

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral
I.S.M.A.L.

Mémoire de fin d'étude Présenté en vue de l'obtention du grade d'Ingénieur d'Etat

Option : **microbiologie.**

Thème

Les vibrions marins
de la plage Ouest (Sidi-Fredj): isolement et
identification en fonction de la salinité.

Présenté par :

Mme OUKID BOUZID Mounia.

Soutenu le 1juillet 2001

Devant la commission de jury composée de :

M. SEMROUD R. (Professeur).....	Président
M. BAKALEM A. (chargé de cours).....	Examineur
M. SELLALI B. (Chargé de cours).....	Examineur
Mme SELLALI-MERABTINE II. (chargée de cours).....	Rapporteur



SOMMAIRE

SOMMAIRE

Introduction.....	1
1- Généralités.....	2
1-1- Les bactéries dans le milieu marin.....	2
1-2- Les bactéries et le sel.....	2
1-2-1- Les bactéries halotolérantes.....	4
1-2-2- Les bactéries halophiles.....	5
1-3. Les Vibrionaceae.....	6
1-3-1- Position systématique.....	7
1-4- Le genre Vibrio.....	8
1-4-1- Historique.....	8
1-4-2- Taxonomie.....	8
1-4-3- Caractères microbiologiques.....	10
1-4-3-1- Morphologie et structure.....	10
1-4-3-2- Caractères culturaux.....	10
1-4-4- Caractères biochimiques.....	11
1-5- Classification des vibrions.....	11
1-5-1- Classification selon l'halophilie.....	11
1-5-2- Classement selon la pathogénicité.....	12
1-6- Ecologie et habitat.....	14
1-7- Infections dues aux vibrions.....	15
1-8- Pathologie du poisson.....	15
1-9- Paramètres physico-chimiques.....	17
1-9-1- La température.....	17
1-9-2- La salinité.....	17
1- Matériel et méthodes.....	18
1-1- Matériel.....	18
2-1-1- Présentation de la zone d'étude.....	18
2-1-1-1- Situation géographique.....	18
2-1-1-2- Description du site d'étude.....	18
2-1-1-3- Choix des points de prélèvements.....	18
1-1- Méthode d'étude.....	18
2-2-1- Techniques d'étude des paramètres physico-chimiques.....	20

2-2-1-1- La température.....	20
2-2-1-2- Le potentiel d'hydrogène.....	20
2-2-2- Analyses bactériologiques.....	20
2-2-2-1- Principe.....	20
2-2-2-2- Méthode quantitative.....	21
2-2-2-3- Méthodes qualitatives.....	21
2-2-2-4- Méthodes d'identification	21
2-2-2-4-1- Aspects macroscopiques.....	23
2-2-2-4-2- Aspects microscopiques.....	23
2-2-2-4-3- Croissance selon la concentration en NaCl.....	23
2-2-2-4-4- Croissance à différentes températures.....	23
2-2-2-4-5- Tests biochimiques.....	27
2-2-3- Sensibilité aux antibiotiques.....	28
2-2-4- Traitement des données.....	28
2-2-4-1- Le coefficient de simple appariement (S_{SM} pour simple matching).....	29
2-2-4-2- Méthode de classification et représentation graphique.....	29
2-2-4-3- La diversité spécifique.....	30
3- Résultats et interprétation.....	30
3-1- Paramètres physico-chimiques.....	30
3-1-1- La température.....	30
3-1-2- Le potentiel hydrogène.....	30
3-2- Isolement des vibrions en fonction de la salinité.....	30
3-3- Résultats de l'observation macroscopique.....	31
3-4- Résultats de l'observation microscopique.....	32
3-5- Résultats des tests biochimiques.....	33
3-6- Résultats de l'action des antibiotiques.....	36
3-7- Evaluation de l'affinité entre les souches.....	37
3-8- Résultats et interprétation de l'analyse bactériologique de l'eau de mer.....	41
3-8-1- L'aspect quantitatif.....	41
3-8-2- L'aspect qualitatif.....	44
3-9- Diversité spécifique.....	47
3-10- Etude comparative.....	49
Conclusion générale.....	52

Bibliographie

Annexes



INTRODUCTION
GENERALE

Introduction

Les océans constituent une source de matière organique pratiquement inépuisable pour l'Homme (LECLERC *et al.*, 1977). Les bactéries naturellement présentes partout dans les océans ont un rôle biologique essentiel ; elles assurent la transformation de la matière organique animale ou végétale ; servent de nourriture à de nombreux organismes marins. Elles favorisent la fixation d'algues ou de larves sur certains substrats et permettent la dégradation de multiples polluants (LACAZE, 1996).

Parmi le grand nombre de micro-organismes présents dans le milieu marin, notre intérêt s'est porté sur la famille des *Vibrionaceae*, plus précisément sur le genre *Vibrio*, organismes autochtones des eaux marines, saumâtres et douces. L'intérêt des scientifiques a pendant longtemps porté sur l'espèce *V. cholerae*, agent causal du choléra et responsable de 7 pandémies. C'est en 1951 que *V. parahaemolyticus* a été impliqué dans une épidémie de gastro-entérite au Japon (DODIN *et al.*, 1986). Depuis, de nombreuses espèces ont été identifiées dont onze ont été reconnues pathogènes pour l'homme (LESNE et FOURNIER, 1998).

Les espèces de ce genre sont également importantes car responsables de nombreuses pathologies des habitants de la mer comme les poissons, crustacés etc. et donc sont susceptibles de provoquer de grandes pertes en pisciculture et conchyliculture.

En plus de leur intérêt médicale les vibrions ont un rôle en écologie puisqu'ils participent aux processus protéolytiques et au cycle de l'azote dans le milieu marin en réduisant les nitrates en nitrites (LACAZE, 1980).

L'importance de ce genre n'est pas à démontrer, c'est pour cette raison que cette étude a été effectuée. Elle fait suite à l'étude préliminaire de HENNICHE et REFFAF de 1999 et porte sur l'eau de mer de la plage Ouest de Sidi Fredj. Elle consiste en :

1. L'isolement et l'identification des vibrions sur la base des caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques.
2. Une étude quantitative des germes en fonction de la salinité.
3. Une étude de la diversité des germes en fonction de la salinité.



Chapitre 1.
GENERALITES

1. GENERALITES

1.1. Les bactéries dans le milieu marin

Le contraste violent entre la taille des bactéries dont le volume moyen est de $0.1\mu\text{m}^3$ et l'immensité des océans qui occupent 1370.10^6 km^3 , n'empêche pas les premières de jouer un rôle prépondérant dans le devenir des seconds.

Ce sont les caractéristiques physico-chimiques de l'eau de mer à savoir un pH de 8, une salinité moyenne de 35 PSU, une température avoisinant les 15°C , la pression hydrostatique et une fertilité en matière organique inépuisable bien que très diluée, qui rend ce milieu particulièrement favorable au développement d'une microflore variée, comprenant des algues, des protozoaires, des champignons, des levures et bon nombre de bactéries (LECLERC *et al.*, 1977 ; BIANCHI *et al.*, 1988).

Bien que, la microflore marine soit très variée, les formes sporulantes et les cocci sont rares. C'est Zobell et Upham (1938 *in* ZOBELL 1946) qui, les premiers, ont fait cette constatation de même que la prédominance des Gram négatifs. Par la suite, d'autres auteurs ont confirmé ce résultat (LECLER *et al.*, 1977 ; QUILLIEN, 1980 ; BAUMANN et BAUMANN, 1981). Environ 94% des bactéries hétérotrophes (tableau 1-1) des mers et océans sont Gram négatif. Il semble que cette paroi fine et riche en lipide évite l'éclatement cellulaire dû aux fortes pressions et favorise la vie dans un milieu oligotrophe qu'est l'eau de mer (BIANCHI *et al.*, 1988).

Tableau 1-1 : Comparaison entre les différents groupes morphologiques de bactéries présentes dans le sol, la mer et les lacs. ZOBELL et UPHAM (1938 *in* ZOBELL 1946).

Groupe morphologique	Sol %	Lac %	Eau de mer & sédiment %
Bacille Gram négatif	36.1	95.5	94.4
Bacille Gram positif	46.5	3.8	1.2
Bacille douteux	9.4	—	0.9
Cocci	3.8	0.7	2.8
Autres	4.2	—	0.5

Dans l'eau de mer les groupes bactériens les plus fréquents appartiennent aux genres suivants : *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, *Cytophaga*, *Cellvibrio* et *Vibrio* (LECLER *et al.*, 1977).

La teneur bactérienne moyenne en haute mer est estimée à quelques centaines de bactéries/ml (QUILLIEN, 1980). A cette flore microbienne naturelle s'ajoutent des micro-organismes d'origine terrestres apportés par les eaux usées (10^9 - 10^{10} bactéries /litre) d'origine urbaine ou industrielle et sont déversées dans les eaux côtières (LECLERC *et al.*, 1977 ; GAUTHIER *in* BIANCHI *et al.*, 1988). Parmi ces bactéries certaines peuvent être pathogènes pour l'homme mais la plupart sont saprophytes ; il s'agit en grande majorité de germes appartenant au groupe des coliformes et des streptocoques fécaux.

Toute cette microflore allochtone, à son arrivée en mer va réagir différemment aux conditions du milieu, une partie va s'adapter aux nouvelles conditions et certaines vont disparaître (POMMEPUY *et al.*, 1994). Cette adaptation va dépendre en particulier de leur faculté à gérer le stress provoqué par le chlorure de sodium et la température, ce qui n'est pas le cas des bactéries autochtones qui elles y sont adaptées.

1.2. Les bactéries et le sel

Le milieu marin et les eaux saumâtres en raison de leur composition constituent des écosystèmes favorables à la sélection d'organismes qui ont besoin du sel pour se développer. Les exigences que manifestent ces micro-organismes vis à vis de la concentration en chlorure de sodium conduit à la distinction d'un certain nombre de catégorie :

- ♦ les sténohalines qui ne supportent pas de grands écarts de concentrations salines,
- ♦ les euryhalines qui ne se développent qu'à de fortes concentrations salines, autrement dit halophile extrême ou hyperhalophile avec des besoins supérieurs à 3M
- ♦ les halophiles modérées ou halotolérants qui supportent des concentrations de NaCl de 1 à 3 M (BRISOU et DENIS, 1980 ; BIANCHI *et al.*, 1988).

Il est incontestable qu'un grand nombre de bactéries isolées du milieu marin manifestent des besoins en sel et en particulier en Na^+ pour atteindre une croissance optimale. Dans certaines conditions ces même bactéries présentent le plus souvent la propriété de se

lyser dans l'eau distillée. Cette cytolyse peut être évitée par divers cations, sur ce point précis les besoins en Na^+ ne sont pas spécifiques et d'autres sels peuvent le remplacer. Cependant, si l'évolution et la survie des cellules dans des solutions salines de composition variable sont étudiées conjointement avec celle de la lyse, la présence du sodium s'avère indispensable.

Le rôle prépondérant de cet ion se retrouve dans les activités métaboliques localisées dans la membrane cytoplasmique, comme l'oxydation et le transport des nutriments. Mais, chez certaines souches seul un mélange complexe d'ions dont la composition chimique est proche de celle de l'eau de mer permet le maintien d'une activité physiologique normale. UNEMOTO et HYASHI (1979 in BIANCHI *et al.*, 1988), ont émis l'hypothèse de l'existence d'une pompe à sodium chez *Vibrio. alginolyticus*. TSUCHIYA et SHINODA, (1985 in BIANCHI *et al.*, 1988) ont également mis en évidence une pompe à sodium chez *Vibrio paraheamolyticus*.

D'autres études sur *V. fisheri*, *V. alginolyticus* et *V. natriegens* ont démontré que la vitesse d'utilisation des nutriments ainsi que le fonctionnement des différentes composantes de la chaîne respiratoire est nettement stimulé par la présence du sodium. Certains vibrions exigent la présence de sel pour l'oxydation de leurs substrats exogènes tel que la production d'indole à partir du tryptophane.

Pour combattre la sortie de l'eau, les bactéries halotolérantes et halophiles ont développé des mécanismes différents.

1.2.1. Bactéries halotolérantes

Ce sont des espèces, capables de se développer indifféremment en présence d'eau de mer et d'eau douce. C'est principalement des micro-organismes et des algues unicellulaires qui peuvent s'adapter à de très fortes concentrations de sel en fabriquant des petites molécules (par exemple le glycérol) qui s'accumulent à l'intérieur des cellules. Ces composés permettent une régulation de la pression osmotique et un échange entre le milieu externe et interne, au final la concentration des molécules dissoutes égale la concentration de sel en milieu extérieur (FORTERRE, 1999).

Dans ces conditions d'équilibre entre l'extérieur et l'intérieur, l'eau ne s'échappe plus des cellules et les réactions biochimiques ne sont pas inhibées. Lorsque la concentration

externe en sel diminue, cette synthèse est stoppée; les cellules continuent à vivre normalement (ZACCAI et FRANZETTI, 1999).

Ces mécanismes de régulation osmotique ont été aussi étudiés chez les bactéries fécales comme *E. coli*, *Salmonella* et *Klebsiella*. Lorsque ces bactéries, originaire du tube digestif, arrivent en mer, elles accumulent des molécules appelées osmoprotectrices. (POMMEPUY *et al.*, 1994). Il s'agit essentiellement de glycine-bétaïne, d'ion potassium, d'acides aminés et de thréhalose (POMMEPUY *et al.*, 1991).

D'après Brisou (1980) *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* ou *V. cholerae* supportent mieux le sel lorsque le milieu est riche en matière organique. En effet, la matière organique augmente l'halotolérance des bactéries allochtones (POMMEPUY *et al.*, 1992). Dans ces milieux les algues macrobenthiques comme *Ulva lactuca* et *Enteromorpha ramulosa* peuvent être la source des molécules osmoprotectrices (GHOUL, 1993).

1.2.2. Les bactéries halophiles

Le sodium chez ce groupe de germes est indispensable à la vie. Ces bactéries se développent de façon optimale dans des milieux contenant 4 moles/litre de NaCl, au concentration inférieure à 1 mole/litre elles meurent. Contrairement aux halotolérantes les bactéries dites halophiles accumulent dans leur cytoplasme du KCl proche de la saturation ce qui empêche la sortie d'eau (ZACCAI et FRANZETTI, 1999).

Habituellement dans ces conditions de salinité les protéines deviennent insolubles et ne sont plus fonctionnelles. Au contraire, les protéines halophiles restent solubles et fonctionnelles aux fortes concentrations de KCl. Au lieu de se protéger du sel, les protéines halophiles l'associent à leur structure et l'utilisent pour capturer les molécules d'eau nécessaire à maintenir leurs repliements et donc la structure tertiaire, leur stabilisation et leur solubilité.

En 1995, les études cristallographiques de la malate déshydrogénase et de la ferredoxine de *Haloarcula marismortis* ont montré que ces deux protéines se distinguent de leur homologues non halophiles par leur richesse en acides aminés acides c'est à dire portant

des charges négatives. Ces charges maintiennent une couche de sel hydraté permettant la stabilisation des protéines (ZACCAI et FRANZETTI, 1999).

1.3. Les *Vibrionaceae*

C'est depuis 1965 que VERON (1966 in VERON et POPOFF, 1990), a établi une définition précise de cette famille et c'est depuis cette date que leur systématique a évolué (MEYER *et al.*, 1997).

La définition actuelle est acceptée par l'ensemble des bactériologistes. Les membres de la famille des *Vibrionaceae* sont des bacilles Gram négatif, droits ou incurvés, mobiles par cils polaires ou immobiles, dans certaines conditions de culture ils produisent des flagelles latéraux qui diffèrent des cils par leur longueur d'onde et par leur nombre de quelque'un jusqu'à 100 par cellule.

Ils sont chimoorganotrophes, anaérobies facultatives capables d'un métabolisme respiratoire et fermentatif (LECLERC *et al.*, 1993). La majorité est oxydase positive, tous utilisent le D-glucose comme source de carbone et d'énergie (PRESCOTT *et al.*, 1995). Ils croissent sur milieux ordinaires et sont capables de réduire les nitrates en nitrites (PILET *et al.*, 1981).

Cette définition permet de les distinguer des Entérobactéries (oxydase positive) et des *Pseudomonaceae* (aérobie stricte) avec lesquels on peut les confondre.

La plupart des espèces exigent 2 à 3 % de chlorure de sodium ou un milieu à base d'eau de mer pour leur croissance optimale.

Ils ont un habitat aquatique (eau douce, eau de mer), on les trouve essentiellement le long des côtes, dans les estuaires. Seules les espèces les plus halophiles ont été isolées en pleine mer. La plupart sont saprophytes mais certains peuvent être rencontrés chez l'homme, les vertébrés ou les invertébrés pour lesquels ils peuvent être pathogènes. Plusieurs membres de la famille se distinguent par leurs bioluminescences.

La famille des *Vibrionaceae* est formée de type bactérien apparenté qui peuvent être rassembler en quatre genres sur la base de leurs caractères biochimiques (tableau 1.2). *Vibrio* qui est le genre type, *Photobacterium*, *Aeromonas*, *Plesiomonas*, plusieurs autres genres

Beneckeia, *Listonella*, *Oceanomonas* pourraient également en faire partie (BAUMANN et al. 1993 ; PRESCOTT, 1995 ; MEYER et al., 1995 ; PEIFFER, 1998 ; LEMOINE et al., 1999).

Tableau 1.2 : Les différents caractères des genres constituant la famille des *Vibrionaceae* selon (VERON et POPOFF, 1990).

Caractères	<i>Vibrio</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Photobactérium</i>
Arginine dihydrolase	-	+	+	+
Ciliature	PM	PL	PM	PM
Lysine décarboxylase	+	+	D	+
Ornithine décarboxylase	+	+	-	D
Oxydase	D	+	+	-
Infections humaines	+	-	+	+
GC %	38 - 51	40 - 44	57 - 63	51
Flagelle polaire à gaine	+	-	-	-
Poly-β-hydroxybutyrate (accumulation)	-	+		
Exigence en Na+	+	+	-	-
Sensibilité au composé vibriostatique O/129	+	+	-	+
Lipase	+	V	+	-
Fermentation D-mannitol	+	-	+	-

PM: Polaire monotriche, PL : Polaire lophotriche, D : Résultat différent selon les espèces ; + : Résultat Positif ; - : Résultat Négatif ; C+G : cytosine+guanine.

1.3.1. Position systématique

Dans la systématique bactérienne, la famille des *Vibrionaceae* est classée comme suit (LECLERC et al., 1995) :

Règne: *Procaryote*
 Embranchement: *Gracillicute*
 Classe: *Proteobacterie*
 Famille: *Vibrionaceae*
 Genre : *Vibrio* - *Aeromonas* - *Photobacterium* - *Plesiomonas*.

D'après les études d'homologie des ARNr/ADN, *Vibrio* et *Photobacterium* seraient proche, tandis que les deux autres genres sont plus distants (PRESCOTT et al., 1995).

1.4. Le genre *Vibrio*

1.4.1. Historique

La première description historique par un Européen a été faite en 1503 par un officier de Vasco de Gama, qui décrivit une épidémie de diarrhées cataclysmiques provoquant 20000 morts à Calicut. A partir des foyers endémiques principalement le Delta du Gange dont les eaux alcalines favorisent le développement des vibrions (BERCHE, 1998).

Le vibron cholérique, espèce type du genre, est l'agent responsable des 7 pandémies qu'a connues l'humanité.

