988-1989). MAP Technical Reports Series No. 53. UNEP, Athens, 1991 (127 pages) (English only).

54. UNEP/WHO: Development and testing of sampling and analytical techniques for monitoring of marine pollutants (Activity A): Final reports on selected microbiological projects. MAP Technical Reports Series No. 54. UNEP, Athens, 1991 (83 pages) (English only).
55. UNEP/WHO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K): Final report on project on survival of pathogenic organisms in seawater. MAP Technical Reports Series No. 55. UNEP, Athens, 1991 (95 pages) (English only).
56. UNEP/IOC/FAO: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by persistent synthetic materials which may float, sink or remain in suspension. MAP Technical Reports Series No. 56. UNEP, Athens, 1991 (113 pages) (English and French).
57. UNEP/WHO: Research on the toxicity, persistence, bioaccumulation, carcinogenicity and mutagenicity of selected substances (Activity G): Final reports on projects dealing with carcinogenicity and mutagenicity. MAP Technical Reports Series No. 57. UNEP, Athens, 1991 (59 pages) (English only).
58. UNEP/FAO/WHO/IAEA: Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by organophosphorus compounds. MAP Technical Reports Series No. 58. UNEP, Athens, 1991 (122 pages) (English and French).
59. UNEP/FAO/IAEA: Proceedings of the FAO/UNEP/IAEA Consultation Meeting on the Accumulation and Transformation of Chemical contaminants by Biotic and Abiotic Processes in the Marine Environment (La Spezia, Italy, 24-28 September 1990), edited by G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 59. UNEP, Athens, 1991 (392 pages) (English only).
60. UNEP/WHO: Development and testing of sampling and analytical techniques for monitoring of marine pollutants (Activity A): Final reports on selected microbiological projects (1987-1990). MAP Technical Reports Series No. 60. UNEP, Athens, 1991 (76 pages) (parts in English or French only).
61. UNEP: Integrated Planning and Management of the Mediterranean Coastal Zones. Documents produced in the first and second stage of the Priority Action (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 61. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1991 (437 pages) (parts in English or French only).
62. UNEP/IAEA: Assessment of the State of Pollution of the Mediterranean Sea by Radioactive Substances. MAP Technical Reports Series No. 62, UNEP, Athens, 1992 (133 pages) (English and French).
63. UNEP/WHO: Biogeochemical cycles of specific pollutants (Activity K) - Survival of Pathogens - Final reports on Research Projects (1989-1991). MAP Technical Reports Series No. 63, UNEP, Athens, 1992 (86 pages) (French only).
64. UNEP/WMO: Airborne Pollution of the Mediterranean Sea. Report and Proceedings of the Second WMO/UNEP Workshop. MAP Technical Reports Series No. 64, UNEP, Athens, 1992 (246 pages) (English only).
65. UNEP: Directory of Mediterranean Marine Environmental Centres. MAP Technical Reports Series No. 65, UNEP, Athens, 1992 (351 pages) (English and French).
66. UNEP/CRU: Regional Changes in Climate in the Mediterranean Basin Due to Global Greenhouse Gas Warming. MAP Technical Reports Series No. 66, UNEP, Athens, 1992 (172 pages) (English only).