La première pandémie eut lieu en 1817 et ce n'est qu'en 1854 que Snow reconnut le rôle important de l'eau dans la transmission de la maladie. Mais, ce n'est qu'en 1883-1884 lors de la cinquième pandémie (figure 1.1) que Robert Kock isola et caractérisa pour la première fois l'agent pathogène responsable du choléra, il l'appela *V comma* ; le bâtonnet incurvé ressemblait à une virgule (BERCHE, 1998).

Entre 1884 et 1909 quatre autres espèces ont été décrites et de 1927 à 1964 sept autres ont été répertoriées selon des critères morphologiques et physiologiques (VERON et POPOFF, 1990).

Des progrès considérables depuis ont permis de comprendre le mode de dissémination du germe et d'entreprendre dès la fin du XIX^{ème} siècle des mesures prophylactiques efficaces pour enrayer la propagation de la maladie (DODIN *et al.*, 1986, BERCHE, 1998 ; LESNE et FOURNIER, 1998).

Depuis 1817 à nos jours le choléra a causé plus de 3.800.000 morts (BERCHE, 1998 ; PEIFFER, 1999 ; MOREIRA, 2000).

1.4.2. Taxonomie

Les données actuelles de la biologie moléculaire, les études d'hybridations ADN/ADN en plus des caractères morphologiques cultureux et biochimiques ont permis l'évolution de la classification des espèces appartenant au genre *Vibrio*. De cette évolution il en est résulté un certain nombre de changement. Par exemple, *V. damsela* est devenue

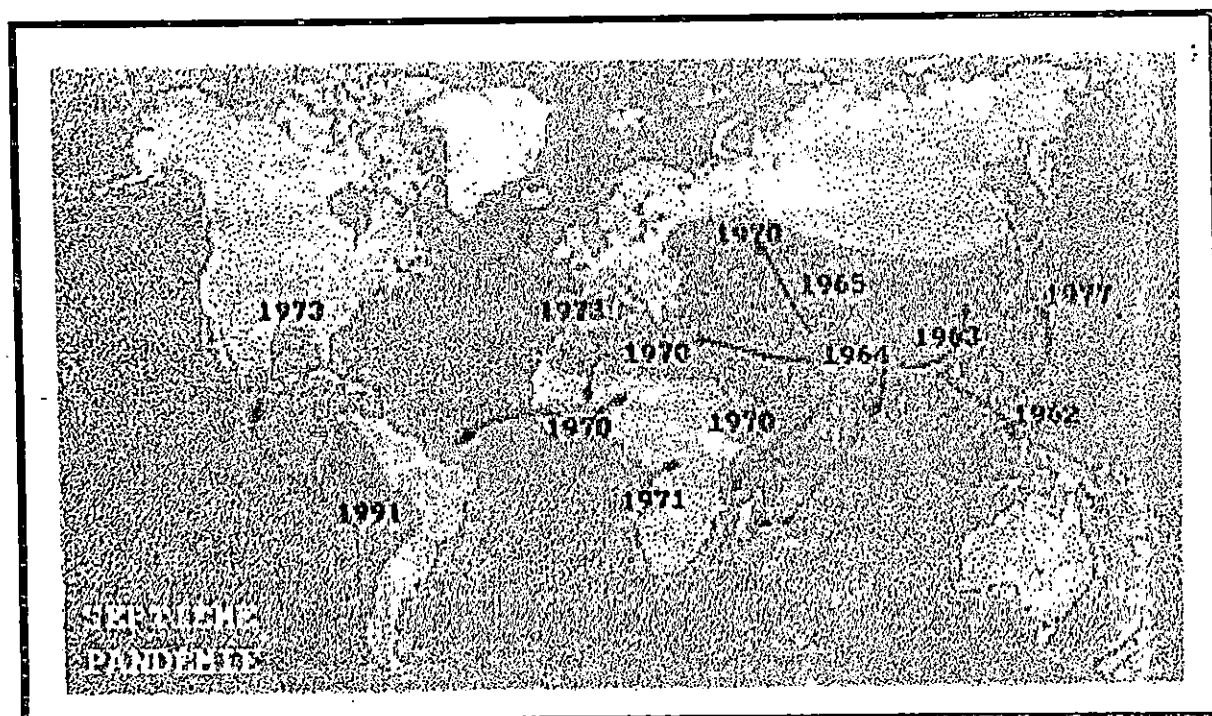
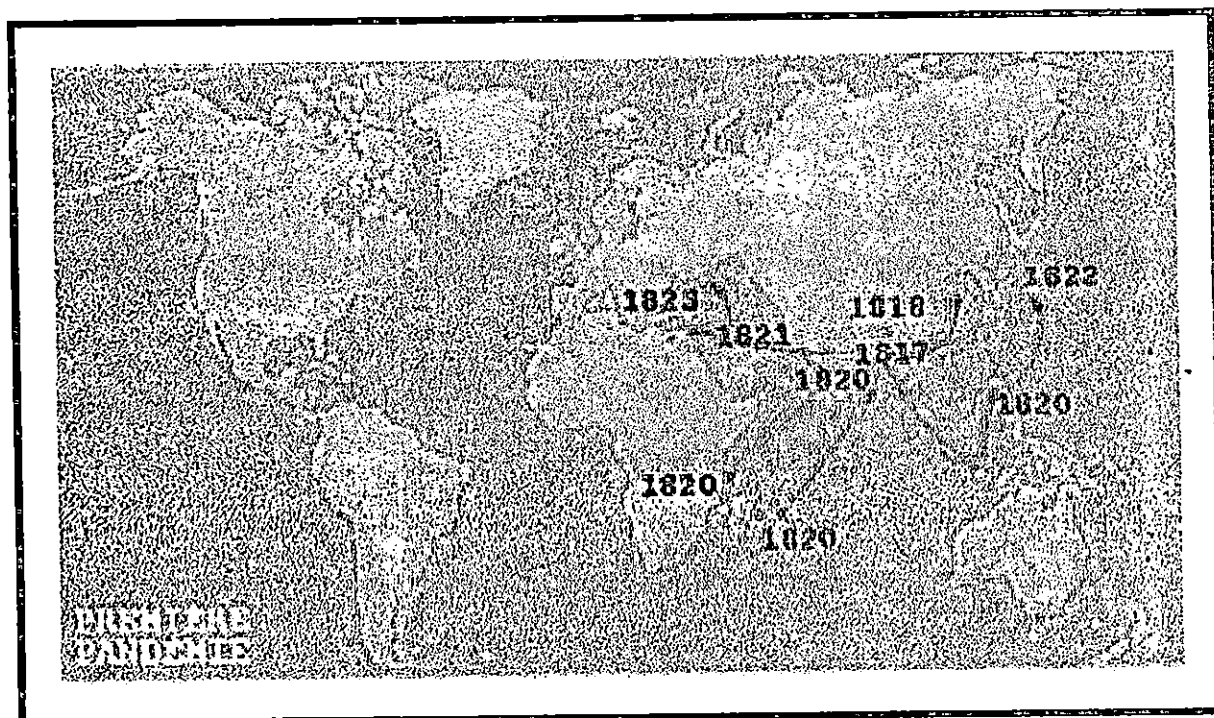


Figure 1-1 : Les sept grandes pandémies de choléra, (ANONYME, 1998)
Les dates indiquent le début de l'épidémie dans le pays concerné.

Photobacterium damsela. Le genre *Vibrio* s'est enrichi de nouvelles espèces, les organismes appartenant au genre *Beneckeia* ont été reclassés dans ce genre en 1980. Ce genre est tout de même hétérogène sur le plan phylogénétique (VERON et POPOFF, 1990).

1.4.3. Caractères microbiologiques

1.4.3.1. Morphologie et structure

Ce sont des bâtonnets court (0.5-0.8 μm de large et 1.4-2.6 μm de long), Gram négatif, droits ou légèrement incurvés (en virgule) et très mobiles en milieu liquide grâce à un flagelle polaire monotriche ou lophotriche inclus dans une gaine. En milieu solide ils peuvent synthétiser de nombreux flagelles latéraux qui en milieu humide provoque le phénomène d'essaimage qui est un envahissement de la boîte de Pétri (VERON et POPOFF, 1990).

Ils peuvent être isolés, en paire ou en amas, donnant l'aspect de bancs de poissons (PEIFFER, 1999). Cette bactérie n'est ni capsulée ni sporulée (PILET *et al.*, 1981 ; POPOFF *et al.*, 1982).

1.4.3.2. Caractères cultureux

Commun à tous les vibrions aérobies préférentiels, les vibrions se développent facilement sur milieux ordinaires. Les colonies sont convexes, lisses, blanc crémeux à bord entier (BAUMANN *et al.*, 1984).

Certaines espèces élaborent des pigments : *V. nigripulchritudo* produit un pigment bleu noir sur milieu minimum. Le pigment est rouge chez *V. gazogenes*, jaune-orange chez *V. logei* et *V. fisheri*

Le genre *Vibrio* se cultive entre 2 et 40°C avec un optimum à 37°C (POPOFF *et al.*, 1982 ; VERON et POPOFF, 1990). Ces bactéries sont favorisées par un pH alcalin de 7.6 à 9.5 (pH optimal 8) et une concentration en NaCl de 3 à 8%.

Le germe est assez fragile, il est sensible à la chaleur (tué en 5 minutes à 80°C) comme au froid, sensibles aux antiseptiques et à de nombreux antibiotiques (dont les cyclines), à l'acidification du milieu de culture (PEIFFER, 1999).

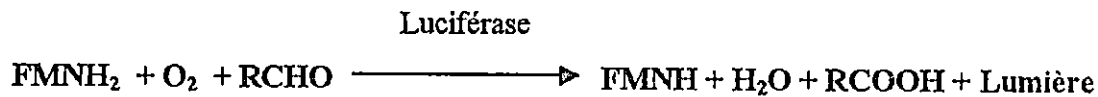
Il se divise tellement activement qu'on obtient une culture visible en bouillon ou en eau peptonée en trois heures. Un trouble est observé en 24 heures, on observe un voile fin et fragile. La culture en eau peptonée est encore plus rapide qu'en bouillon nutritif, l'acidification très rapide des milieux peut entraîner la mort.

1.4.4. Caractères biochimiques

Les vibrions sont des micro-organismes aéro-anaérobies et donc ont un métabolisme oxydatif et fermentatif, l'oxygène est l'accepteur d'électrons. Ils sont chimioorganotrophes, la plupart peuvent se développer dans un milieu minéral contenant du glucose et du chlorure d'ammonium (NH_4Cl). Tous dégradent le D-glucose, le D-fructose et le glycérol.

La majorité des espèces sont oxydase positive hormis *V. metschnikovi* et *V. gazogenes* qui sont oxydase négative. Ces deux espèces ne possèdent pas de nitrate réductase alors que toutes les autres réduisent les nitrates en nitrites mais aucun d'eux ne réduit les nitrates jusqu'au stade NO et azote moléculaire.

Certaines espèces (*V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei*, *V. splendidus*) sont bioluminescentes. Elles produisent de la lumière suivant la réaction :



1.5. Classification des vibrions

Le genre *Vibrio* peut être classé selon l'halophilie et leur pathogénicité.

1.5.1. Classification selon l'halophilie

Selon BRISOU (1980) (tableau 1-3), le genre *Vibrio* est le groupe bactérien qui contient la plus grande proportion de germe halophile stricte. Ce genre comprend plus de 30 espèces qui toutes sont d'habitat aquatique, les unes sont halophiles strictes, les autres non (HASLAY et LECLERC, 1993).

Les vibrions halophiles faibles ou halotolérants sont capables de se croître en absence de sel. Le plus représentatif est *V. cholerae*, puis *V. metschnikovii* et *V. mimicus*; leur besoin varie de 5 à 15 mmole.

Les halophiles modérés supportent des salinités de 1 à 3 moles. Dans cette catégorie se placent la plupart des vibrions marins comme *V. costicola*, *V. marinus*.

Tableau 1.3 : Classement des *Vibrio* selon leur besoin en ion sodium (BRISOU, 1980 ; VERON et POPOFF, 1990).

L'halophilie faible	L'halophilie modérée	L'halophilie extrême
<i>V. cholerae</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. costicola</i>	<i>V. furnisii</i>
<i>V. mimicus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
	<i>V. liquefaciens</i>	<i>V. splendidus</i>
	<i>V. marinus</i>	<i>V. fischeri</i>

Les halophiles extrêmes supportent des salinités supérieures à 3 moles.

1.5.2. Classement selon la Pathogénicité

LESNE et FOURNIER (1998) ont classé les *Vibrions* en fonction de leur pouvoir pathogène. Les *Vibrions* sont surtout connus en pathologie humaine, mais peuvent être à l'origine de vibrioses pour les organismes marins.

- **Vibrions pathogènes pour l'homme**

Ils sont la cause de nombreuses infections et pathologie grave, 11 espèces de vibrions sur 47 sont reconnues être pathogènes pour l'homme causant de nombreuses infections, septicémie, diarrhées etc. (tableau 1.4).

- **Vibrions non pathogènes pour l'homme**

Certains vibrions ne sont pas directement pathogènes pour l'homme, néanmoins l'ingestion de produits marins contaminés peut provoquer d'éventuelles infections à gastro-entérites. Ils sont par contre pathogènes pour les animaux marins, les poissons, crustacés et coquillages.

Tableau 1.4. : Composition actuelle du genre *vibrio* (LESNE et FOURNIER, 1998):

Espèces non pathogènes pour l'homme	Espèces pathogènes pour l'homme
<i>V. aesturianus</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. aerogenes</i> <i>V. campbelli</i> <i>V. costicola</i> <i>V. diabolicus</i> <i>V. diazotrophicus</i> <i>V. fischeri</i> <i>V. gazogenes</i> <i>V. herveyi</i> <i>V. haliotocoli</i> <i>V. ichtyoenteri</i> <i>V. iliopiscarius</i> <i>V. logei</i> <i>V. marinus</i> <i>V. mediterranei</i> <i>V. mytili</i> <i>V. naverrensis</i> <i>V. natriegens</i> <i>V. nereis</i> <i>V. nigripulchritudo</i> <i>V. ordalii</i> <i>V. pelagius</i> <i>V. penaeicida</i> <i>V. proteolyticus</i> <i>V. rumoiensis</i> <i>V. salmonicida</i> <i>V. scophtalmi</i> <i>V. splendidus</i> <i>V. taletis</i> <i>V. trachuri</i> <i>V. tubiashii</i> <i>V. viscosus</i> <i>V. wodanis</i>	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. cholerae</i> <i>V. carchariae</i> <i>V. cincinnatiensis</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. furnissii</i> <i>V. hollisae</i> <i>V. metschnikovii</i> <i>V. mimicus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>

1.6. Ecologie et habitat

Les *vibrionaceae* vivent essentiellement le long des côtes marines où dans les estuaires et mares moyennement salées, seules les espèces les plus halophiles *V.costicola*, *V.splendidus* peuvent vivre en pleine mer. Inversement les espèces halotolérantes *V.cholerae*, *V.fluvialis*, *V.anguillarum*, et *V.ordalii* se retrouvent dans les eaux d'estuaires et eaux douces (DODIN et FOURNIER, 1992 ; LECLERC *et al.*, 1995 ; MEYER *et al.*, 1995).

Le genre *vibrio* rassemble des espèces halotolérantes dont la croissance n'est pas inhiber par de grandes concentrations salines (VERON et POPPOF, 1990 ; GELINAS, 1995 ; LESNE et FOURNIER, 1998 ; PEIFFER, 1999 ; EUZEBY, 2000).

Cette salinité influe sur la résistance du *V.cholerae* dans l'environnement marin puisqu'il survie à une salinité de 2.5% pendant 42 jours plutôt qu'à une salinité de 0.5%. Sa viabilité est réduite lorsqu'il n'y a pas de particules, en effet le zooplancton constitue un réservoir de *V.cholerae* dans l'environnement.

Il a été constaté qu'à chaque épidémie de *V. cholerae* qui se renouvelle chaque année pendant les mois de septembre et octobre, il y a une augmentation de la biomasse zooplanctonique dans l'environnement aquatique en particulier des copépodes. On a alors penser à une relation possible entre l'incidence de tels copépodes et la distribution de *V. cholérique* dans l'environnement (URDACI-BERTRAN, 1987). Des études devraient également évaluer l'effet de certains environnements sur les facteurs de virulence et les caractéristiques antigéniques et biochimiques de *V.cholerae* O1 et O139.

Parmi les vibrions luminescents *V. harveyi* est le plus fréquent dans les 150m de la colonne d'eau au printemps, il diminue en automne pour disparaître en hiver (Baumann *et al.*, 1984). RUBY ET NELSON, (1978, in BAUMANN *et al.*, 1984) ont également observé une variation saisonnière pour *V.splendidus* et *V.fisheri*. Ce dernier peut vivre dans les organes lumineux des poissons et des calmars. *V.fisheri* et *V. harveyi* ont été isolé à la surface et dans le tube digestif des animaux marins.

1.7. Infections dues aux Vibrions

Les vibrions marins potentiellement pathogènes pour l'homme constituent un contaminant des produits de la mer d'origine environnementale qui ne peut être éradiqué des zones de productions et de collecte (LESNE et FOURNIER, 1998).

Le développement du commerce international pour les produits de la pêche ou d'élevage va favoriser la diffusion des vibrions qui résistent aux opérations de congélation ou réfrigération (PEIFFER, 1998).

Il existe des différences considérables parmi les infections dues aux autres vibrions et même parmi les infections causées par différents isolats d'une même espèce de *vibrio* (tableau 1.5). Ces vibrions sont responsables le plus souvent de gastro-entérites mais peuvent parfois provoquer des septicémies (*V.cincinnatiensis*), des otites (*V.alginolyticus*), des plaies (*V.hollisae*) ou des conjonctivites (*V.vulnificus*).

La cause de la maladie peut être due à une toxine comme chez *V. cholerae* ou la capsule comme pour *V. vulnificus*. La dose infectante est variable de 10^2 à 10^9 UFC/ml, (FDA, 1992 ; LESNE et FOURIER, 1998).

Le *V. parahaemolyticus* est responsable de 50% à 70% des maladies liées à la consommation de produits marins au Japon (PEIFFER, 1998), le *V. vulnificus* est la cause de 95% des mortalités relatives à l'ingestion de produits marins aux Etats Unis (OLIVER, 2000).

1.8. Pathologie du poisson

Les vibrions affectent non seulement l'homme mais sont responsables de nombreuses pathologies infectieuses (figure 1- 2).



Figure 2.1 : Nécrose du muscle chez le saumon (*Salmo gairdner*) par *V. anguillarum* (OLIVER, 2000).

Les travaux menés par GAUTHIER *et al.*, (1982) ont mis en évidence la dominance des *VIBRIONACEAE* dans les nécroses chez les espèces du genre *Vibrio* (tableau 1.5).

Vibrio anguillarum est l'agent le plus pathogène chez les poissons et les autres organismes marins, (AUBERT *et al.*, 1979 ; SINDERMAN *et al.*, 1990). La maladie se manifeste par des lésions viscérales nécrotiques, cette espèce est ubiquiste dans les milieux aquatiques et peut être présente sur la peau saine du poisson, elle constitue la majeure partie de la flore intestinale des organismes marins, (BRUNI *et al.*, 1986).

Tableau 1.5 : Certaines maladies de poissons causées par quelques espèces de *vibrio*. (DECLERK, 1991 ; ASSEFSAF et LEUBNA-DJEMMAZI, 1996 ; FIGUERAS *et al.*, 1996).