67. UNEP/IOC: Applicability of Remote Sensing for Survey of Water Quality Parameters in the Mediterranean. Final Report of the Research Project. MAP Technical Reports Series No. 67, UNEP, Athens, 1992 (142 pages) (English only).
68. UNEP/FAO/IOC: Evaluation of the Training Workshops on the Statistical Treatment and Interpretation of Marine Community Data. MAP Technical Reports Series No. 68. UNEP, Athens, 1992 (221 pages) (English only).
69. UNEP/FAO/IOC: Proceedings of the FAO/UNEP/IOC Workshop on the Biological Effects of Pollutants on Marine Organisms (Malta, 10-14 September 1991), edited by G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 69. UNEP, Athens, 1992 (287 pages) (English only).
70. UNEP/IAEA/IOC/FAO: Organohalogen Compounds in the Marine Environment: A Review. MAP Technical Reports Series No. 70. UNEP, Athens, 1992 (49 pages) (English only).
71. UNEP/FAO/IOC: Selected techniques for monitoring biological effects of pollutants in marine organisms. MAP Technical Reports Series No. 71. UNEP, Athens, 1993 (189 pages) (English only).
72. UNEP: Costs and Benefits of Measures for the Reduction of Degradation of the Environment from Land-based Sources of Pollution in Coastal Areas. A - Case Study of the Bay of Izmir. B - Case Study of the Island of Rhodes. MAP Technical Reports Series No. 72. UNEP, Athens, 1993 (64 pages) (English only).
73. UNEP/FAO: Final Reports on Research Projects Dealing with the Effects of Pollutants on Marine Communities and Organisms. MAP Technical Reports Series No. 73. UNEP, Athens, 1993 (186 pages) (English and French).
74. UNEP/FIS: Report of the Training Workshop on Aspects of Marine Documentation in the Mediterranean. MAP Technical Reports Series No. 74. UNEP, Athens, 1993 (38 pages) (English only).
75. UNEP/WHO: Development and Testing of Sampling and Analytical Techniques for Monitoring of Marine Pollutants (Activity A). MAP Technical Reports Series No. 75. UNEP, Athens, 1993 (90 pages) (English only).

PUBLICATIONS "MAP TECHNICAL REPORTS SERIES"

1. PNUE/COI/OMM: Etudes de base et surveillance continue du pétrole et des hydrocarbures contenus dans les eaux de la mer (MED POL I). MAP Technical Reports Series No. 1. UNEP, Athens, 1986 (96 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
2. PNUE/FAO: Etudes de base et surveillance continue des métaux, notamment du mercure et du cadmium, dans les organismes marins (MED POL II). MAP Technical Reports Series No. 2. UNEP, Athens, 1986 (220 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
3. PNUE/FAO: Etudes de base et surveillance continue du DDT, des PCB et des autres hydrocarbures chlorés contenus dans les organismes marins (MED POL III). MAP Technical Reports Series No. 3. UNEP, Athens, 1986 (128 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
4. PNUE/FAO: Recherche sur les effets des polluants sur les organismes marins et leurs peuplements (MED POL IV). MAP Technical Reports Series No. 4. UNEP, Athens, 1986 (118 pages) (parties en anglais, français ou espagnol seulement).
5. PNUE/FAO: Recherche sur les effets des polluants sur les communautés et écosystèmes marins (MED POL V). MAP Technical Reports Series No. 5. UNEP, Athens, 1986 (146 pages) (parties en anglais ou français seulement).
6. PNUE/COI: Problèmes du transfert des polluants le long des côtes (MED POL VI). MAP Technical Reports Series No. 6. UNEP, Athens, 1986 (100 pages) (anglais seulement).
7. PNUE/OMS: Contrôle de la qualité des eaux côtières (MED POL VII). MAP Technical Reports Series No. 7. UNEP, Athens, 1986 (426 pages) (parties en anglais ou français seulement).
8. PNUE/AIEA/COI: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED POL VIII). MAP Technical Reports Series No. 8. UNEP, Athens, 1986 (42 pages) (parties en anglais ou français seulement).
8. PNUE: Etudes biogéochimiques de certains polluants au large de la Méditerranée (MED Add. POL VIII). Addendum, Croisière Océanographique de la Grèce 1980. MAP Technical Reports Series No. 8, Addendum. UNEP, Athens, 1986 (66 pages) (anglais seulement).
9. PNUE: Programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution dans la Méditerranée (MED POL -PHASE I). Rapport final, 1975-1980. MAP Technical Reports Series No. 9. UNEP, Athens, 1986 (276 pages) (anglais seulement).
10. PNUE: Recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la cancérogénicité et la mutagénicité de certaines substances (Activité G). Rapports finaux sur les projets ayant trait à la toxicité (1983-85). MAP Technical Reports Series No. 10. UNEP, Athens, 1987 (118 pages) (anglais seulement).
11. PNUE: Réhabilitation et reconstruction des établissements historiques méditerranéens. Textes rédigés au cours de la première phase de l'action prioritaire (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 11. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1986 (158 pages) (parties en anglais ou français seulement).
12. PNUE: Développement des ressources en eau des petites îles et des zones côtières isolées méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la première phase de l'action prioritaire (1984-1985). MAP Technical Reports Series No. 12. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parties en anglais ou français seulement).