Espèces	Pathologie	Environnement	Hôtes
<i>V.anguillarum</i>	Vibrioses Septicémie Lésion du muscle	L'eau de mer, Les eaux saumâtres, L'aquaculture	Plusieurs produits marins Saumon Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)
<i>V.carchariae</i>	Mortalité	Elevage	Requin (<i>Carcharhinus plumbeus</i>)
<i>V.damsela</i>	Ulcère sur la peau	Aquaculture	Requins
<i>V.ordalii</i>	Ulcération	L'eau douce, L'eau de mer, L'aquaculture	Saumons
<i>V.salmonicida</i>	Anémie et hémorragie	Elevage	Saumons
<i>V.tapetis</i>	Anneau brun	Eau de mer, Aquaculture	Palourde
<i>V.vulnificus</i>	Des lésions	Eau de mer	Huîtres
Certaines espèces de <i>vibrio</i>	Nécrose des muscles et des ligaments associés aux piquants	Eau de mer	L'oursin (<i>Paracentrotus lividus</i>)
<i>V.harveyi</i>	Gastro-entérites Infections, Léthargie, anorexie, nécroses des reins et des kystes sous cutanées Dégénérescence tissulaire de l'hépatopancréase	Aquaculture L'eau de mer Aquaculture Aquaculture	Mérous, Huîtres perlières, Requins Crevettes

1.9. Paramètres physico-chimiques

L'étude des vibrions dans le milieu marin est en relation avec des paramètres physico-chimiques.

1.9. 1. La température

La température est un important paramètre dans la survie des bactéries. Les variations de la température de l'eau de mer résultent des échanges entre les couches superficielles chaudes et profondes froides. Les périodes de refroidissement des eaux sont défavorables au développement bactérien, la température marine est entre 10°C et 25°C avec un optimum de 15°C à 18°C (BRISOU, 1986).

Selon la température optimale de développement on distingue généralement trois catégories de micro-organismes mésophiles, psychrophiles c'est dans cette catégorie que la majorité des micro-organismes marins sont classés ; les thermophiles, les thermophiles extrêmes et les thermotrophes (LECLERC *et al.*, 1995).

1. 9. 2. La salinité

La mesure de la salinité est importante dans l'étude microbiologique du milieu marin puisqu'elle influe sur la densité de l'eau de mer. Elle permet de connaître la circulation océanique, d'identifier les masses d'eaux d'origines différentes et de suivre leur mélange au large de la côte. C'est un paramètre qui présente la proportion de sels minéraux dissous dans l'eau de mer (AMINOT, 1983). En Méditerranée la salinité est voisine de 38 à 39 pour mille, mais près des côtes elle varie entre 36 à 37 pour mille (IFREMER, 1986).



Chapitre 2.
MATERIEL ET
METHODES

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1. Matériel

2.1.1. Présentation de la zone d'étude :

2.1.1.1. Situation géographique

La localité de Sidi Fredj est une presqu'île située dans la partie Ouest de la baie d'El Djamila qui mesure 6 Km de long. Cette baie est délimitée par deux promontoires rocheux, Sidi Fredj à l'Ouest et Ras Acrata au Nord Est.

Les Coordonnées Lambert de la région de Sidi Fredj sont 2° 50' 52'' longitude Est et 36° 45' 05'' latitude Nord. Le port de Sidi-Fredj est implanté dans l'anse Est de la Presqu'île il s'intègre dans le complexe touristique, le tout formant une station balnéaire importante située à 24 Km à l'Ouest d'Alger dans la commune de Staoueli, Wilaya d'Alger (figure 2-1).

2.1.1.2. Description du site d'étude

La plage Ouest est délimitée au Nord par la digue du centre de thalassothérapie et au Sud par la digue du centre de repos de l'ANP. Cette plage est bordée par plusieurs habitations, une base nautique et un restaurant, certaines de ces habitations rejettent leurs eaux usées sur la plage.

2.1.1.3. Choix des points de prélèvement

Une seule station a été choisie, elle est située à 10 m du bord où l'on signale un petit rejet du restaurant (figure 2-2).

Trois prélèvements ont été effectués au niveau de cette station, le premier au mois de Juillet le 13-07-1999, le second le 14 septembre 1999 et le dernier le 27 septembre 1999.

2.2. Méthode d'étude

Pour chacun des trois prélèvements un échantillonnage de l'eau de mer a été effectué.

Les bouteilles utilisées pour le prélèvement d'eau sont préalablement stérilisées à la chaleur humide pendant 20 minutes à 120°C. Elles sont plongées à 30 cm de la surface, ouvertes et fermées dans l'eau pour éviter toute contamination en prenant soin de laisser une certaine quantité d'air pour l'homogénéisation.

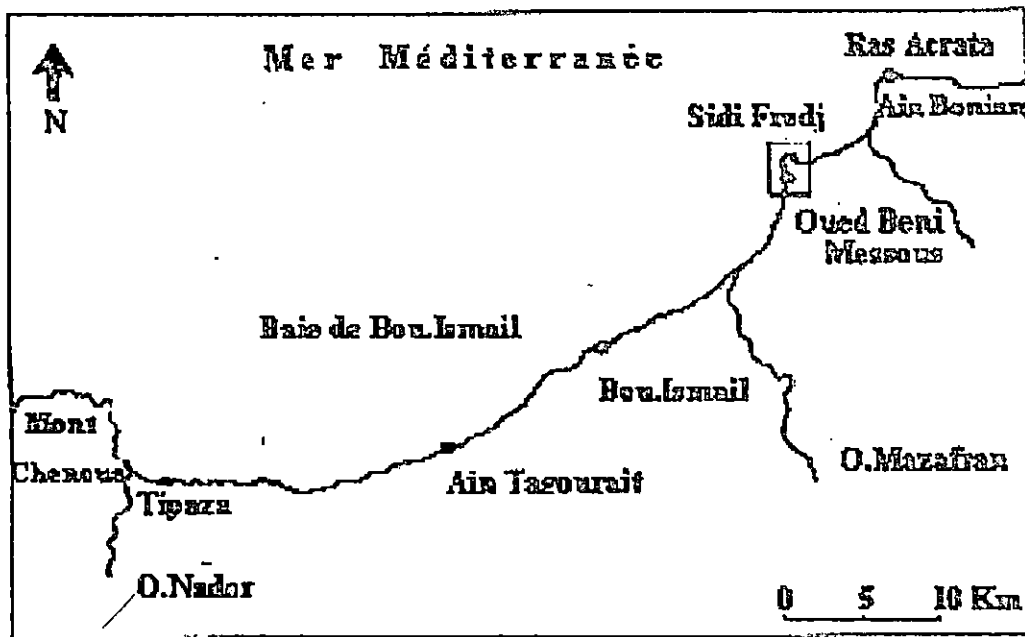


Figure 2-1 : Situation géographique de la presqu'île de Sidi Fredj (BOUCHEMLA, 1998).

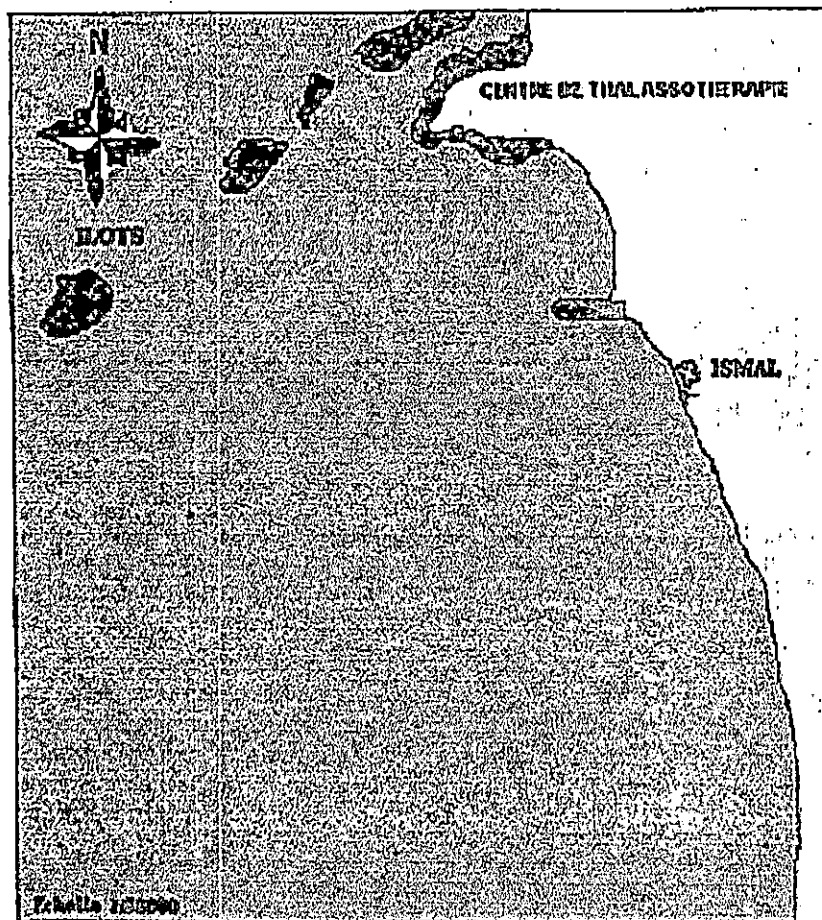


Figure 2-2 : Positionnement (○) de la station de prélèvement (BOUCHEMLA, 1998).

2.2.1. Techniques d'étude des paramètres physico-chimiques

2.2.1.1. La température

La température est relevée à chaque prélèvement. Elle est mesurée à l'aide d'un thermomètre gradué de 0°C à 40°C, celui-ci est plongé dans l'eau quelques minutes.

2.2.1.2. Le potentiel d'hydrogène

La mesure du pH de l'eau de mer se fait au laboratoire à l'aide d'un pH mètre de marque HANNA instrument HI 8521 à électrode combinée gélifiée.

2.2.2. Analyses bactériologiques

2.2.2.1. Principe

Le présent travail consiste à rechercher et isoler les vibrions marins à différentes salinités de 0.5%, 1.5%, 3.5% du milieu d'enrichissement en fixant le pH à 8.6. Cette recherche est qualitative et quantitative et consiste en une étape d'enrichissement, une étape d'isolement, une étape de purification et l'identification biochimique (figure 2-3).

2.2.2.2. Méthode quantitative

Cette méthode est très largement utilisée pour déterminer l'abondance totale des bactéries (annexe 1) dans le milieu aquatique (TROUSSELIER et al, 1985). Cette évaluation est fondée sur un modèle de calcul établie par les Normes Afnor (ISO, 1991). Trois dilutions d'un volume de 0.1ml de tampon phosphate sont préparées à partir de chaque solution mère. L'ensemencement de trois boîtes de gélose thiosulfate citrate bile saccharose (T.C.B.S) par dilution se fait par étalement en surface. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h (figure 2.3).

Lors du comptage les boîtes présentant une culture en nappe ne sont pas prises en considération. Le calcul du nombre de microorganismes par millilitre est pris en tant que moyenne pondérée selon l'équation suivante:

$$N = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

Avec:

ΣC : est la somme des colonies comptées sur toute les boîtes.

n_1 : Le nombre de boîtes retenues à la 1^{ère} dilution.

n_2 : Le nombre de boîtes retenues à la 2^{ème} dilution.

d : le taux de dilution qui correspond à la 1^{ère} dilution.

Afin de réaliser une représentation graphique moyenne en fonction de la salinité, une moyenne m géométrique qui est l'antialgorithme de la moyenne arithmétique est calculée pour chaque prélèvement (SCHWARTZ, 1992):

$$\bar{m} = e^{\frac{\ln N_1 + \ln N_2 + \ln N_3}{3}}$$

N_1 : nombre de micro-organisme CFU/ml du 1^{er} prélèvement

N_2 : nombre de micro-organisme CFU/ml du 2^{ème} prélèvement.

N_3 : nombre de micro-organisme CFU/ml du 3^{ème} prélèvement.

2.2.2.3. Méthode qualitative

Cette méthode de recherche est utilisée pour le dénombrement des vibrions selon le protocole suivant, la composition de tous les milieux de culture utilisés figurent en annexe.

♦ Enrichissement

180 ml d'eau de mer sont ensemencés dans l'eau peptonée alcaline (EPA), à pH 8.6 à différentes concentrations de sel 0.5%, 1.5%, 3.5% puis incubés à 30°C pendant 18 heures.

♦ Isolement

L'isolement est pratiqué sur milieu sélectif (TCBS), thiosulfate citrate bile saccharose coulé en boites de Petri incubé à 30°C pendant 24 heures (figure 2-3).

2.2.2.4. Méthode d'identification

Les caractères différentiels les plus utiles permettent d'établir une clé simple d'identification des vibrions sont les suivants (VERON et POPPOF, 1990):

2.2.2.4.1. Aspect macroscopique

Chaque boîte de Petri est examiné à l'œil nu puis avec une loupe binoculaire à la recherche de colonies suspectes.

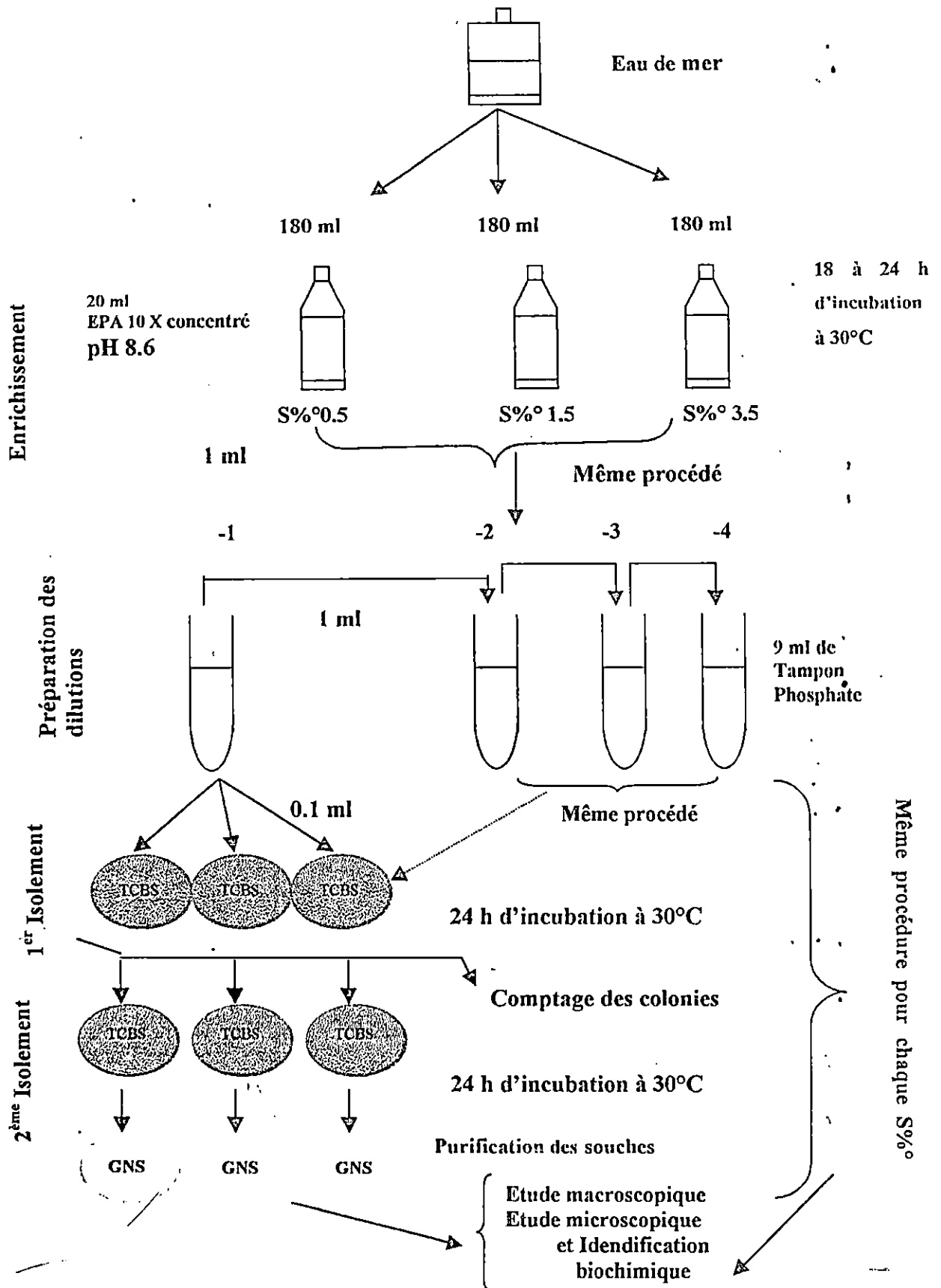


Figure 2.3: Technique de recherche des vibrios marins en fonction de la salinité.

2.2.2.4.2. Aspect microscopique

Une coloration de Gram est effectuée à partir de culture en milieu solide. Elle a permis de trier les souches en fonction de leur morphologie cellulaire et de ne garder que les bacilles ou coccobacilles Gram négative.

2.2.2.4.3. Croissance selon la concentration en NaCl

La concentration en NaCl dans les milieux de culture utilisés pour l'identification biochimique a été ajustée à 1%. La plupart des membres de la famille des *Vibrionaceae* pousse de façon optimum à cette concentration, il existe pourtant des variations en besoins ioniques selon les différentes espèces ainsi pour les *Vibrions fischeri* et *V. costicola* il est nécessaire d'ajouter 3% de NaCl (URDACI-BERTRAN, 1987; MARCHAL *et al*, 1987).

2.2.2.4.4. Croissance à différentes températures

Les souches sontensemencées sur bouillon nutritif liquide salé (BNS) à 1% de NaCl. L'incubation s'effectue au bain marie pendant 48 heures à 42°C et à l'étuve en chaleur sèche pendant 24 heures à 40°C.

La présence d'un trouble rend l'épreuve positive.

2.2.2.4.5. Tests biochimiques (tableau 2.1)

En général les tests de caractérisation biochimique employés pour les Enterobactéries peuvent servir pour les membres de la famille des *Vibrionaceae*. Cependant certains tests sont d'une plus grande utilité pour l'identification de ce genre, à savoir le test oxydase, l'ADH, la réduction des nitrates, la concentration en NaCl et la température, (URDACI-BERTRAN, 1987).

♦ Oxydase

L'oxydase est recherchée à partir de disques imprégnés de diméthyl-paraphénylène-diamine sur lequel on dispose une suspension dense d'une jeune souche de 24 heures. L'apparition d'une coloration violette confirme la présence de l'enzyme.

♦ Réduction nitrate

La réduction nitrate est une caractéristique commune au genre *Vibrio* (OBRÉ *et al*, 1983), après culture sur bouillon nitraté on recherche les nitrites grâce à la réaction de Griess (MARCHAL *et al*, 1987).

♦ Décarboxylation de l'arginine

La recherche de l'arginine dihydrolase (ADH) constitue un critère taxonomique important pour l'identification des espèces de la famille des Vibrionaceae. Une fois ensemencé le tube est recouvert d'huile de vaseline stérile, une coloration jaune après 24 heures d'incubation à 30°C correspond à une épreuve négative et un retour à une couleur violette est considéré comme positive (alcanisation par décarboxylation des acides aminés).

♦ Fermentation des glucides

La fermentation des glucides est recherché dans l'eau peptonée à 1% de NaCl additionnée d'un indicateur de pH, le rouge de phénol.

Les différents sucres testés sont l'arabinose, le fructose, le galactose, le glycerol, le glucose, le maltose, le mannitol, le mannose, le saccharose et le lactose.

Tableau 2.1 : Tests biochimiques pour l'identification des Vibrions.

But	Test	Substrat	Milieu	Mode d'ensemencement	Produit / enzymes	Condition respiratoire	Lecture (coloration)	
							Positive	Négative
Recherche de l'oxydase	Oxydase	Ovalate de N-diméthylparaphénylène diamine		Une colorie sur le disque	Oxydase	Aérobiose	Violet	Rose
	N.R.	Nitrates	Bouillon nitrate	Quelques gouttes d'une suspension microbienne	Réduction en nitrate	Aérobiose	Coloration rouge sang addition de poudre de zinc incolore rose/rouge	
Recherche de nitrate réductase	Glucose	Type respiratoire	Hugh & Lefson	Piqûre centrale	Dégradation oxydative/ fermentation du glucose.	Aérobiose/ anaérobiose	Jaune	Bleu
	Fermentation des glucides	Ara, Fru, Gala, Mal, Rh, Lac, Sac, Gly, Man	Fermentation des glucides à 1% V/V	Quelques gouttes d'une suspension microbienne	Fermentation des sucres	Aérobiose	Jaune	Orange
Métabolisme des glucides	Recherche de l'ONPG hydrolase	Orthonitrophenyle -B-D galactopyranoside	-	Un disque ONPG dans une suspension microbienne	β -Galactosidase	Aérobiose	Jaune	Incolore
	Hydrolyse de l'amidon	Amidon	Gélose amidon	Par touche	Amylase	Aérobiose	Bleu foncé	Inchangé
Etude des dérivés de l'acide pyruvique	Rouge de méthyle RM	Glucose	Clark et Lubs	Quelques gouttes d'une suspension microbienne	Production d'acides mixtes	Aérobiose	Coloration jaune	Coloration rouge
	Réaction de Voges-Proskauer	Glucose	Clark et Lubs	Idem	Production d'acétoïne	Aérobiose	Coloration rouge cerise	Coloration jauné/rose
Métabolisme lipidique	Recherche d'une estérase	Tween 80	Gélose tween 80	Par touches	Estérase	Idem	Halo opaque	Inchangé

Après 24 heures d'incubation à 30°C

Tableau (2.1): Tests biochimiques pour l'identification des Vibrions (suite).

But	Test	Substrat	Milieu	Mode d'ensemencement	Produit / Enzyme	Condition respiratoire	Réactifs ajoutés	Lecture Positive	Lecture négative
Etude de métabolisme des acides	Utilisation du citrate	Citrate	Citrate -Simmons	Stries longitudinales	Citrate-perméasenzymes	Aérobiose	-	Bleu	Vert
Etude du métabolisme protidique	Protéolyse de gélatine	Gélatine	Gélose gélatine	Par touche	Gélatinase	Aérobiose	Quelque gouttes du réactif de Frasier	Pas de précipité blanchâtre	Précipité blanchâtre
Dégradation des acides aminés	Recherche des décarboxylases	L C D	Lysine	Möeller	Quelques gouttes d'une suspension microbienne	anaérobiose		Coloration violette	Coloration jaune
		O D C	Ornithine						
		A D H	Arginine						
	Tryptophane désaminase (TDA)	L-tryptophane	Urée -Indole	Idem	Tryptophane désaminase	Aérobiose	2 gouttes de Perchlorure officinal	Coloration rouge brun (précipité)	Coloration jaune orangée
	Recherche de l'uréase	Urée	Urée -Indole	Idem	Uréase	Idem	-	Coloration rouge	Inchangé jaune
	Production d'indole	Tryptophane	Urée -Indole	Idem	Tryptophanase	Idem	Quelques gouttes de Kovacs	Anneau en surface rouge	Anneau brunâtre
Production d' H ₂ S	KIA	Thiosulfate	Hajna-Kliger	Culot : piqûre centrale	Production d'H ₂ S	Idem	-	Noircissement du culot	Inchangé
Métabolisme lipidique	Recherche d'une estérase	Tween 80	Gélose tween 80	Par touche	Estérase	Idem	-	Halo opaque	Inchangé

2.2.3. Sensibilité aux antibiotiques

Milieu utilisé :

La gélose Mueller-Hinton (annexe 2), coulée en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm. Les géloses sont séchées avant l'emploi. (O M S, 1999).

Inoculum :

A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, on touche à l'aide d'une anse le sommet de 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques.

L'anse est déchargée dans 10 ml d'eau physiologique stérile à 0.9%. La suspension bactérienne est bien homogénéisée, son opacité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland correspondant à une densité optique (D.O) de 0.08 à 0.10 et à une longueur d'onde de 625 nanomètres.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant, de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort. L'inoculum bactérien doit être ensemencé dans les 15 minutes qui suivent sa préparation.

Ensemencement :

Il s'agit de tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne. L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.

On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées. L'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois.

Dans le cas où on ensemence plusieurs boîtes de Pétri, il faut recharger l'écouvillon à chaque fois.

Application des disques d'antibiotiques :

Il ne faut pas mettre plus de 6 disques d'antibiotiques sur une boîte de 90 mm de diamètre. Les disques d'antibiotiques doivent être espacés de 24 mm, centre à centre. La liste des antibiotiques à tester, selon la bactérie isolée, figure dans le tableau (2.2).

L'incubation se fait pendant 18 heures à 35°C pendant 24 heures.

Lecture :

- ♦ Mesurer avec précision les diamètres d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse.
- ♦ Comparer ces résultats aux valeurs critiques dans le tableau de lecture 2.2.
- ♦ Classer la bactérie dans l'une des catégories : Sensible, Intermédiaire, ou Résistante.

Tableau 2.2: Antibiotiques et leur zone d'inhibition (ANONYME, 1993; INSP, 1999).

ANTIBIOTIQUES	SIGLE DU DISQUE	CHARGE DU DISQUE	ZONE D'INHIBITION (mm)		
			Résistante	Intermédiaire	sensible
Bacitracine	B	130µg	-	-	≥15
Chloramphénicol	C	30µg	<12	13-17	≥18
Gentamicine	GM	15µg	<12	13-14	≥15
Néomycine	N	30.UI	<14	15-17	≥18
Polymixine	Pb	50µg	-	-	≥15
Rifampicine	RA	30µg	<13	14-16	≥17
Spiramycine.	SP	100µg	<15	16-22	≥23
Streptomycine	S	10.UI	<12	13-15	≥16
Sulfamides	SSS	200µg	<11	12-16	≥17
Tétracycline	TE	30.UI	<14	15-18	≥19
Composé vibriostatique (0129)	0/129	-	<15	-	>15

2.2.4. Traitement des données

2.2.4.1. Le coefficient de simple appariement (S_{SM} pour simple matching)

C'est le coefficient le plus utilisé en bactériologie, il représente la proportion de caractères assortis sans tenir compte de l'absence ou de la présence de l'attribut (PRESCOTT *et al.*, 1995):

$$S_{SM} = \frac{a+b}{a+b+c+d}$$

Avec:

a: Nombre de caractères indiqués comme positifs pour les deux organismes.

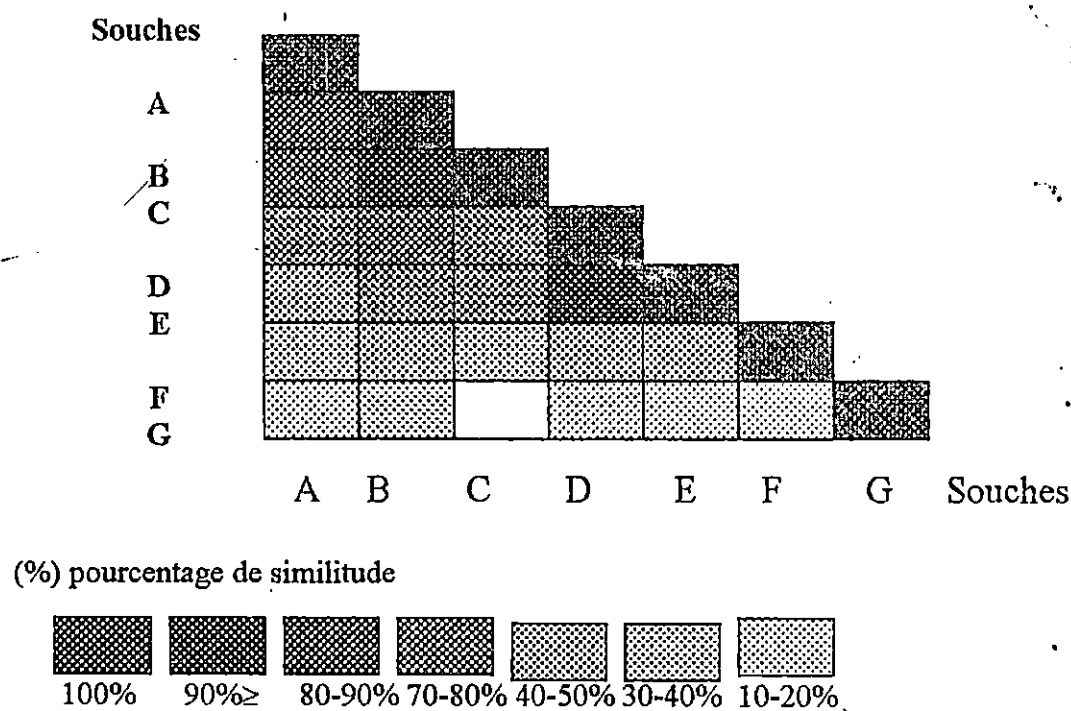
b et c : Nombre de caractères négatifs entre les deux organismes.

d: Nombre de caractères absent chez les deux organismes.

a+b+c+d: Nombre total de caractères comparés.

2.2.4.2. Méthode de classification et représentation graphique :

Les coefficients de simple appariement ou les coefficients d'association, sont arrangés en matrices de similitude. Il s'agit d'une matrice dans laquelle les rangées et les colonnes représentent des organismes et chaque valeur est un coefficient d'association mesurant la similitude entre deux organismes différents; chaque organisme est ainsi comparé à tous les autres du tableau. Les organismes ayant la similitude la plus grande sont groupés ensemble et séparés des organismes dissemblables; de tels groupes d'organismes sont appelés phénons (PRESCOTT *et al*, 1995).



2.2.4.3. La diversité spécifique :

Pour la diversité des espèces retrouvées en fonction de la salinité la formule proposée par LEGENDRE et LEGENDRE, (1984) a été utilisée:

$$D = n / N \times 100$$

Si D est la proportion des espèces mesurées par la diversité relative, n représente le nombre d'espèces détectées dans l'échantion et N est le nombre total d'espèces de la collection.

Chapitre 3.
RESULTATS ET
INTERPRETATION

3. RESULTATS ET INTERPRETATION

3.1. Paramètres physico-chimiques

Les résultats des mesures de température et du potentiel hydrogène effectués sont reportés dans le tableau ci après.

Tableau 3-1 : Résultats des mesures physico-chimiques au niveau de la station étudiée.

Numéro de prélèvement	1	2	3
Date	12 juin 1999	11 septembre 1999	25 septembre 1999
Heure de prélèvement	14H 30	11H	11H
Etat de la mer	Très peu agitée	Calme	Calme
Etat du ciel	Ensoleillé	Ensoleillé	Ensoleillé
Température	19°C	25°C	25°C
pH	8.5	8.5	8.1

3.1.1. La température

Durant toute la période d'échantillonnage trois relevés de température ont été effectués au niveau de la station. Le minimum (19°C) est observé le 12 juin 1999 ; en septembre la température relevée était de 25°C. Les résultats obtenus correspondent aux valeurs saisonnières qui sont habituellement observées.

3.1.2. Le potentiel hydrogène

Les mesures de pH effectuées révèlent une légère régression allant de 8.5 au deux premiers prélèvement et 8.1 le 25 septembre. Ces pH alcalins favorisent le développement et la prolifération des vibrions (URDACI-BERTRAN, 1987).

3.2. Isolement des vibrions en fonction de la salinité

Pour cette étude quantitative et qualitative des vibrions dans l'eau de mer, les salinités suivantes ont été utilisées: 0.5%, 1.5% et 3.5%.

Aux 50 souches isolées des tests d'identifications biochimiques ont été appliqués. Ces souches se révèlent être des représentants du genre *Vibrio*.

3.3. Résultats de l'observation macroscopique

L'observation macroscopique des colonies sur le milieu sélectif TCBS (thiosulfate, citrate, bile, saccharose) permet de sélectionner les colonies susceptibles d'être des vibrions. La totalité des colonies isolées sont de formes rondes, d'aspect lisses, plates ou bombées. Ce sont les caractères non exclusifs des colonies du genre *vibrio*.

Le diamètre permet une approche plus précise quant à l'identification de nos souches, il varie de 2 mm à 5 mm. La couleur enfin apporte une confirmation des espèces isolées (tableau 3.2).

Tableau 3-2 : Aspect macroscopique des espèces de *Vibrio* identifiées (pour tous les prélèvements et les différentes salinités étudiées).

ESPECES*	FORMES	DIAMETRES	COULEURS
<i>V.alginolyticus</i>	Ronde bombée	3-4mm	Jaune
<i>V.cholerae</i>	Ronde lisse plate	2mm	Orange à pourtour jaune clair
<i>V.cincinnatiensis</i>	Ronde lisse	2mm	Vert profond
<i>V.costicola</i>	Ronde	2-3mm	Vert translucide
<i>V.fischeri</i>	Ronde lisse	4-5mm	Jaune orange
<i>V.fluvialis I</i>	Ronde plate lisse	2-3mm	Jaune à pourtour opaque
<i>V.hollisae</i>	Ronde bombée	2-3mm	Jaune clair centre orange
<i>V.logei</i>	Ronde légèrement bombée	2mm	Orange légèrement translucide
<i>V.marinus</i>	Ronde irrégulière	3-4mm	Vert foncé à pourtour opaque
<i>V.mediterrannei</i>	Ronde lisse	2-3mm	Vert à pourtour opaque
<i>V.mimicus</i>	Ronde lisse	2mm	Vert à pourtour translucide
<i>V.ordalii</i>	Ronde bombée	3mm	Verte à pourtour sombre
<i>V.parahaemolyticus</i>	Ronde régulière	3-4mm	Verte sombre contour clair
<i>V.pelagius I</i>	Ronde	3mm	Orange
<i>V.proteolyticus</i>	Ronde bombée	2mm	Vert à pourtour légèrement translucide
<i>V.splendidus I</i>	Ronde bombée	3-4mm	Vert à pourtour translucide
<i>V.vulnificus</i>	Ronde bombée	2-3mm	Jaune légèrement translucide

*: Espèces citées après identification biochimique.

Les colonies vertes ne fermentent pas le saccharose, c'est le cas pour le *Vibrio parahemolyticus*, *Vibrion mimicus* et *Vibrion ordalii* (BRUNI et GRISAFI, 1986 ; URDACI-BERTRAN, 1987 ; MEYER *et al.*, 1995).

Vibrio cholerae, *V. alginolyticus*, *V. fluvialis I* et *V. mediterrannei* dégradent le saccharose (saccharose positif) et sont de couleur jaune, couleur résultant du virage du bleu de thymol et du bleu de bromothymol lors de l'acidification du milieu TCBS (FURNISSI et DONOVAN, 1976 ; BRUNI *et al.*, 1986 ; EUZEBY, 1999).

3.4. Résultats de l'observation microscopique

La coloration de Gram nous a permis de distinguer les bâtonnets Gram négatifs qui constituent le caractère majeur du genre *Vibrio*. Les bacilles Gram positifs et les formes cocci ne sont pas retenus (tableau 3.3).

Tableau 3-3 : Aspect microscopique des espèces de *Vibrio* identifiées (pour tous les prélèvements et les différentes salinités étudiées).

ESPECES*	GRAM ^o	FORMES	MODE DE GROUPEMENT
<i>V. alginolyticus</i>	-	Coccobacilles longs	Isolés
<i>V. cholerae</i>	-	Bacilles courts et incurvés	Eparpillés et en amas
<i>V. cincinnatiensis</i>	-	coccobacilles	Eparpillés
<i>V. costicola</i>	-	Bacilles droits	Essentiellement isolés
<i>V. fischeri</i>	-	Bâtonnet court et bacilles incurvés	Eparpillés et en amas
<i>V. fluvialis I</i>	-	Bâtonnets courts et bacilles incurvés	Eparpillés et en amas
<i>V. hollisae</i>	-	Petit bacilles	Eparpillés
<i>V. logei</i>	-	Petits bacilles droits	Isolés
<i>V. marinus</i>	-	Bacilles incurvés	En amas
<i>V. mediterranei</i>	-	bacilles	Essentiellement isolés
<i>V. mimicus</i>	-	Coco bacilles droits	Essentiellement isolés
<i>V. ordalii</i>	-	Bacilles en virgules	Isolés
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	Bacilles incurvés	En amas et isolés
<i>V. pelagius I</i>	-	Petits bacilles	Isolés
<i>V. proteolyticus</i>	-	Coccobacilles	En chaînettes
<i>V. splendidus I</i>	-	Bacilles incurvés	En amas
<i>V. vulnificus</i>	-	Bacilles droits et incurvés	Essentiellement isolés

* : Espèces citées après identification biochimique ; ^o : Grossissement x 40 et x 100 plus immersion.

Les frottis obtenus après coloration de Gram ont permis également d'observer le mode de groupement (amas, chaînettes ou isolées) et les formes des cellules bactériennes (tableau 3-3). La plus grande partie des frottis observés révèlent la présence de bâtonnets droits, de bacilles incurvés pour la plupart et de quelques bacilles longs, ce qui caractérise le genre *Vibrio* (PRESCOTT *et al.*, 1995; FLANDROIS, 1997).

Certaines souches se présentent sous forme de coccobacille. Ces formes coccobacillaires ou coccobacillaires sont dues au stress de la culture (URDADI-BERTRAN, 1987). Elles sont considérées comme atypiques par PILET *et al.*, (1981).

3.5. Résultats des tests biochimiques

Trente deux (32) tests biochimiques ont permis une identification des espèces isolées (tableau 3-4). Les résultats bruts de l'identification biochimique de toutes les espèces isolées à partir des différents prélèvements et pour toutes les salinités testées (0.5, 1.5, 3.5 %) figurent en annexes 4.

La détermination du genre et de l'espèce a été possible en se référant aux travaux de URDACI-BERTRAN, (1987) et BAUMANN *et al.*, (1993), tableau 3-4. Les caractéristiques physiologiques et biochimiques des souches isolées dans cette étude sont reportés dans le tableau 3-4 bis.

Les 50 souches récoltées dans l'eau de mer de la plage Ouest de Sidi-Frédj, sont réparties en 17 espèces de vibrions. Toutes sont oxydase et nitrate réductase positive et donc aucune n'appartient aux espèces *V. metschnikovii* et *V. gazogenes*. Chez les bactéries à métabolisme fermentatif comme la famille des Vibrionaceae, l'arginine dihydrolase (ADH) est un caractère de différenciation important. Ce test nous a permis de distinguer quatre espèces présentant un ADH positif, il s'agit de *Vibrio costicola*, *Vibrio fluvialis*, *V. proteolyticus* et *V. splendidus*.

La croissance ou non en milieu dépourvu de sel (NaCl) est considérée comme un critère de séparation des plus classiques. Il a été d'une grande importance quant à la distinction des vibrions halotolérants des halophiles. Dans les tests biochimiques effectués cinq souches isolées ont poussé à la concentration saline de 0% (tableau 3-4 bis). Il s'agit de *V. cholerae*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. ordalii* et *V. vulnificus*. Il est à noter qu'un meilleur développement des espèces identifiées est observé aux salinités de 5% et 7%.

L'absence d'acétoïne (VP⁻) est observé pour la majorité des espèces à l'exception de *V. costicola*, *V. alginolyticus*, et *V. proteolyticus*. Hormis les 4 espèces ADH⁺ et les 3 espèces VP⁻ la majorité des vibrions isolés se cultivent à une température de 30°C. La totalité sont glucose positif à l'exception du *V. parahaemolyticus*.