13. PNUE: Thèmes spécifiques concernant le développement des ressources en eau des grandes îles méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la deuxième phase de l'action prioritaire (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 13. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (162 pages) (parties en anglais ou français seulement).
14. PNUE: L'expérience des villes historiques de la Méditerranée dans le processus intégré de réhabilitation du patrimoine urbain et architectural. Documents établis lors de la seconde phase de l'Action prioritaire (1986). MAP Technical Reports Series No. 14. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (500 pages) (parties en anglais ou français seulement).
15. PNUE: Aspects environnementaux du développement de l'aquaculture dans la région méditerranéenne. Documents établis pendant la période 1985-1987. MAP Technical Reports Series No. 15. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (101 pages) (anglais seulement).
16. PNUE: Promotion de la protection des sols comme élément essentiel de la protection de l'environnement dans les zones côtières méditerranéennes. Documents sélectionnés (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 16. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (424 pages) (parties en anglais ou français seulement).
17. PNUE: Réduction des risques sismiques dans la région méditerranéenne. Documents et études sélectionnés (1985-1987). MAP Technical Reports Series No. 17. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1987 (247 pages) (parties en anglais ou français seulement).
18. PNUE/FAO/OMS: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le mercure et les composés mercuriels. MAP Technical Reports Series No. 18. UNEP, Athens, 1987 (354 pages) (anglais et français).
19. PNUE/COI: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les hydrocarbures de pétrole. MAP Technical Reports Series No. 19. UNEP, Athens, 1988 (130 pages) (anglais et français).
20. PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur le projet sur la relation entre la qualité microbienne des eaux marines côtières et les effets sur la santé (1983-86). MAP Technical Reports Series No. 20. UNEP, Athens, 1988 (156 pages) (anglais seulement).
21. PNUE/UNESCO/FAO: Eutrophisation dans la mer Méditerranée: capacité réceptrice et surveillance continue des effets à long terme. MAP Technical Reports Series No. 21. UNEP, Athens, 1988 (200 pages) (parties en anglais ou français seulement).
22. PNUE/FAO: Etude des modifications de l'écosystème dans les zones soumises à l'influence des polluants (Activité I). MAP Technical Reports Series No. 22. UNEP, Athens, 1988 (146 pages) (parties en anglais ou français seulement).
23. PNUE: Programme national de surveillance continue pour la Yougoslavie, Rapport pour 1983-1986. MAP Technical Reports Series No. 23. UNEP, Athens, 1988 (223 pages) (anglais seulement).

24. PNUE/FAO: Toxicité, persistance et bioaccumulation de certaines substances vis-à-vis des organismes marins (Activité G). MAP Technical Reports Series No. 24. UNEP, Athens, 1988 (122 pages) (parties en anglais ou français seulement).
25. PNUE: Le Plan d'action pour la Méditerranée, perspective fonctionnelle; une recherche juridique et politique. MAP Technical Reports Series No. 25. UNEP, Athens, 1988 (105 pages) (anglais seulement).
26. PNUE/UICN: Répertoire des aires marines et côtières protégées de la Méditerranée. Première partie - Sites d'importance biologique et écologique. MAP Technical Reports Series No. 26. UNEP, Athens, 1989 (196 pages) (anglais seulement).
27. PNUE: Implications des modifications climatiques prévues dans la région méditerranéenne: une vue d'ensemble. MAP Technical Reports Series No. 27. UNEP, Athens, 1989 (52 pages) (anglais seulement).
28. PNUE: Etat du milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 28. UNEP, Athens, 1989 (225 pages) (anglais seulement).
29. PNUE: Bibliographie sur les effets des modifications climatiques et sujets connexes. MAP Technical Reports Series No. 29. UNEP, Athens, 1989 (143 pages) (anglais seulement).
30. PNUE: Données météorologiques et climatologiques provenant de mesures effectuées dans l'air en surface et en altitude en vue de l'évaluation du transfert et du dépôt atmosphériques des polluants dans le bassin méditerranéen: un compte rendu. MAP Technical Reports Series No. 30. UNEP, Athens, 1989 (137 pages) (anglais seulement).
31. PNUE/OMM: Pollution par voie atmosphérique de la mer Méditerranée. Rapport et actes des Journées d'étude OMM/PNUE. MAP Technical Reports Series No. 31. UNEP, Athens, 1989 (247 pages) (parties en anglais ou français seulement).
32. PNUE/FAO: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K). MAP Technical Reports Series No. 32. UNEP, Athens, 1989 (139 pages) (parties en anglais ou français seulement).
33. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation des composés organostanniques en tant que polluants du milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 33. UNEP, Athens, 1989 (185 pages) (anglais et français).
34. PNUE/FAO/OMS: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par le cadmium et les composés de cadmium. MAP Technical Reports Series No. 34. UNEP, Athens, 1989 (175 pages) (anglais et français).
35. PNUE: Bibliographie sur la pollution marine par les composés organostanniques. MAP Technical Reports Series No. 35. UNEP, Athens, 1989 (92 pages) (anglais seulement).
36. PNUE/UICN: Répertoire des aires marines et côtières protégées de la Méditerranée. Première partie - Sites d'importance biologique et écologique. MAP Technical Reports Series No. 36. UNEP, Athens, 1990 (198 pages) (français seulement).
37. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche consacrés à l'eutrophisation et aux efflorescences de plancton (Activité H). MAP Technical Reports Series No. 37. UNEP, Athens, 1990 (74 pages) (parties en anglais ou français seulement).

38. PNUE: Mesures communes adoptées par les Parties Contractantes à la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution. MAP Technical Reports Series No. 38. UNEP, Athens, 1990 (100 pages) (anglais, français, espagnol et arabe).
39. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution par les composés organohalogénés. MAP Technical Reports Series No. 39. UNEP, Athens, 1990 (224 pages) (anglais et français).
40. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche (Activités H, I et J). MAP Technical Reports Series No. 40. UNEP, Athens, 1990 (125 pages) (anglais et français).
41. PNUE: Réutilisation agricole des eaux usées dans la région méditerranéenne. MAP Technical Reports Series No. 41. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1990 (330 pages) (anglais et français).
42. PNUE/UICN: Rapport sur le statut des tortues marines de Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 42. UNEP, Athens, 1990 (204 pages) (anglais et français).
43. PNUE/UICN/GIS Posidonie: Livre rouge "Gérard Vuignier" des végétaux, peuplements et paysages marins menacés de Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 43. UNEP, Athens, 1990 (250 pages) (français seulement).
44. PNUE: Bibliographie sur la pollution aquatique par les composés organophosphorés. MAP Technical Reports Series No. 44. UNEP, Athens, 1990 (98 pages) (anglais seulement).
45. PNUE/AIEA: Transfert des polluants par sédimentation: Recueil des communications présentées aux premières journées d'études méditerranéennes (Villefranche-sur-Mer, France, 10-12 décembre 1987). MAP Technical Reports Series No. 45. UNEP, Athens, 1990 (302 pages) (anglais seulement).
46. PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur le projet sur la relation entre la qualité microbienne des eaux marines côtières et la gastroentérite provoquée par le rotavirus entre les baigneurs (1986-88). MAP Technical Reports Series No.46. UNEP, Athens, 1991 (64 pages) (anglais seulement).
47. PNUE: Les proliférations de méduses en Méditerranée. Actes des 11èmes journées d'étude sur les méduses en mer Méditerranée. MAP Technical Reports Series No.47. UNEP, Athens, 1991 (320 pages) (parties en anglais ou français seulement).
48. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche (Activité G). MAP Technical Reports Series No. 48. UNEP, Athens, 1991 (126 pages) (parties en anglais ou français seulement).
49. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques. Survie des Pathogènes. Rapports finaux sur les projets de recherche (activité K). MAP Technical Reports Series No. 49. UNEP, Athens, 1991 (71 pages) (parties en anglais ou français seulement).
50. PNUE: Bibliographie sur les déchets marins. MAP Technical Reports Series No. 50. UNEP, Athens, 1991 (62 pages) (anglais seulement).

51. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant du mercure, de la toxicité et des techniques analytiques. MAP Technical Reports Series No. 51. UNEP, Athens, 1991 (166 pages) (parties en anglais ou français seulement).
52. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant de la bioaccumulation et de la toxicité des polluants chimiques. MAP Technical Reports Series No. 52. UNEP, Athens, 1991 (86 pages) (parties en anglais ou français seulement).
53. PNUE/OMS: Etudes épidémiologiques relatives aux critères de la qualité de l'environnement pour les eaux servant à la baignade, à la culture de coquillages et à l'élevage d'autres organismes marins comestibles (Activité D). Rapport final sur l'étude épidémiologique menée parmi les baigneurs de certaines plages à Malaga, Espagne (1988-1989). MAP Technical Reports Series No. 53. UNEP, Athens, 1991 (127 pages) (anglais seulement).
54. PNUE/OMS: Mise au point et essai des techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance continue des polluants marins (Activité A): Rapports finaux sur certains projets de nature microbiologique. MAP Technical Reports Series No. 54. UNEP, Athens, 1991 (83 pages) (anglais seulement).
55. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K): Rapport final sur le projet sur la survie des microorganismes pathogènes dans l'eau de mer. MAP Technical Reports Series No. 55. UNEP, Athens, 1991 (95 pages) (anglais seulement).
56. PNUE/COI/FAO: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les matières synthétiques persistantes qui peuvent flotter, couler ou rester en suspension. MAP Technical Reports Series No. 56. UNEP, Athens, 1991 (113 pages) (anglais et français).
57. PNUE/OMS: Recherches sur la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la cancérogénicité et la mutagénicité de certaines substances (Activité G). Rapports finaux sur les projets ayant trait à la cancérogénicité et la mutagénicité. MAP Technical Reports Series No. 57. UNEP, Athens, 1991 (59 pages) (anglais seulement).
58. PNUE/FAO/OMS/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les composés organophosphorés. MAP Technical Reports Series No. 58. UNEP, Athens, 1991 (122 pages) (anglais et français).
59. PNUE/FAO/AIEA: Actes de la réunion consultative FAO/PNUE/AIEA sur l'accumulation et la transformation des contaminants chimiques par les processus biotiques et abiotiques dans le milieu marin (La Spezia, Italie, 24-28 septembre 1990), publié sous la direction de G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 59. UNEP, Athens, 1991 (392 pages) (anglais seulement).
60. PNUE/OMS: Mise au point et essai des techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance continue des polluants marins (Activité A): Rapports finaux sur certains projets de nature microbiologique (1987-1990). MAP Technical Reports Series No. 60. UNEP, Athens, 1991 (76 pages) (parties en anglais ou français seulement).
61. PNUE: Planification intégrée et gestion des zones côtières méditerranéennes. Textes rédigés au cours de la première et de la deuxième phase de l'action prioritaire (1985-1986). MAP Technical Reports Series No. 61. UNEP, Priority Actions Programme, Regional Activity Centre, Split, 1991 (437 pages) (parties en anglais ou français seulement).