Le cas de *V. mimicus* est particulier ; en effet jusqu'en 1981 il était considéré comme le biotype 5 de *V. cholerae*. Depuis DESMARCHELIER et REICHLER, (1984 *in* URDACI-BERTRAN, 1987), considère les souches présentant à la fois une réaction négative pour VP, saccharose- et amylase+ sont considérés appartenant à l'espèce *V. mimicus*. C'est la souche identifiée dans notre étude.

Tableau 3-4 : Caractéristiques biochimiques des vibrons d'après URDACL-BERTRAN, (1987); BAUMANN et al, (1993).

Espèces CB*	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae non-O1</i>	<i>V. costicola</i>	<i>V. fisheri</i>	<i>V. parvulus I</i>	<i>V. holisuae</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. marinus</i>	<i>V. mediterranei</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. ordalii</i>	<i>V. parvulus I</i>	<i>V. pelagius I</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. splendidus I</i>	<i>V. vulnificus</i>
Oxydase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Red-ult	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gez-élu	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esrulin	V	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADH	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	V	V	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ODC	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
VP	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Indole	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Chitine	V	V	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urése	-	-	-	-	V	V	V	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*
ONPG	-	V	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Géardh	+	+	+	-	V	V	V	V	V	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	V	V	+	-	V	V	V	V	V	-	-	-	-	-	-	-	-
30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42°C	V	V	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-
0,9% NaCl	-	V	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5,9% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7,9% NaCl	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10,9% NaCl	V	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ARA	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GALYA	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLY	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MANI	+	V	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MANO	+	V	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
REAM	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SACC	+	V	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	-	V	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*: CB : Caractères biochimiques

3.6. Résultats de l'action des antibiotiques

Le diamètre et la présence d'une zone d'inhibition ou son absence permet de distinguer les souches résistantes, sensibles ou intermédiaires (I.N.S.P, 1999). L'origine, le spectre d'activité et le mode d'action des antibiotiques figurent en annexe.5

La totalité des souches est sensible au composé vibriostatique 0/129 (phosphate de 2.4-diamino, 6,7-diisopropyl-ptéridine), c'est une caractéristique du genre *Vibrio*.

Sur la totalité des espèces étudiées, plus de la moitié est sensible aux antibiotiques testés (tableau3-7). En effet, il a été observé que la streptomycine, les sulfamides forts, la gentamycine, la tetracycline et le chloramphénicol sont parmi les antibiotiques les plus actifs sur les germes étudiés. Par ailleurs, les spiramicynes, rifampicines et les polymyxines sont moins efficaces puisque l'on a relevés que pour *V.alginolyticus*, *V.fluvialis I*, *V.logei*, *V.ordalii*, *V.splendidus I* et *V.vulnificus*, présentent une résistance partielle à ces antibiotiques.

Tableau 3-7 : Résultats de l'antibiogramme

ATB. Espèces	B	C	GM	N	PB	RA	SP	S	SSS	TE	0129
<i>V.alginolyticus</i>	-	S ₂₀	S ₂₆	S ₂₄	I ₁₅	S ₂₈	I ₂₆	S ₂₄	S ₂₄	S ₃₀	S
<i>V.cholerae</i>	-	S ₃₂	S ₂₈	S ₂₃	S ₁₆	S ₂₇	S ₂₅	-	S ₂₅	S ₃₁	S
<i>V.cincinnatiensis</i>	-	S ₃₂	S ₂₄	S ₂₂	R ₁₀	S ₂₈	S ₁₆	S ₂₀	S ₂₀	S ₂₄	S
<i>V.costicola</i>	R	S ₃₆	S ₂₄	S ₂₄	S ₁₆	S ₃₀	I ₁₇	S ₂₀	S ₂₈	S ₃₀	-
<i>V.fisheri</i>	-	S ₂₈	S ₂₆	S ₂₅	I ₁₅	S ₂₅	I ₁₈	S ₂₁	S ₂₆	S ₂₆	S
<i>V.fluvialis I</i>	-	-	S ₁₉	I ₁₅	-	R ₁₀	-	-	S ₁₇	-	-
<i>V.hollisae</i>	-	S ₃₀	S ₂₀	I ₁₇	R ₁₂	S ₂₂	I ₂₂	-	I ₁₃	-	S
<i>V.logei</i>	-	S ₃₈	-	S ₂₀	R ₁₄	S ₂₄	I ₂₁	S ₂₂	S ₂₄	S ₃₂	S
<i>V.marinus</i>	R	S ₁₂	S ₂₆	S ₂₅	S ₁₈	S ₂₇	I ₂₀	S ₂₉	S ₃₂	S ₃₀	S
<i>V.mediterranei</i>	-	S ₃₉	S ₂₉	S ₂₅	S ₁₆	S ₂₃	I ₂₀	S ₂₁	S ₂₆	S ₂₇	S
<i>V.mimicus</i>	R	S ₃₀	S ₂₆	S ₂₄	S ₂₄	S ₂₃	I ₂₁	S ₁₆	S ₂₉	S ₂₉	-
<i>V.ordalii</i>	-	-	S ₂₁	S ₁₈	-	R ₁₃	-	-	S ₂₈	-	-
<i>V.parahaemolyticus</i>	-	S ₂₂	-	S ₃₀	S ₂₀	S ₄₄	I ₂₀	S ₃₀	S ₃₄	S ₃₆	S
<i>V.pelagius I</i>	R	S ₄₀	S ₃₆	R ₁₄	S ₂₂	S ₃₆	S ₃₂	S ₁₈	S ₃₄	S ₃₆	S
<i>V.proteolyticus</i>	-	S ₃₀	S ₂₉	S ₂₂	R ₁₄	S ₃₀	I ₂₀	I ₁₄	S ₃₀	S ₂₄	S
<i>V.splendidus I</i>	-	-	S ₂₃	I ₁₆	R ₁₃	I ₁₅	-	-	S ₁₈	S ₃₀	-
<i>V.vulnificus</i>	--	R ₁₂	S ₂₂	I ₁₆	R ₁₄	R ₁₃	-	-	S ₂₁	S ₂₇	S

B : Bacitracine 10µg
 GM : Gentamicine 10µg
 N : Néomycine 30µg
 PB : Polymyxine 300µg
 RA : Rifampicine 30µg
 CL : Chloramphénicol
 SP : Spiramicyne 10µg
 S : Streptomycine 10µg
 SSS : Sulfamides forts 200µg
 TE : Tétracycline 30µg
 0129 : Composé vibriostatique
 S : Sensible
 R : Résistant
 I : Intermédiaire

La totalité des souches sont résistantes à la bacitracine, ceci confirme l'appartenance des espèces isolées aux Gram négatifs, un des caractères des vibrions (BRUNI *et al.*, 1986 ; COUTURE, 1990).

3.7. Evaluation de l'affinité entre les souches

L'identification et la détermination biochimique des espèces de *Vibrio* dans l'environnement présente certaines difficultés en raison de leur grande diversité (ALSINA et BLANCH, 1994).

Du fait de la variabilité des caractères biochimiques tantôt positifs tantôt négatifs, une détermination efficace des espèces reste délicate. Les souches sont alors soumises au coefficient de simple matching ou coefficient de simple appariement Ssm (PRESCOTT *et al.*, 1995), afin de déterminer l'affinité ou le degré de similitude (tableau 3-6) entre les caractères culturels des espèces isolées et celles retrouvées dans la bibliographie (URDADI-BERTRAN, 1987 ; BAUMANN *et al.*, 1993).

Après analyse des caractères biochimiques, on calcule pour chaque paire d'espèces du genre *Vibrio* un coefficient d'association, fonction qui mesure l'accord entre les caractères de notre espèces et celle de la littérature. La matrice de similitude (figure 3.1) met en évidence le coefficient d'association mesurant la similitude entre espèces; chaque espèce est ainsi comparée à toutes les autres du tableau 3.1.

Les résultats obtenus montrent que le degré de similitude entre les espèces étudiées s'étend de 60 % (*V. marinus*) à une similitude totale (100 % pour *V. cholerae*).

Selon PRESCOTT *et al.*, (1995), les souches ayant un indice de similitude supérieur ou égale à 80% sont considérées comme faisant partie de la même espèce.

Sur 17 espèces identifiées, 9 ont un indice de similitude supérieure à 80%. Le reste des espèces présente un Ssm inférieur à 80%, cela s'explique probablement par la variabilité de certains caractères biochimiques.

Il est important de relever qu'en ce qui concerne *V. marinus* (Ssm=60%), 29 caractères biochimiques ont été comparés contre 32 tests pour la majorité des espèces étudiées. En effet, sur le tableau comparatif utilisé pour le calcul de similitude (tableau 3-6) les tests suivants : (ONPG, citrate et urée) ne figurent pas.

La difficulté d'identification est encore accrue par l'absence de classification employant les mêmes critères de tests pour l'ensemble des espèces. Chaque auteur propose son tableau de détermination (URDACI-BERTRAN, 1987).

Par ailleurs, il a été observé qu'il existe un certain degré de similitude entre des espèces différentes et ceci est probablement dû à l'insuffisance du nombre des caractères testés. Selon MEYER *et al.*, (1995) et PRESCOTT *et al.*, (1995), pour une classification précise et fiable, il faut comparer au moins 50 caractères et au mieux plus de 100. Il est aussi préférable d'inclure de nombreux types de données.

Toutefois, il ne faut pas négliger que les pourcentages de similitudes observés entre les espèces de la bibliographie et les espèces déterminées confirme dans une certaine mesure leur appartenance au genre, d'autant plus que lors des déterminations nous nous sommes basés sur les caractères biochimiques essentiels et nous avons utilisé pour l'isolement un milieu sélectif.

Tableau 3-6 : Pourcentages de similitudes entre les espèces de *Vibrio* identifiées et les espèces de la bibliographie par le calcul du coefficient de simple appartenance (S_{mi}).

Esp Vibrio Résultats Personnels	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. costicola</i>	<i>V. fischeri</i>	<i>V. fluvialis I</i>	<i>V. holtsiae</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. marinus</i>	<i>V. mediterranei</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. ordalii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. pelagius I</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. splendidus I</i>	<i>V. vulnificus</i>
<i>V. alginolyticus</i>	97	97	66	72	56	84	59	69	59	78	65	90	78	62	72	90	75
<i>V. cholerae</i>	87	100	75	69	72	81	75	78	65	69	75	87	87	72	75	78	78
<i>V. cincinnatiensis</i>	87	94	81	78	59	84	81	75	65	69	78	90	87	20	69	78	62
<i>V. costicola</i>	91	81	59	81	72	84	66	71	62	69	56	90	81	75	69	79	69
<i>V. fischeri</i>	81	87	69	75	75	81	78	87	81	75	69	84	84	66	66	81	56
<i>V. fluvialis I</i>	62	81	62	66	72	62	66	66	59	56	62	81	84	62	53	90	75
<i>V. holtsiae</i>	75	84	72	69	66	75	84	71	62	56	71	84	94	78	66	75	75
<i>V. logei</i>	75	91	75	69	56	72	72	81	69	71	62	84	84	75	66	87	81
<i>V. marinus</i>	75	87	81	66	78	69	62	81	68	65	69	88	91	87	66	87	81
<i>V. mediterranei</i>	81	87	66	72	75	75	72	78	60	69	69	87	91	78	69	84	69
<i>V. mimicus</i>	84	100	75	72	81	78	78	90	69	71	71	90	94	75	75	78	78
<i>V. ordalii</i>	72	94	66	62	62	62	56	75	65	71	75	78	69	44	50	81	71
<i>V. parahaemolyticus</i>	81	87	66	69	66	75	78	69	59	65	75	88	84	78	75	75	78
<i>V. pelagius I</i>	75	87	72	75	69	69	72	75	69	69	71	87	84	81	53	69	72
<i>V. proteolyticus</i>	87	87	66	75	69	78	56	59	59	75	65	87	81	78	66	81	72
<i>V. splendidus I</i>	78	84	72	75	75	81	62	75	59	69	62	84	87	66	87	87	75
<i>V. vulnificus</i>	81	91	62	66	66	81	56	69	65	71	75	81	97	75	81	81	78

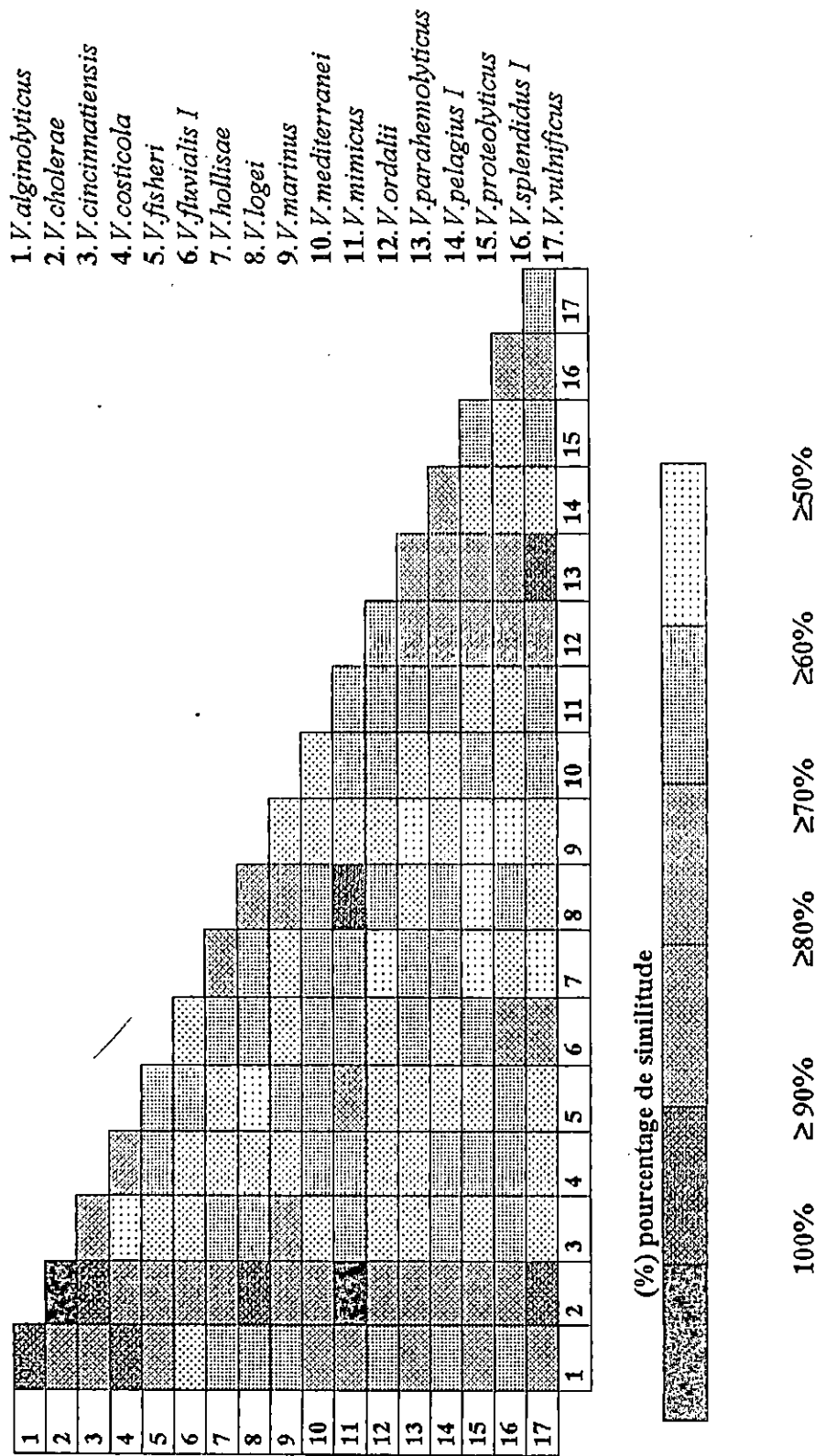


Figure 3.1 : Représentation graphique du coefficient de simple appariement.

3.8. Résultats et interprétation de l'analyse bactériologique de l'eau de mer

3.8.1. L'aspect quantitatif

L'estimation de l'importance quantitative des populations bactériennes présentes dans les milieux naturels (eau et sédiment marin) par l'intermédiaire des cultures en milieu solide permet la numération des seuls germes viables à l'exclusion des cadavres bactériens (BIANCHI et BIANCHI, 1971).

Sur gélose sélective TCBS (thiosulfate, citrate, bile, saccharose) les germes présents dans l'inoculum vont se développer en colonies bactériennes faciles à dénombrer.

Cette étude permet d'évaluer d'une part le nombre des vibrions présents et autres germes dans la masse d'eau et d'autre part de déterminer la salinité optimale pour la croissance du plus grand nombre de colonies.

Les premières dilutions n'ont pu être dénombrer, les trois boites présentées des cultures en nappes.

Les résultats bruts du nombre de colonies formant unité par millilitre d'eau de mer (CFU/ml), pour chaque prélèvement et pour chaque salinité étudiée (EPA enrichi en sel) sont reportés dans le tableau en annexe 1.

La moyenne géométrique des colonies formant unité par millilitre a été calculée pour les trois prélèvements et pour chaque salinité testée et figure dans le tableau suivant :

Tableau 3-7 : Le nombre de colonies formant unité par millilitre (CFU/ml) pour les trois prélèvements effectués en fonction de la salinité correspondant.

Prélèvements Salinité	Premier (CFU/ml)	Deuxième (CFU/ml)	Troisième (CFU/ml)	Moyenne (CFU/ml)
0.5%	2000	1200	4476	2205.76
1.5%	828	2	8455	240.65
3.5%	2488	2	2452	229.67

L'analyse quantitative des germes en fonction des salinités après normalisation des données vue la distribution agrégative des bactéries dans le milieu marin, permet de voir que les histogrammes obtenus présentent des allures fluctuantes (figure 3.2).

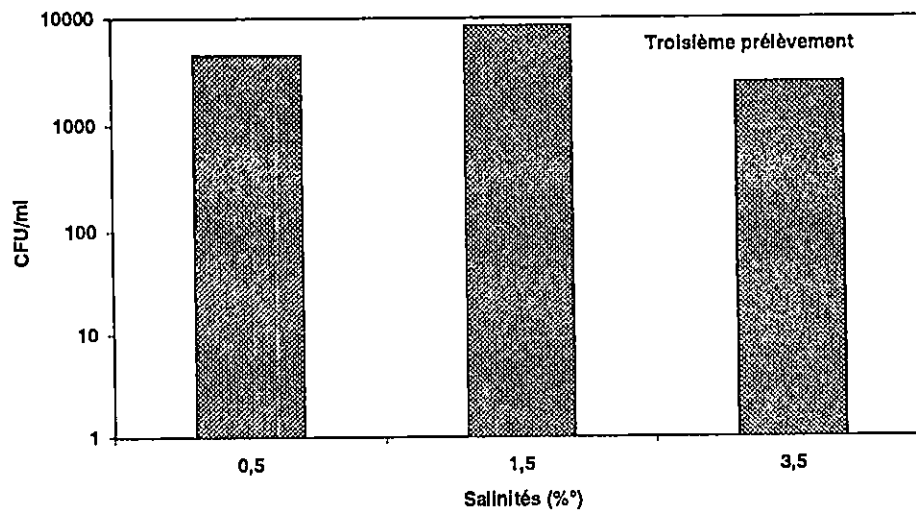
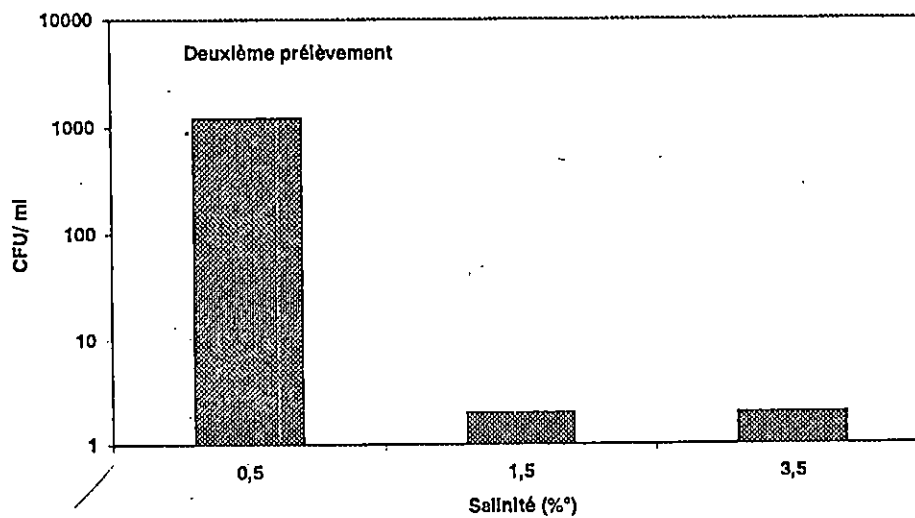
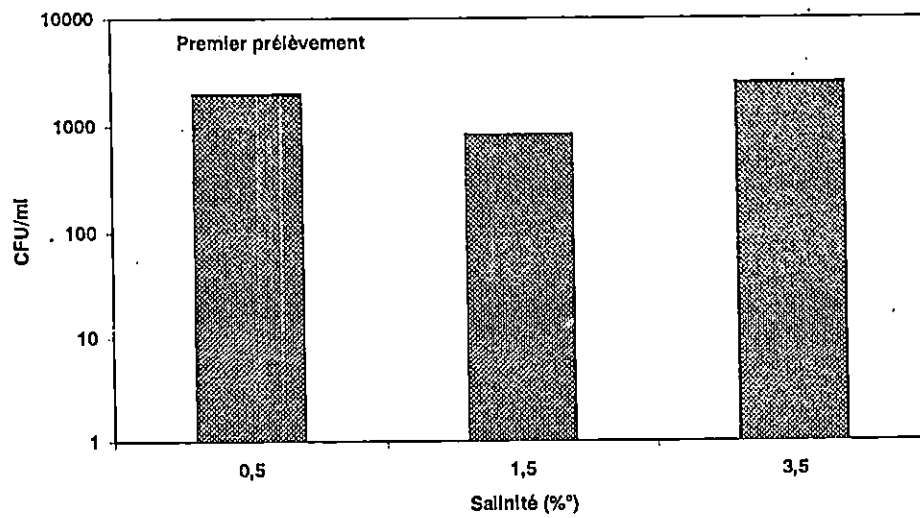


Figure 3.2 : Représentation graphique de l'analyse quantitative des germes rencontrés dans l' eau de mer de la plage Ouest de Sidi-Fredj pour les trois prélèvements.

On remarque que pour le premier prélèvement la concentration saline la plus favorable à la multiplication bactérienne est de 3.5‰. Ceci n'est pas le cas pour le deuxième prélèvement où l'on enregistre une prolifération bactérienne importante à la concentration de 0.5‰.

Néanmoins, la représentation graphique des valeurs moyennes (figure 3.3) permet de mieux voir la concentration saline la plus favorable à la multiplication des vibrions à savoir une EPA enrichie à 0.5‰.

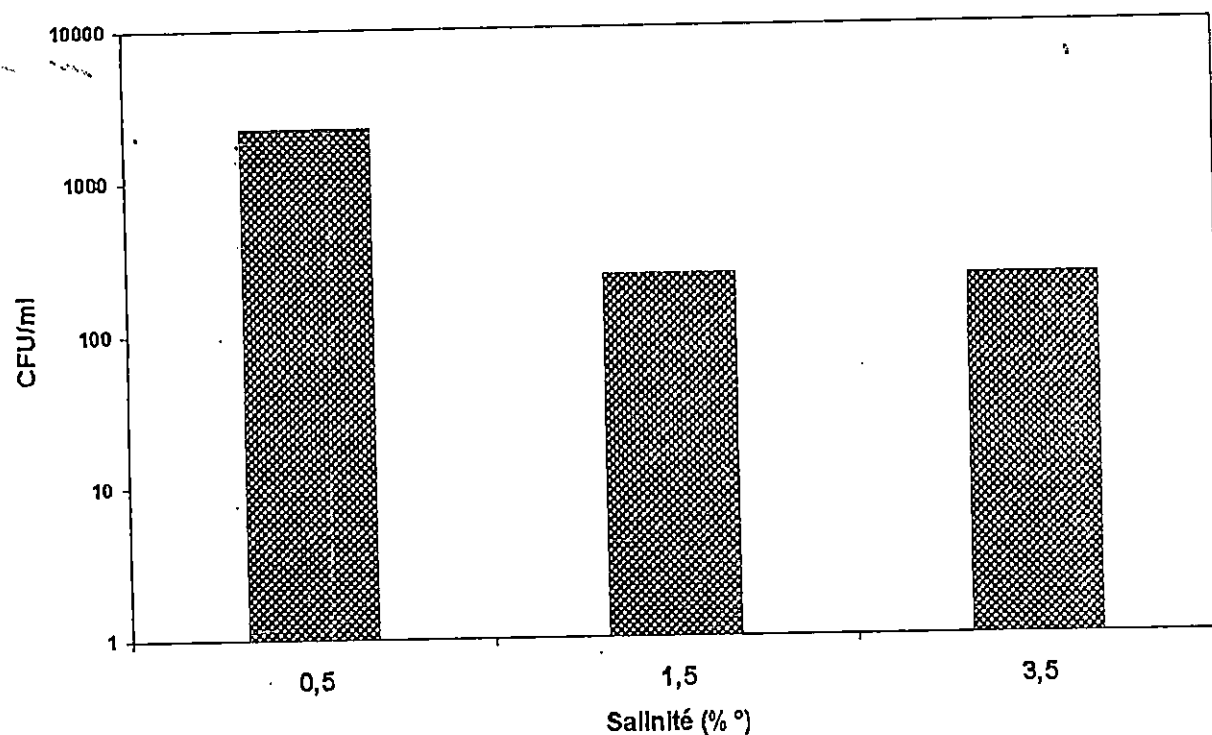


Figure 3.3: Représentation graphique de l'analyse quantitative moyenne des germes (CFU/ml) rencontrés dans l'eau de mer de la plage Ouest de Sidi-Fredj en fonction des salinités.

Les espèces du genre *Vibrio* requièrent des concentrations variables en Na^+ pour leur croissance optimale. Cependant, un milieu de culture unique peut convenir à la croissance de la totalité des souches (URDADI-BERTRAN, 1987). Un pH alcalin (8.6) et une concentration saline minimale requise pour une croissance optimale varie de 5 à 15 millimoles (mM).

Il est hasardeux de faire des affirmations à partir des résultats obtenus, car le nombre de prélèvement est insuffisant. De plus, malgré l'utilisation de milieu sélectif, de 3 boîtes pour chaque dilution et de plusieurs dilutions pour chaque prélèvement effectué, parfois les bactéries évoluent vers un état viable et non cultivable par les méthodes de cultures traditionnelles (XU *et al.*, 1982).

3.8.2. L'aspect qualitatif

L'étude qualitative a permis de mettre en évidence pour chaque prélèvement, les espèces de *Vibrio* isolées à partir de chaque salinité étudiée (tableau 3-8).

- *Vibrio alginolyticus*

Sur les 50 souches isolées, 4 souches ont été identifiées comme étant *V. alginolyticus*. Sa présence est mise en évidence au premier prélèvement où la température de l'eau de mer est de 19°C. Selon BRUNI *et al.*, (1986) cette espèce croit à des températures élevées durant les mois d'été et d'automne. Par contre, MARCHAND, (1986) émet l'hypothèse qu'aucune influence de la température sur cette espèce ne peut être notée.

L'isolement de *V. alginolyticus* s'est effectué aux concentrations salines de 0.5 et 3.5%. Ceci est confirmé par les travaux de BRISOU, (1980) et MARCHAND, (1986) qui stipulent que *V. alginolyticus* en plus des grandes similitudes qu'il présente avec *V. parahaemolyticus* est caractérisé par une halophilie très marquée et pousse dans des milieux supplémentés par 0.5 à 11% de NaCl.

- *Vibrio cholerae*

Le *V. cholerae* est une espèce pathogène pour l'homme. Ce *Vibrio* peut être aussi apportée dans les eaux côtières par les rejets urbains (POGGI, 1990). La présence de cette espèce dans nos isolats est probablement due aux déversements d'eaux usées au niveau de la plage Ouest et sa forte fréquentation en été par les estivants.

Malgré le fait que *V. cholerae* se rencontre surtout dans les eaux, on le trouve également dans les sédiments marins. Sa présence dans cette matrice est due à sa richesse en matière organique qui apporte des composés chimiques (osmoprotecteurs) contribuant à la tolérance en sel de cette bactérie (GUILLAUD, 1994 ; CORMIER et MARTIN, 1998).

Cette espèce pousse dans des concentrations en sel de 2 à 8%, l'optimum se situe entre 1 et 2.5% (URDACI-BERTRAN, 1987). Ceci rejoint les résultats obtenus dans cette étude, à savoir une culture positive à 0.5 et 3.5% de NaCl (tableau 3-8). Sa présence dans l'eau permet de classer la plage Ouest comme une plage de mauvaise qualité microbiologique en se référant

◦ *Vibrio costicola*

C'est une espèce à la fois halophile obligatoire et modérée (BRISOU, 1980). Deux souches sont isolées dans nos prélèvements à la salinité de 0.5%, une seule à 3.5%. Les températures respectives sont de 19°C et 25°C. *V.costicola* est rencontré aussi bien dans les eaux de surface, les eaux cotières que les eaux de profondeur moyenne. Toutes ces observations peuvent s'expliquer par son caractère ubiquiste.

Tableau 3-8: Croissance des espèces de vibrion en fonction de la salinité.

Espèces \ Salinité (%)	Prélèvement 1			Prélèvement 2			Prélèvement 3			Nombre de Souches isolées
	0.5	1.5	3.5	0.5	1.5	3.5	0.5	1.5	3.5	
<i>V.alginolyticus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	4
<i>V.cholerae</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	-	4
<i>V.cincinnatiensis</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>V.costicola</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	-	3
<i>V.fisheri</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1
<i>V.fluvialis I</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>V.holisae</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>V.logei</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	-	3
<i>V.marinus</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>V.mediterranei</i>	-	-	-	+	-	-	-	-	-	2
<i>V.mimicus</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>V.ordalii</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1
<i>V.parahaemolyticus</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	2
<i>V.pelagius I</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	2
<i>V.proteolyticus</i>	-	-	+	-	-	-	-	+	-	4
<i>V.splendidus I</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-	2
<i>V.vulnificus</i>	-	+	-	-	-	+	-	-	-	3

- *Vibrio fischeri*

Une seule espèce a été isolée du milieu de culture enrichi à 3.5% de NaCl lors du deuxième prélèvement. Lors de ce prélèvement la température de l'eau de mer était de 25°C. Ce vibron est fréquemment isolé de l'eau de mer, il est également trouvé dans les sédiments marins (MAUGERI et BRUNI, 1991). La présence des vibrions halophiles dans les milieux côtiers est constante, dès que la température atteint le seuil de 19°C, ces bactéries passent du sédiment à l'eau de mer (tableau 3-8)

- *Vibrio fluvialis I*

Bien que cette espèce soit considérée dans la bibliographie comme une halophile modérée (MAUGERI et BRUNI, 1990), nous avons isolé deux souches dans les milieux de cultures enrichi à 0.5% de sel. Cette halotolérance a été également observé chez certaines souches identifiées par URDACI-BERTRAN, (1987).

- *Vibrio vulnificus*

Cette espèce a été trouvée aux salinités de 1.5% et 3.5%. Selon TAMPLIN *et al.*, (1996), cette espèce atteint des valeurs maximales de prolifération entre 5.8 à 8.8 et 8.3 % de NaCl avec une température de l'eau de mer variant de 13°C à 22°C. C'est le cas de notre premier prélèvement où la température de l'eau était de 19°C, pour le deuxième prélèvement on a enregistré 25°C.

VERON et POPOFF, (1990), considère *V. vulnificus* comme un halophile modéré, l'intervalle déterminé est alors de 1.5 à 3.5% de sel. Ils le classent à la fois dans la catégorie des espèces médicales et celle des espèces marines.

- Autres espèces de vibrions

Le *V. cincinnatiensis*, le *V. hollisae*, le *V. logei*, le *V. ordalii*, le *V. marinus*, et le *V. pelagius I* sont les espèces les moins fréquentes dans nos prélèvements (tableau 3-8).

Ces espèces fréquemment identifiées dans l'eau de mer sont généralement isolées dans le sédiment.

L'explication résiderait dans les températures élevées enregistrées, durant la période de prélèvement, en effet selon MAUGERI et BRUNI, (1991), dès que la température atteint le seuil de 19°C, ces bactéries migrent du sédiment à l'eau de mer. Ainsi on remarque qu'une grande

partie d'espèces isolées préfèrent les sédiments au détriment de la matrice eau. Ce phénomène s'expliquerait par la richesse du sédiment en matière organique.

3.9. Diversité spécifique

Pour cette étude trois salinités ont été testées afin d'établir la concentration donnant la meilleure diversité de vibrions. Le pH est ajusté dans le milieu d'enrichissement (EPA) à 8.6 et cela pour les trois salinités étudiées, à savoir 0.5, 1.5, 3.5‰.

La diversité spécifique a été calculée selon la présence ou l'absence des différentes espèces isolées comparativement à la totalité des espèces et cela pour chaque salinité (tableau suivant).

Tableau 3-9: Croissance des espèces de vibron en fonction de la salinité.

Espèces	Salinité (%)			Nombre de souches
	0.5	1.5	3.5	
<i>V.alginolyticus</i>	+	-	+	4
<i>V.cholerae</i>	+	-	+	4
<i>V.cincinnatiensis</i>	-	-	+	1
<i>V.costicola</i>	+	-	+	3
<i>V.fisheri</i>	-	-	+	1
<i>V.fluvialis I</i>	+	-	-	2
<i>V.holisae</i>	+	-	-	2
<i>V.logei</i>	+	+	-	3
<i>V.marinus</i>	+	-	-	1
<i>V.mediterranei</i>	+	-	-	2
<i>V.mimicus</i>	+	+	-	2
<i>V.ordalii</i>	-	-	+	1
<i>V.parahaemolyticus</i>	+	-	-	2
<i>V.pelagius I</i>	-	+	+	2
<i>V.proteolyticus</i>	-	+	+	4
<i>V.splendidus I</i>	-	+	-	2
<i>V.vulnificus</i>	-	+	+	3
Diversité spécifique (%)	59	29	53	

La représentation graphique de la diversité spécifique moyenne en fonction des concentrations salines (figure 3.4) a permis de mettre en évidence l'halotolérance des espèces

isolées. Sur les trois salinités testées le meilleur développement est obtenu à la concentration saline de 0.5‰. La diversité spécifique est de 59%, ce pourcentage regroupe les espèces de vibrions les moins exigeants en sel, il s'agit de *V.cholerae*, *V.fluvialis*, *V.hollisae*, *V.alginolyticus* et *V.paraehemolyticus* (tableau 3-9). Cette dernière espèce présente une halophilie modérée mais obligatoire, ne se cultive pas sur des milieux de salinités inférieures à 0.5% (BEUCHAT, 1974 ; PILET, 1981). Selon GELINAS, (1995) *V.paraehemolyticus* tolère jusqu'à 8 - 10% de sel, sa croissance s'arrête pour une teneur inférieure à 0.05% (MARCHAND, 1984). Cette espèce est fréquente en Méditerranée (OMS/PNUE, 1995).

Le *V.costicola* est une espèce euryhaline elle est retrouvée aux salinités de 0.5 et 3.5 ‰. Cette espèce supporte de 2 à 23% de NaCl et se cultive entre 6 et 12% (BRISOU, 1980).

En outre, une diversité spécifique de 53% représente la concentration saline de 3.5%. *V.alginolyticus* se retrouve à cette concentration saline, cette espèce a une croissance rapide à 3.5% (BRISOU, 1980).

Le *V.cincinnatiensis* et le *V.costicola* se retrouvent également à cette concentration saline. Le *V.costicola* est considéré comme une espèce halophile obligatoire et pousse dans des milieux enrichis de 2.3% de sel (BRISOU, 1980). Ce qui confirme dans une moindre mesure les résultats obtenus.

Enfin, la salinité de 1.5% semble représenté la diversité la plus faible (tableau 3-9). Il est important de préciser que la diversité des espèces est généralement plus grande lorsque la température du milieu aquatique ne dépasse pas 12°C (URDADI-BERTRAN, 1987). La température moyenne durant les mois de prélèvement est de 22.66°C. Il aurait été donc souhaitable d'effectuer des prélèvements en période hivernale.

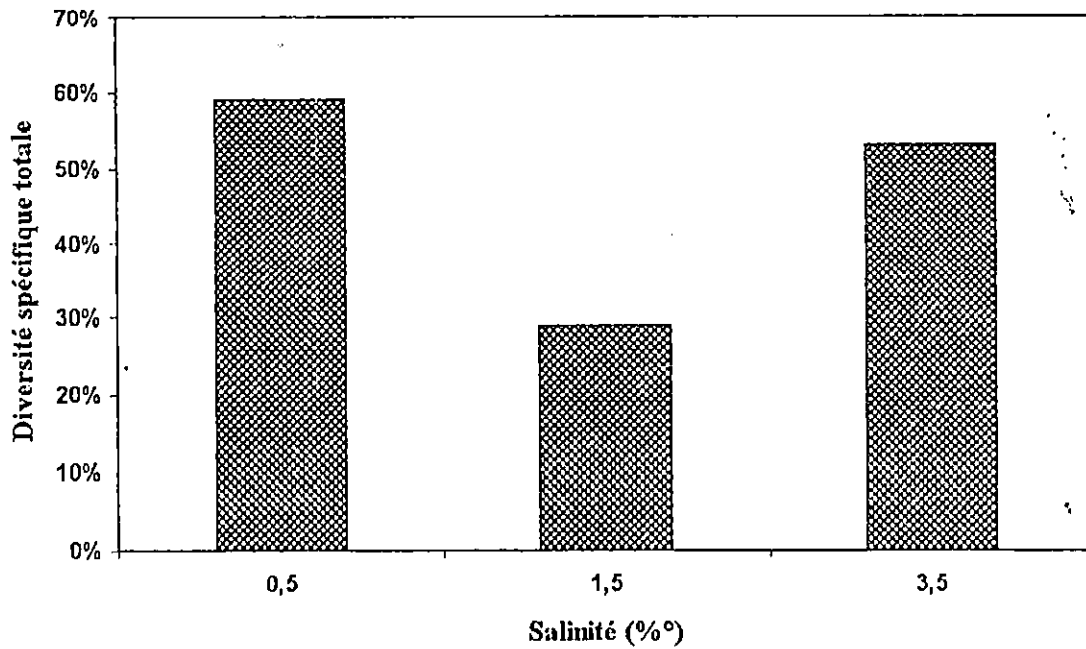


Figure 3.4: Diversité spécifique totale des espèces du genre *Vibrio* en fonction de la salinité.

3.10. Etude comparative

En comparant cette étude au travail effectué par HENNICHE et REFFAF, (1999) sur les 17 espèces isolées dans l'eau de mer de la plage Ouest de Sidi-Fredj, 4 espèces sont communes (tableau suivant).