62. PNUE/AIEA: Evaluation de l'état de la pollution de la mer Méditerranée par les substances radioactives. MAP Technical Reports Series No. 62, UNEP, Athens, 1992 (133 pages) (anglais et français).
63. PNUE/OMS: Cycles biogéochimiques de polluants spécifiques (Activité K) - Survie des pathogènes - Rapports finaux sur les projets de recherche (1989-1991). MAP Technical Reports Series No. 63, UNEP, Athens, 1992 (86 pages) (français seulement).
64. PNUE/OMM: Pollution par voie atmosphérique de la mer Méditerranée. Rapport et actes des deuxièmes journées d'études OMM/PNUE. MAP Technical Reports Series No. 64, UNEP, Athens, 1992 (246 pages) (anglais seulement).
65. PNUE: Répertoire des centres relatifs au milieu marin en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 65, UNEP, Athens, 1992 (351 pages) (anglais et français).
66. PNUE/CRU: Modifications régionales du climat dans le bassin méditerranéen résultant du réchauffement global dû aux gaz à effet de serre. MAP Technical Reports Series No. 66, UNEP, Athens, 1992 (172 pages) (anglais seulement).
67. PNUE/COI: Applicabilité de la télédétection à l'étude des paramètres de la qualité de l'eau en Méditerranée. Rapport final du projet de recherche. MAP Technical Reports Series No. 67, UNEP, Athens, 1992 (142 pages) (anglais seulement).
68. PNUE/FAO/COI: Evaluation des ateliers de formation sur le traitement statistique et l'interprétation des données relatives aux communautés marines. MAP Technical Reports Series No. 68. UNEP, Athens, 1992 (221 pages) (anglais seulement).
69. PNUE/FAO/COI: Actes de l'Atelier FAO/PNUE/COI sur les effets biologiques des polluants sur les organismes marins (Malte, 10-14 septembre 1991), publié sous la direction de G.P. Gabrielides. MAP Technical Reports Series No. 69. UNEP, Athens, 1992 (287 pages) (anglais seulement).
70. PNUE/AIEA/COI/FAO: Composés organohalogénés dans le milieu marin: Une synthèse. MAP Technical Reports Series No. 70. UNEP, Athens, 1992 (49 pages) (anglais seulement).
71. PNUE/FAO/COI: Techniques sélectionnées de surveillance continue des effets biologiques des polluants sur les organismes marins. MAP Technical Reports Series No. 71. UNEP, Athens, 1993 (189 pages) (anglais seulement).
72. PNUE: Coûts et bénéfices des mesures pour la réduction de la dégradation de l'environnement des sources de pollution d'origine tellurique dans les zones côtières. A -Etude de cas de la baie d'Izmir. B - Etude de cas de l'île de Rhodes. MAP Technical Reports Series No. 72. UNEP, Athens, 1993 (64 pages) (anglais seulement).
73. PNUE/FAO: Rapports finaux sur les projets de recherche traitant des effets de polluants sur les communautés et les organismes marins. MAP Technical Reports Series No. 73. UNEP, Athens, 1993 (186 pages) (anglais et français).
74. PNUE/FIS: Rapport de l'Atelier de formation sur les aspects de la documentation marine en Méditerranée. MAP Technical Reports Series No. 74. UNEP, Athens, 1993 (38 pages) (anglais seulement).
75. PNUE/OMS: Mise au point et essai des techniques d'échantillonnage et d'analyse pour la surveillance continué des polluants marins (Activité A). MAP Technical Reports Series No. 75. UNEP, Athens, 1993 (90 pages) (anglais seulement).



Issued and printed by:

Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme

Additional copies of this and other publications issued by
the Mediterranean Action Plan of UNEP can be obtained from:

Coordinating Unit for the Mediterranean Action Plan
United Nations Environment Programme
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
P.O.Box 18019
11610 Athens
GREECE



Publié et imprimé par:

Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l'Environnement

Des exemplaires de ce document ainsi que d'autres
publications du Plan d'action pour la Méditerranée
du PNUE peuvent être obtenus de:

Unité de coordination du Plan d'action pour la Méditerranée
Programme des Nations Unies pour l'Environnement
Leoforos Vassileos Konstantinou, 48
B.P. 18019
11610 Athènes
GRECE