Tableau 3.10 : Etude comparative entre HENNICHE et REFFAF, (1999) et la présente étude.

Espèces du présent travail	Espèces isolées par HENNICHE et REFFAF, (1999)	Espèces communes aux deux études
<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. fluvialis I</i>
<i>V. cholerae</i>	<i>V. campbellii</i>	<i>V. marinus</i>
<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. fluvialis I</i>	<i>V. parahemolyticus</i>
<i>V. costicola</i>	<i>V. marinus</i>	<i>V. vulnificus</i>
<i>V. fischeri</i>	<i>V. metschnikovii</i>	
<i>V. fluvialis I</i>	<i>V. parahemolyticus</i>	
<i>V. hollisea</i>	<i>V. vulnificus</i>	
<i>V. logei</i>		
<i>V. marinus</i>		
<i>V. mediterranei</i>		
<i>V. mimicus</i>		
<i>V. ordalii</i>		
<i>V. parahaemolyticus</i>		
<i>V. pelagius I</i>		
<i>V. proteolyticus</i>		
<i>V. splendidus I</i>		
<i>V. vulnificus</i>		

Pour la diversité spécifique en fonction des concentrations salines, les résultats obtenus concordent avec ceux obtenus par HENNICHE et REFFAF, (1999). En effet pour les deux études la concentration de 0.5% est la plus prolifique au développement des vibrions.

En ce qui concerne le travail effectué par BOUDJAKDJI, (2001), qui consiste en une identification des vibrions dans le sédiment en fonction de la salinité, il a été constaté que 5 espèces ne se retrouvent pas dans le présent travail. Ces espèces (tableau 3.11) sont fréquemment isolées de la matrice sédiment.

Tableau 3.11.: Espèces communes entre le travail de BOUDJAKDJI, (2001) et la présente étude.

Espèces du présent travail	Espèces isolées par BOUDJAKDJI, (2001)	Espèces communes aux deux études
<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<i>V. cholerae</i>	<i>V. campbellii</i> *	<i>V. cholerae</i>
<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. fluvialis I</i>
<i>V. costicola</i>	<i>V. fluvialis I</i>	<i>V. marinus</i>
<i>V. fischeri</i>	<i>V. fluvialis II</i> *	<i>V. mediterranei</i>
<i>V. fluvialis I</i>	<i>V. gazogene</i> *	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>V. hollisea</i>	<i>V. harveyi</i> *	<i>V. splendidus I</i>
<i>V. logei</i>	<i>V. marinus</i>	<i>V. vulnificus</i>
<i>V. marinus</i>	<i>V. mediterranei</i>	
<i>V. mediterranei</i>	<i>V. natriengis</i> *	
<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	
<i>V. ordalii</i>	<i>V. splendidus I</i>	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>	
<i>V. pelagius I</i>		
<i>V. proteolyticus</i>		
<i>V. splendidus I</i>		
<i>V. vulnificus</i>		

* :Espèces non isolées dans ce travail

Une autre différence est à relever, il s'agit de la concentration saline de 2.5% qui se caractérise par une plus grande diversité spécifique. Ceci se rapporte également au fait que la matrice étudiée soit différente.

Par rapport au travail de YAMANI, (2001), qui a consisté en une variation du pH du milieu d'enrichissement pour une salinité de 2.5%, le pH commun à savoir 8.6 présente une plus grande prolifération des espèces. Néanmoins, la différence réside dans le fait que la concentration saline de 2.5 % n'a pas été utilisée dans notre travail. Toutefois; il est à relevé

qu'une plus grande diversité se retrouve dans nos isolats. La variation du facteur salinité paraît jouer un rôle prépondérant dans la distribution de cette espèce dans l'eau de mer.

Tableau 3.12: Etude comparative des espèces isolées dans ce présent travail et celui de YAMANI, (2001).

Espèces du présent travail	Espèces isolées par YAMANI, (2001)	Espèces communes -- aux deux études
<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>
<i>V. cholerae</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. cholerae</i>
<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. campbellii</i>	<i>V. marinus</i>
<i>V. costicola</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mediterranei</i>
<i>V. fischeri</i>	<i>V. furnissi</i>	<i>V. ordalii</i>
<i>V. fluvialis I</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>V. hollisea</i>	<i>V. marinus</i>	<i>V. splendidus I</i>
<i>V. logei</i>	<i>V. mediterranei</i>	
<i>V. marinus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	
<i>V. mediterranei</i>	<i>V. nereis</i>	
<i>V. mimicus</i>	<i>V. ordalii</i>	
<i>V. ordalii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. splendidus I</i>	
<i>V. pelagius I</i>		
<i>V. proteolyticus</i>		
<i>V. splendidus I</i>		
<i>V. vulnificus</i>		

17 espèces ont été isolées contre 13 dans le travail de YAMANI, (2001). Selon URDACI-BERTRAN, (1987); VERON et POPOFF, (1990) la croissance des vibrions est stimulée par les ions sodium.



**CONCLUSION
GENERALE**

Conclusion

Le présent travail est une tentative d'une part de déterminer la concentration saline favorable pour un isolement sélectif de la famille des Vibrionaceae et d'autre part de faire une identification précise par la méthode classique des espèces se trouvant dans le volume d'eau de mer analysée.

Cette étude effectuée dans la plage Ouest de Sidi Fredj en juin et septembre 1999 a révélé une grande diversité d'espèces. Sur les 43 espèces de *Vibrio* répertoriées à ce jour (LESNE et FOURNIER, 1998) 17 ont été identifiées, la plupart sont saprophytes.

Parmi les salinités testées au cours de cette étude, le meilleur développement bactérien (2206 CFU/ml) et la plus grande diversité (59%) d'espèces ont été obtenues à 0.5% de NaCl.

Les trois espèces le plus fréquemment isolées sont *V. proteolyticus*, *V. alginolyticus*, et *V. cholerae*. Ces deux dernières espèces sont pathogènes pour l'homme, *V. alginolyticus* a été rarement impliqué dans les infections alimentaires, il est associé aux lésions superficielles notamment les otites (LESNE et FOURNIER, 1998).

V. cholerae quant à lui peut être à l'origine de maladie pestilentielle à tropisme digestif qui se développe par épidémies massives (VERON et POPOFF 1990).

La réponse à la question posée au début de cette étude à savoir la salinité la plus favorable à l'isolement et au développement des *Vibrio* est mitigée. Bien que 0.5% de NaCl ait donné le meilleur résultat, les deux autres concentrations testées (1.5% et 3.5%) sont intéressantes car elles ont permis l'isolement d'espèces différentes.

Il serait souhaitable d'étendre dans le temps cette étude et de rechercher les éventuelles relations entre l'abondance des vibrions et les paramètres classiques du milieu comme la température de l'eau de mer.



BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ALSINA M., BLANCH A.R., 1994. A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio*. *Species J. appl. Bacteriol.*, 76 : 79-85.
- ANONYME, 1995. *Vibrio* university of Texas. Houston Médical school : 2 p non num. <http://medic.meduth.tmc.edu/path/00001524.htm>.
- AMINOT A., CHAUSSEPIED M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu marin. CNEXO, Brest, Fr. : 1-395.
- AFNOR, 1991. Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes : méthodes pour le comptage des colonies à 30°C ISO 4833. Normes homologuées, 2^{ème} édit. : 1-5.
- ASSEFSAF A., LEUBNA DJEMAZI L., 1996. Evaluation du stock et dynamique de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (Lamarck) dans la presqu'île de Sidi-Fredj. Mém. Ing. Etat, ISMAL: 1-111+ annexes.
- AUBERT M., 1991. Les pollutions du milieu marin. *Rev. Int. Océanog. Méd.* 101, 102, 103, 104 : 63-71.
- BAUMANN P., BAUMANN L., 1981. The marine Gram négative Eubacteria in Starr. Stolp. Trüper, blaws and Schlegel editors. The procaryotes: a hand book on habitats, isolation and identification of bacteria. Springer verlag, New York : 1302-1331.
- BAUMANN P., RALPH II., SCHUBERT W., 1993. Vibrionaceae (Veron, 1965). Bergey's manual of systematic bacteriology. 9th Edit. Lippincott, Williams et Wilkins, 1: 516-542.
- BERCHE P., 1998. La ré émergence du choléra. Faculté de médecine de Necker ; Article spécial 4 (3) : 1-11.
- BIANCHI A., BIANCHI M., 1971. La numération des populations bactériennes du milieu marin. *Tethys* 3 (4) : 697-704.
- BIANCHI M., MARTY D., BERTRAND J.C., CAUMETTE P., GAUTHIER M., 1988. Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. Edit. MASSON : 1-447.
- BOUDJAKDJI M., 2001. Isolement et identification des vibrions marins à partir des sédiments de la plage Ouest (Sidi-Fredj). Mém. Ing. Etat, ISMAL : 1-77 + annexes.
- BRISOU J.F., 1980. Les bactéries marines. Edit. MASSON : 1-209.
- BRISOU J.F., DENIS F., 1978. Hygiène de l'environnement maritime. Edit. MASSON : 1-218.
- BRUNI V., CRISAFI E., MAUGERI T. L., ZACCONE R., 1986. Isolement et identification des vibrions d'une station expérimentale de mariculture. GERBAM, 2^{ème} colloque

- international de bactériologie marine*. CNRS. Edit. IFREMER. *Acte de colloque*, 3 : 475-481.
- COLWELL R.R., 1970. Polyphasic taxonomy of genus of *V. cholerae*, *V. parahémolyticus* and related *Vibrio* species. *J. Bacteriol.*, 104 (1) : 401-433.
- COLWELL R.R., MAC DONELL M.T., DE LEY J., 1986. Proporsal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 3 : 473-477.
- COLWELL R.R., 1996. Global climate and infectious disease: the cholera pradigm. *Science*, 274 : 2025-2031.
- CORMIER M., MARTIN Y., 1991. Rejets urbains et salubrité du littoral. *Actes de colloque sur la mer et les rejets urbains*. Edit. IFREMER, 11 : 150- 152.
- COUTURE C., 1990. Bactériologie médicale. Edit. DECARIS VIGOT : 1- 258.
- DELATTRE J.P., DELESMONT R., 1986. Vibrions halophiles et apports thermiques sur le littorale français de la mer du Nord. GERBAM, 2^{ème} colloque international de bactériologie marine. CNRS, Edit. IFREMER, 3 : 491-497.
- DODIN A., 1972. Le choléra aspect actuel. *Médecine et maladies infectieuses* 2 (6, 7) : 167-172.
- DODIN A., CHAMOISEAU G., LEPERS J.P., CHARTIER C., 1986a. Epidémiologie et hygiène. Transport du vibron cholérique : Rôle éventuel du chameau . *Acad. Sc. Paris*, 303, série III, (13) : 557-559.
- DODIN A., FOURNIER J. M., 1992. Méthode de laboratoire pour le diagnostic du vibron cholérique et les autres vibrions. Institut Pasteur, Paris, : 1-148.
- DODIN A., DOSSO M., 1986b. Ecologie des vibrions pathogènes. GERBAM, 2^{ème} colloque international de bactériologie marine. CNRS, édit. IFREMER, 3 : 499-505.
- EUZEBY J.P., 1999. *V. harveyi*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/harveyi.html.
- EUZEBY J.P., 1999. *V. pectenidai*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, 5 p non num. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/vvibriopectenicida.html.
- EUZEBY J.P., 1999. Principaux caractères bactériologiques permettant de différencier *V. halioticoli* des autres espèces du genre *Vibrio* présentant des caractères phénotypiques communs, 4p non num. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/halioticoli/html.
- EUZEBY J.P., 1999. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Principaux caractères bactériologique permettant de différencier *V. pectenida*, *V. penaicida* et *V. tapetis* des autres espèces du genre *Vibrio* phénotypiquement apparentées. Dictionnaire de bactériologie, 2 p non num. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/pectenicidali/htm.

- EUZEBY J.P., 1999. *V. scophtalmi*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, 3 p non num. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/scophtalmi.html.
- EUZEBY J.P., 2000. *V. wodani*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire, 5 p non num. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/wodani.html.
- F.D.A., 1992. *Vibrio parahaemolyticus*. Bad bug book, U.S. food & drug administration, center for food safety & applied nutrition. Foodborne pathogenic micro-organismes and natural toxins handbook, 3 p non num. vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap9.htm.
- F.D.A., 1992. *Vibrio vulnificus*. Bad bug book, U.S. food & drug administration, center for food safety & applied nutrition. Foodborne pathogenic micro-organismes and natural toxins handbook, 3 p non num. vm.cfsan.fda.gov/~mow/chap10.htm.
- F.D.A., 1998. Bacterial pathogen growth. Chapter 20; appendice 4 in Fish and fishery products hazards and controls guide, 2nd. Department of health and human services, food and drug administration, center for safety and applied nutrition, office of sea food, Washington, DC:241-244. seafood.ucdavis.edu/HACCP/compendium/chapt20.htm.
- FIGNERAS A., ROBLEBO J. A. F., NOVO A. B., 1996. Brown ring disease and parasites in clams (*Ruditapes desussatus* and *R. philippinarum*) from Spain and Portugal. *J. Shell fish Res.*, 15 :363-368.
- FLANDROIS J.P., 1997. Bactériologie médicale. Collection Azoy. Presse universitaire de Lyon : 201-205.
- FORTERRE P., 1999. Dictionnaire de l'écologie. Encyclopaedia universalis, édit. Albin Michel : 572-573.
- FURNISS A.L., DONOVAN T.J., 1976. The Gram negative non sporing rods: Vibrios. Collins C.H., Lyne P.M. edit. Microbiological methods. 4th Edit Butterworths: 341-396.
- GAUTHIER M.J., AUBERT J., AUBERT M., 1982. Numerical analysis of heterotrophic bacterial flora from necroses of marine fishes. *Rev. Int. Océanog. Méd.*, 116-117:3-31.
- GELINAS P., 1995. Répertoire des micro-organismes pathogènes. Edit. EDISEM : 1-207.
- GHOUL M., 1993. Les algues marines sources d'osmoprotection pour l'*Echerichia coli*. In workshop sur la Circulation des eaux et pollution des côtes méditerranéennes des pays du Maghreb ; édit. CHOUIKHI A., IZDAR E. et MENIOUI M., Inoc publ., Turquie : 251-252.
- GUILLAUD J.-F., 1994. Les rejets urbains en mer. *Equinoxe spécial environnement littoral*, 47-48 : 78-80.
- HASLAY C., LECLERC H., 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation. Edit. Tec et Doc : 1-495.
- HENICHE A., REFFAF M., 1999. Isolement et identification des vibrions dans la presqu'île de Sidi-Fredj. Mém. Ing. Etat, ISMAL : 1- 60 + annexes.

- INSTITUT DE LA SANTE PUBLIQUE, 1999. Standardisation de l'antibiogramme à l'échelle nationale selon les recommandations de l'OMS. INSP : 1-53.
- LACAZE J.C., 1980. La pollution pétrolière en milieu marin. Edit. Masson , Paris : 1-117.
- LACAZE J.C., 1996. La pollution des mers. Edit. Flammarion , Paris : 1-127.
- LARPENT J.P., LARPENT-GOURGAUD M., 1997. Mémento technique de microbiologie. Tec et Doc, 3^{ème} Edit., LAVOISIER : 1-1039.
- LECLERC H., BUTTIAUX R., GUILLAUME J., WATTRE P., 1977. Microbiologie appliquée. Edit. DOIN, Paris : 1-535.
- LEGENDRE L., LEGENDRE P., 1984. Ecologie numérique : le traitement multiple des données écologiques. Presse de l'université du Québec. MASSON 2^{ème} Edition.
- LEMOINE T., GERMSNETTO P., GIRAND P., 1999. Toxi-infection alimentaire collective au *V. proshaemo*. Cours de l'IDE, 11p non num. www.insp.sante.fr/jbek.
- LESNE J., FOURNIER M., 1998. Vibrio in Satura, Frederighi, Jouve (coordinateurs) : manuel de bactériologie alimentaire. Edit. POLYTECHNICA : 260-304.
- MAC DONELL M.T., COLWELL R.R., 1985. Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendation of two genera, *Listonella* and *Shewanella*. *Sys. Appl. Microbiol.* 6 : 171-182.
- MARCHAL M., BOURDON J.L., RICHARD C.L., 1987. Les milieux de cultures pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. DOIN, 3^{ème} Edit.: 1-505.
- MEYER A., DEIANA J., LECLERC H., 1995. Cours de microbiologie générale, nouveau programme. DOIN, 2^{ème} Edit; : 1-365.
- MOREIRA V.M., 2000. Traitement du choléra : Généralités, épidémiologie. AMHERJ ; 13p non num. www.cholera.princi.htm.
- O.M.S., 2000. Le choléra. Aide mémoire n° 107. www.who.int.
- O.M.S./P.N.U.E., 1995. Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles. Recommandations générales. Partie I. EUR/CEHO. Rev.1, 041 (2) : 1-67.
- O.M.S./P.N.U.E., 1995. Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles. Organismes indicateurs bactériens. partie II. EUR/ICP/CEH 041 (3) : 1-150.
- OLIVIER J.D., 2000. *V. Vulnificus*. www.vibrio.com.
- OLIVIER J.D., WARNER R.A., CLELAND D.R., 1983. Distribution of *V. vulnificus* and other lactose fermenting vibrios in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (3) : 985-998.

- PEIFFER B., 1998. Infection alimentaire à *Vibrio parahaemolyticus*, 2p non num. www.chez.com/guatelalt/
- PEIFFER B., 1999. Choléra. 8p non num. www.cholera.htm.
- PILET C., BOURDON J.L., TOMA B., MARCHAL L., BALASTRE C., 1981. Bactériologie médicale et vétérinaire. DOIN, 2^{ème} édit. Biologie appliquée : 1-421.
- POGGI R., 1990. Impact sanitaire des contaminations microbiologiques. *Acte de colloque sur la mer et les rejets urbains*. IFREMER, 11: 115-132.
- POMMEPUY M., CORMIER M., AUDIC J.M., LE GUYADER F., GUILLAUD J.F., 1994. Le devenir des micro-organismes rejetés en mer. *Equinoxe spécial environnement littoral*, 47-48 : 58-60.
- POMMEPUY M., DUPRAY E., GUILLAUD J.F., DARRIEN A., L'YAVANAC J., CORMIER M., 1991. Rejets urbains et contamination fécale. *Oceanologica acta. Vol. SP (11)* : 321-327.
- POMMEPUY M., GUILLAUD J.F., DUPRAY E., DARRIEN A., LE GUYADER F., CORMIER M., 1992. Enteric bacteria survival factors. *Wat. Sci. Tech.*, 25 (12): 93-103.
- POPOFF ET M., VERON M., BERCHIE P., 1982. Bactériologie médicale. LEMNIOR, VERON édit. Médecine Science, 2^{ème} édit., FLAMMARION, Paris : 1-1107.
- PRESCOTT, HARLEY, KLEIN, 1995. Microbiologie. De Boeck université 2^{ème} édition : 1-1014.
- QUILLIEN J., 1980. *L'inspection sanitaire des coquillages*. Thèse doct. Vétérinaire. Univ. Paul-Sabatier, Toulouse : 1-70.
- SINGLETON P., 1997. Bactériologie. 4^{ème} édit. DUNOD : 1-415.
- TAMPLIN M.L., JACKSON J.K., BUCHRIESER C., MURPHREE R.L., PORTIER K.M., MILLER L.G., KASLAR C.W., 1996. Pulfield gel electrophoresis and ribotype profiles of clinical and environmental vibrio vulnificus isolates. *Appl Environ. Microbiol.*, 62 (10) : 3572-3580.
- TROUSSELIER M., ALBAT M., ANDRE P., BALEUX B., 1985. Dénombrements directs des bactéries dans les milieux aquatiques par microscopie à épifluorescence : distribution et précision des mesures. *Rev. Française des sciences de l'eau* : 35-49.
- URDADI-BERTRAN M.C., 1987. *Le genre vibrio: approche éco-épidémiologique et taxonomie des espèces isolées du Sud Ouest européen*. Thèse Doct., Univ. Bordeaux I, : 1-181.
- VANELLE A.M., 1999. Le contrôle bactériologique des coquillages vivants. *Rev. Int. Océanog. Med.*, 101-102-103-104 : 63-71.
- VERON M., POPOFF M., 1990. Bactériologie médicale. LEMNIOR, VERON éditeurs. Médecine-Science 2^{ème} édit., FLAMMARION, Paris : 1-1107.

YAMANI M., 2001. Isolement et identification des vibrions marins en fonction du pH du milieu d'enrichissement dans l'eau de mer de la plage Ouest de Sidi-Fredj. Mém. Ing. Etat, ISMAL : 1-59 + annexes.

ZACCAÏ J., FRANZETTI B., 1999. Un pacte moléculaire avec le sel. *La recherche*, 317 : 62-64.

ZACCONE R., CARUSO G., CRISA F., 1991. Utilisation d'anticorps fluorescents pour le comptage de *E. coli* en eau de mer. *Rev. Int. Océanog. Méd.*, 101-102-103-104 : 90-93.

ZOBELL C.E., 1946. Marine hydrobiology. A monograph on hydrobacteriology. Waltham. Mass. Usa., Edit. Chronica Botanica Company : 1-230.

XU H.S., ROBERTS N., SINGLETON F.L., ATTWELL R.W., GRIMES D.J., COLWELL R.R., 1982. Survival and viability culturable *Escherichia Coli* and *Vibrio Cholerae* in the estuarian and marine environment. *Microbio. Ecol.*, 8 : 313-325.



ANNEXES.

Annexe 1

Résultats bruts de l'analyse quantitative : Comptage des colonies.

Prélèvement 1

NaCl	-1			-2			-3		
0,5	N	N	N	id	240	184	3	13	20
1,5	N	N	N	N	110	69	1	2	0
3,5	N	N	N	208	284	131	50	63	85

N : Culture en nappe

id : indéterminé

Prélèvement 2

NaCl	-1			-2	-3	-4
0,5	N	N	N	130	2	-
1,5	N	N	N	2	-	-
3,5	N	N	N	1	-	-

Prélèvement 3

NaCl	-1			-2			-3			-4
0,5	N	N	N	24	97	24	440	892	-	-
1,5	N	N	N	680	1080	840	53	47	70	-
3,5	N	N	N	id	264	292	2	1	12	-

ANNEXE 2

Technique de la coloration de Gram

1. Recouvrir complètement la lame de la solution 1 (**violet de Gentiane**)
2. Rincer prudemment à l'eau distillée pendant 5 secondes
3. Recouvrir complètement la lame de la solution de **lugol**, puis laisser agir pendant une minute
4. Rincer prudemment à l'eau distillée pendant environ 5 secondes
5. Immerger la lame dans une solution décolorante (alcool) en remuant pendant environ 20 à 60 secondes
6. Rincer à l'eau distillée pendant 5 secondes environ
7. Recouvrir complètement la lame de la solution de **fushine**, laisser coloré pendant une minute
8. Rincer prudemment à l'eau distillée pendant 5 secondes environ
9. Laisser sécher.

ANNEXE 3

Milieux de culture

- Eau peptonée alcaline concentrée 10 fois :

Composition en g/l :

Peptone.....	15
NaCl.....	25
Eau distillée.....	11

Autoclaver à 120° C pendant 15 minutes.

pH ajusté à 9 pour qu'il soit à 8.6 après autoclavage.

➤ Utilisation : *Milieu d'enrichissement des vibrions.*

- TCBS (Thiosulfate, Citrate, Bile, Saccharose) :

Composition en g/l :

Peptone de caséine.....	5.0
Peptone de viande.....	5.0
Extrait de levure.....	5.0
Citrate de sodium.....	10.0
Thiosulfate de sodium.....	10.0
Bile de bœuf désséchée.....	5.0
Cholate de sodium.....	3.0
Saccharose.....	20.0
Chlorure de sodium.....	10.0
Citrate ferrique.....	1.0
Bleu de thymol.....	0.04
Bleu de bromothymol.....	0.04
Agar-agar.....	14.0

Porter à ébullition dans un litre d'eau pour dissoudre complètement le milieu. Ne pas autoclaver.

➤ Utilisation : *Milieu sélectif des vibrions.*

• **Milieu de Mulleur-Hinton :**

Composition en g/l :

Infusion de viande de bœuf.....	300
Hydrolysat de caséine.....	17.5
Amidon.....	1.5
Gélose.....	17

pH final : 7.4.

➤ **Utilisation :** *Etude de la sensibilité aux antibiotiques.*

• **Oxydase :**

Composition des disques d'oxydase (agence du médicament, France).

➤ **Utilisation :** *Recherche de l'oxydase.*

• **Bouillon nitraté salé :**

Composition en g/l :

VI semi solide.....	1000 ml
Glucose.....	2
Nitrate de sodium.....	5

➤ **Utilisation :** *Recherche des nitrates.*

• **Milieu de Clarck et Lubs salé :**

Composition en g/l :

Peptone tryptique ou polypeptone.....	5 à 7
Glucose.....	5
Phosphate bipotassique.....	5
Chlorure de sodium.....	10

Dissoudre en chauffant légèrement.

pH final : 7. Répartir à raison de 5 ml par tube ; stériliser par autoclavage pendant 30 mn à 110° C.

➤ **Utilisation :** *Détermination de la voie empruntée lors de la dégradation du glucose à partir du stade pyruvate au cours de la fermentation.*

La voie des acides mixtes est déterminée par la réaction du rouge de méthyle (RM).

La voie butylène glycolique est déterminée par la réaction Voges-Proskauer (VP).

• **Milieu de fermentation des sucres :**

Composition en g/l :

Extrait de viande.....	1
Tryptone.....	10
Chlorure de sodium.....	10
Rouge de phénol.....	0.018
Eau distillée q.s.p.....	1000 ml

pH : 7.5.

➤ **Utilisation :** *Détermination de la dégradation ou non des sucres. Les différents sucres sont stérilisés soit par filtration (arabinose, lactose, maltose, saccharose), ou bien par stérilisation à 110° C (galactose, glucose, glycerol, mannitol, mannose, rhamnose) pendant 10 minutes. Ils sont ensuite ajoutés à une concentration finale de 1% (v/v).*

• **Milieu de Möller :**

Peptone pepsique de viande.....	5 g
Extrait de viande.....	5 g
Bromocresol pourpre.....	0.01 g
Rouge de cresol.....	0.005 g
Glucose.....	0.5 g
Pyridoxal.....	0.005 g

pH ajusté à 6 ce milieu de base, additionné 1% de L-arginine, L-ornithine ou L-lysine.

➤ **Utilisation :** *Recherche des décarboxylases.*

• **Milieu Urée-Indole salé :**

L-tryptophane.....	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
Na Cl.....	10 g
Urée.....	2 g
Alcool à 95 %.....	1 ml
Rouge de phénol à 1%.....	0.25 ml
Eau distillée.....	100 ml

Dissoudre le L-tryptophane dans l'eau distillée chauffée à 60° C, laisser refroidir et dissoudre les autres ingrédients. Stérilisation par filtration.

➤ **Utilisation :** *Détermination de l'uréase, de la tryptophane désaminase et de l'indole.*

• Milieu de Hajna Kligler (KIA) :

Composition en g/l :

Extrait de viande de bœuf.....	3
Extrait de levure.....	3
Peptone.....	20
Chlorure de sodium.....	5
Citrate ferrique.....	0.3
Thiosulfate de sodium.....	0.3
Lactose.....	10
Glucose.....	1
Rouge de phénol.....	0.05
Agar.....	12

pH final : 7.5 ; autoclaver à 120° C pendant 15 minutes, laisser solidifier en position inclinée.

➤ Utilisation : Permet de confirmer la fermentation du glucose, l'attaque du lactose et la production de H₂S.

• Milieu Citrate-Simmon :

Composition en g/l :

Sulfate de magnésium.....	0.2
Phosphate mono-amoniaque.....	1
Phosphate bipotassique.....	1
Citrate de sodium.....	5
Chlorure de sodium.....	2*
Bleu de bromothymol.....	0.08
Agar.....	15

(*) La formule proposée par le diagnostics Pasteur ne contient que 1g % de citrate de sodium. Dissoudre à chaud ; ajuster le pH à 6.8. Répartir à raison de 5 à 7 ml par tube. Autoclaver à 120°C pendant 15 minutes.

➤ Utilisation : Seules les bactéries possédant une citrate-perméase sont capables d'utiliser le citrate comme source de carbone.

• **Milieu de Hugh-Leifson salé :**

Composition en g/l :

Tryptone.....	2
Chlorure de sodium.....	10
Phosphate bipotassique.....	0.3
Bleu de bromothymol.....	0.03
Agar.....	3

pH : 7.2 ; autoclaver à 115° C pendant 20 minutes.

➤ **Utilisation :** *Etude du type respiratoire.*

• **Gélose gélatine :**

Composition en g/l :

Extrait de viande.....	3
Peptone.....	5
Agar-agar.....	15
Eau distillée.....	1000 ml
Solution de gélatine à 15 %.....	100 ml

➤ **Utilisation :** *La gélatinase est mise en évidence à la suite de la dégradation de gélatine.*

• **Gélose amidon :**

Composition en g/l :

Extrait de viande	3
Peptone.....	5
Amidon de riz.....	10
Agar-agar.....	15
Eau distillée.....	1000 ml

pH ajuster à 7.4 ; après autoclavage à 110° C pendant 30 minutes.

➤ **Utilisation :** *L'amylase est mise en évidence suite à la dégradation de l'amidon.*

Annexe 4

Tableau 1 : Résultats bruts des tests biochimiques pour les souches identifiées du premier prélèvement.

N° de Souche		OA1	OA2	OA3	OA4	OA5	OA7	OA9	OA10	OA12	OA13
Tests											
Oxydase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rédu-nitrates		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaz en glu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Essaimage		+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
ADH		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LDC		+	+	+	+	-	+	-	+	+	+
ODC		-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
VP		-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
RM											
Indole		+	+	-	+	+	+	+	±	-	+
Citrate		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urée		-	-	+	-	-	+	-	±	-	+
βgalactosidase		-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
Gélatinase		+	+	+	+	+	+	±	+	-	+
Amylase		±	±	+	±	-	-	+	-	+	+
Croissance	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40°C	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
	42°C	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
Croissance avec NaCl	0%	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
	5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'acide avec	Arabinose	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-
	Fructose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	Galactose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	Glycerol	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Maltose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
	Mannose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	Rhamnose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
	Saccharose	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-
Lactose	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	
Sensibilité O/129		S		S	S		S	S	S	S	S
Production de H ₂ S		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterase		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Type Respiratoire	An	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	A	+	+	+							
Espèces		<i>V. mimicus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. costicola</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. logei</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. marinus</i>
Salinité		0,5									

Annexe 4

Tableau 1 (suite) : Résultats bruts des tests biochimiques pour les souches identifiées du premier prélèvement.

N° de Souche		OA14	OA15	OA16	OA18	OA19	OA20	OA24	OA25	OA26	OA27
Tests											
Oxydase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Réd-nitrates		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gaz en glu		-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Essaimage		+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
ADH		-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
LDC		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC		-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
VP		-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
RM											
Indole		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Citrate		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urée		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
βgalactosidase		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Gélatinase		+	+	+	-	+	±	+	+	+	+
Amylase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Croissance	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	40°C	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	42°C	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Croissance avec NaCl	0%	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Production d'acide avec	Arabinose	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-
	Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Galactose	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+
	Glycerol	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Mannose	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
	Rhamnose	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
	Saccharose	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
Lactose	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	
Sensibilité O/129		S		S	NS	NS	S	S	S	S	S
Production de H ₂ S		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esterase		+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Type Respiratoire	An	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Espèces		<i>V. pelagius</i>	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>
Salinité		1,5					3,5				

Annexe 4

Tableau 1 (suite) : Résultats bruts des tests biochimiques pour les souches identifiées du premier prélèvements.

N° de Souche		OA27'	OA28	OA29	OA30	OA31	OA32
Tests							
Oxydase		+	+	+	+	+	+
Réduct-nitrates		+	+	+	+	+	+
Gaz en glu		-	-	-	-	-	-
Essaimage		+	-	+	+	+	+
ADH		+	-	+	+	+	-
LDC		+	+	-	+	+	+
ODC		+	-	+	-	-	-
VP		+	-	+	+	+	-
RM		-	-	-	+	+	+
Indole		-	+	-	+	+	+
Citrate		-	-	-	-	-	+
Urée		-	-	-	-	-	-
βgalactosidase		-	-	-	-	-	-
Gélatinase		-	-	-	-	-	-
Amylase		+	-	+	+	+	+
Croissance	30°C	+	+	+	+	+	+
	40°C	-	+	+	+	+	-
	42°C	+	+	+	+	-	-
Croissance avec NaCl	0%	+	+	+	+	+	+
	5%	+	+	+	+	+	+
	7%	+	+	+	+	+	+
	10%	+	+	+	+	+	+
Production d'acide avec	Arabinose	-	-	-	-	-	-
	Fructose	+	+	+	+	+	-
	Galactose	+	+	+	+	-	-
	Glycerol	+	+	+	+	+	-
	Glucose	+	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+	+	+
	Mannitol	+	-	+	-	+	+
	Mannose	+	+	-	+	+	+
	Rhamnose	-	-	-	-	+	-
	Saccharose	+	+	+	+	+	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	
Sensibilité O/129		S			S	S	S
Production de H ₂ S		-	-	-	-	-	-
TDA							
Esterase		-	-	+	-	+	+
Type Respiratoire	An	+	+	+	+	+	+
	A	+	+	+	+	+	+
Espèces		<i>V. costicola</i>	<i>V. natrigens</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. fischeri</i>
Salinité		3,5					

Annexe 4

Tableau 3 : Résultats bruts des tests biochimiques pour les souches identifiées du troisième prélèvement.

N° de Souche		OC2	OC4	OC4'	OC5	OC6	OC7	OC8	OC9	OC9'	OC10	OC11	OC12	OC15	
Tests															
Oxydase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Réduct-nitrates		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Gaz en glu		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Essaimage		-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	
ADH		-	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	
LDC		+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	
ODC		+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	
VP		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
RM		+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	
Indole		+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	
Citrate		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Urée		-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	
βgalactosidase		-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
Gélatinase		+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Amylase		+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
Croissance	30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	42°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Croissance avec NaCl	0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	
	5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
	7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
	10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	
Production d'acide avec	Arabinose	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	
	Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	
	Glycerol	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	
	Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Maltose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
	Mannitol	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	Mannose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	
	Rhamnose	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
	Saccharose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Lactose	+	+	+	+	+							+	-	-	
Sensibilité O/129															
Production de H2S		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TDA		-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	
Esterase		+	+	+	+										
Type Respiratoire	An	+	+	+	+										
	A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Espèces		<i>V. Cholera</i>	<i>V. Fluvialis</i>	<i>V. Metchnikovii</i>	<i>V. Orientalis</i>	<i>V. Pelagius</i>	<i>V. Splendidus</i>	<i>V. Logei</i>	<i>V. Splendidus</i>	<i>V. Splendidus</i>	<i>V. Proteolyticus</i>	<i>V. Pelagius</i>	<i>V. Ordalii</i>	<i>V. Vulnificus</i>	
Salinité		0,5					1,5					3,5			

Annexe 4

Tableau 2 : Résultats bruts des tests biochimiques pour les souches identifiées du deuxième prélèvement.

N° de Souche		OB1	OB2	OB3	OB4	OB5
Tests						
Oxydase		+	+	+	+	+
Réduction nitrates		+	+	-	+	+
Gaz en glu		-	-	-	-	-
Essaimage		-	-	-	-	-
ADH		-	-	-	+	+
LDC		+	+	+	+	+
ODC		-	-	-	-	-
VP		-	-	-	-	-
RM		+	+	+	-	+
Indole		+	+	+	+	+
Citrate		-	-	-	-	-
Urée		+	+	+	+	+
βgalactosidase		-	-	-	-	-
Gélatinase		-	-	-	-	-
Amylase		+	+	+	-	-
Croissance	30°C	+	+	+	+	+
	40°C	+	+	+	+	+
	42°C	-	-	-	-	-
Croissance avec NaCl	0%	+	-	+	+	+
	5%	+	-	+	+	+
	7%	+	-	+	+	+
	10%	+	-	+	+	+
Production d'acide avec	Arabinose	-	-	-	-	-
	Fructose	+	+	+	+	-
	Galactose	-	-	-	+	-
	Glycerol	+	+	+	+	-
	Glucose	+	+	+	+	+
	Maltose	+	+	+	+	+
	Mannitol	+	+	+	-	+
	Mannose	+	+	+	-	+
	Rhamnose	-	-	-	-	-
	Saccharose	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	
Sensibilité O/129						
Production de H ₂ S						
TDA						
Esterase		+	+	+	-	+
Type Respiratoire	An	+	+	+	+	+
	A	+	+	+	+	+
Espèces		<i>V. Mediterranei</i>	<i>V. Mediterranea</i>	<i>V. Costicola</i>	<i>V. Proteolyticus</i>	<i>V. Proteolyticus</i>
Salinité			0,5		1,5	

ANNEXE 5

Tableau 1 : Les antibiotiques groupés par famille : origine et spectre d'activité (LECLERC *et al.*, 1995).

Famille	Antibiotique	Origine	Année de la découverte	Spectre d'activité			
				Cocci +	Gram -	Bacille +	Gram -
Polypeptides basiques	• Polymixines	<i>Bacillus polymyxa</i>	1947	-	-	-	+
	• Bacitracine	<i>Bacillus licheniformis</i>	1945				
Phénicol	• Chlorophénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	1944	+	+	+	+
Oligosaccharides	• Stréptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	1944				
	• Néomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949	+	+	+	+
	• Gentamycine	<i>Micromonospora monosporae</i>	1967				
Macrolides	• Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	1954	+	+	+	-
Ryfamycines	• Rifampicine	<i>Streptomyces méditerranée</i>	1948	+	+	+	+
Tétracyclines	• Tétracycline	<i>Streptomyces texasi</i>	1953	+	+	+	+

ANNEXE 5

Tableau 2 : Mode d'action des antibiotiques (LECLERC *et al.*, 1993).

Antibiotiques	Mode d'action
	Inhibition de la synthèse protéique
Tetracycline	Fixation sur la sous-unité 30S du ribosome et inhibition de la fixation de l'aminocycle-ARNt sur le site ribosomale spécifique.
Phéniocolés	Fixation sur la sous-unité 50S du ribosome et inhibition de la formation de liaison peptidique
Macrolides	Fixation sur la sou-unité 50S et inhibition de la fixation de l'aminocycle-ARNt, de la formation de la liaison peptidique, ou de la translocation du peptide.
	Altération des membranes
Polymixines	Désorganisation membranaire par fixation sur les phospholipides et le LPS
	Inhibition des acides nucléiques
Sulfamides	Inhibition de la synthèse des folates (précurseurs des bases puriques) par compétition avec la dihydroptéroate-synthétase
Rifamycines	Inhibition de la transmission de l'ADN par fixation sur l'ARN polymérase ADN dépendante.