

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE

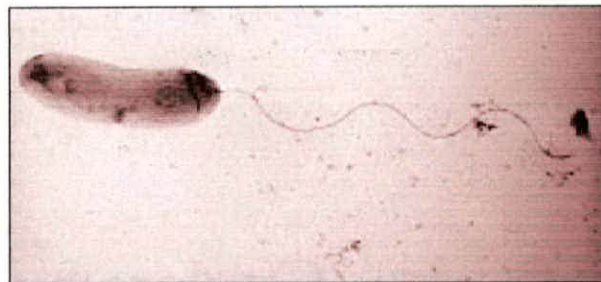
Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
D'INGENIEUR D'ETAT EN BIOLOGIE MARINE

Option : microbiologie

Thème

**Isolement et identification des vibrions marins dans l'eau de
mer de la plage Ouest de Sidi Fredj. en fonction du pH du
milieu d'enrichissement.**



Présenté par

M^{lle} YAMANI MERIAM

Soutenu-le

Devant la commission de jury composé de :

M^r R.SEMROUD (Professeur)

M^r A. BAKALEM (Chargé de cours)

M^{lle} S. AMEUR (Docteur)

M^{me} H. SELLALI-MERABTINE (Chargée de cours)

Président.

Examineur.

Examineur.

Promotrice.

Sommaire :

Introduction	1
1. Généralités	
1.1. Les bactéries dans l'eau de mer	2
1.2. L'halophilie et les bactéries marine	3
1.2.1. Mécanisme d'adaptation	4
1.2.2. La physiologie des halophiles et les ions sodium	4
1.3. Les Vibrionaceae	5
1.3.1. La systématique	5
1.3.2. Définition	5
1.4. Les Vibrions	7
1.4.1. Historique du genre Vibrion	7
1.4.2. Classification	10
1.4.2.1. La classification selon l'halophilie	11
1.4.2.2. La classification selon les caractères biochimiques	11
1.4.2.3. La classification selon l'agglutination	11
1.4.2.4. La classification selon la pathogénicité pour l'homme	11
1.4.3. Les caractères bactériologiques	12
1.4.3.1. Morphologie	12
1.4.3.2. Les caractères culturels et métaboliques	13
1.4.4. Habitat- Ecologie	14
1.4.5. Les infections dues aux Vibrions	15
2. Matériel et méthodes	
2.1. Présentation de la zone d'étude	19
2.1.1. Situation géographique	19
2.1.2. Description du site étudié	19
2.1.3. Choix des stations	19
2.2. Méthode d'étude	19
2.2.1. Etudes des paramètres physico-chimiques	19
2.2. Diagnostique bactériologique	21
2.2.1. Prélèvement des échantillons d'eau de mer	21
2.2.2. Isolement des souches bactériennes	21
2.3. Méthode d'identification	23
2.3.1. Etude qualitative	23
a- Aspect macroscopique	23
b- Aspect microscopique	23
c- Test biochimique	23
d- Sensibilité aux antibiotiques	26

e- Indice de Jaccard	27
f- La diversité spécifique	28
2.3.2. Etude Quantitative	28
3. Résultat et interprétation	
3.1. Les paramètres physico-chimique	29
3.2. Résultats de l'identification des bactéries dans l'eau de mer	30
3.2.1. Résultats de l'observation macroscopique	30
3.2.2. Résultats de l'identification microscopique	30
3.2.3. Résultats de l'identification biochimique	33
3.2.4. Résultats des tests Antibiotiques	37
3.2.5. Mesure d'affinité entre les souches	39
3.3. Résultats et interprétation de l'analyse bactériologique de l'eau de mer	43
3.3.1. Aspect quantitatif	43
3.3.2. Aspect qualitatif	45
3.3.2.1. La diversité spécifique	48
4. Etude comparative	51
Conclusion générale	53
Bibliographie	
Annexes	

Introduction

INTRODUCTION

Dans les écosystèmes aquatiques, les organismes les plus nombreux sont les microorganismes, parmi lesquels les bactéries forment la composante majoritaire. Leur rôle est fondamental dans l'équilibre écologique des milieux aquatiques, principalement par la régulation des cycles biogéochimiques et énergétiques qu'ils réalisent (BIANCHI et al, 1989).

Cette microflore est constituée de germes adaptés à ce milieu spécifique c'est à dire une température moyenne de 15°C, une salinité d'environ 35‰ et 36‰ et un potentiel hydrogène neutre ou alcalin.

Le genre *Vibrio* comprend des germes d'habitat marin, beaucoup d'espèces de ce genre qui ne sont pas pathogènes pour l'homme sont en revanche souvent pathogène pour les produits de la mer, poissons, crustacées, etc.

Le nombre d'espèces de ce genre ne cesse de croître (DODIN et al, 1992). Ce genre compte actuellement plus d'une trentaine d'espèces (LESNE et FOURNIER, 1998).

Notre travail à porter sur l'écologie de la famille des *Vibrionaceae* en particulier sur le genre *Vibrio*, il s'agit également de faire varier le pH du milieu d'isolement, afin d'obtenir une meilleure sélectivité.

C'est à ces bactéries halophiles autochtones de la mer que sera consacré ce travail, a leur biologie, a leurs caractères spécifiques, a leur taxonomie et aux techniques de mise en évidence et d'identification. C'est donc un travail écologique que nous avons tenter de réaliser en restant toutefois le plus près possibles de l'analyse quantitative et qualitative.

L'isolement de ces vibrions a été effectué dans l'eau de mer au niveau de la presqu'île de Sidi fredj, plage Ouest.

Cette étude est partagée donc en deux parties :

La première partie consiste à étudier l'aspect quantitatif de la population bactérienne en faisant varier les potentiels hydrogène des milieux d'isolement.

La deuxième partie consiste à mettre en évidence d'une part l'identification faite à partir des caractères morphologiques, biochimique et physiologiques des *Vibrios*, d'autre part la diversité des espèces isolées selon les potentiels hydrogène (pH) testés, ce qui représentera l'aspect qualitatif de ce travail.

Les résultats obtenus seront ensuite discutés afin de déterminer d'éventuelles complémentarités des approches retenues.

Généralités

1 GENERALITES

1.1 Les bactéries dans l'eau de mer

La température (T°C), la salinité (S‰), le potentiel d'hydrogène (pH), la concentration d'oxygène et la matière organique sont les paramètres clés qui définissent l'hospitalité ou l'hostilité d'un milieu aux micro-organismes (PRIEUR et PARKES, 1999). Ces facteurs vont sélectionner les microorganismes les plus adaptés.

Dans l'eau de mer, les bactéries autochtones sont adaptées à ce milieu, qui est caractérisé par un potentiel d'hydrogène voisin de 8, une salinité moyenne de 35 PSU approximativement, une température moyenne généralement proche de 15°C, et aussi par une fertilité en matière organique pratiquement inépuisable, bien que très diluée (oligotrophes), (BIANCHI, 1988).

Dès 1924 Waksman (*in* BRISOU, 1955) avait déjà insisté sur le petit nombre de cocci rencontré dans le milieu marin et la rareté des espèces sporulantes et les bactéries Gram positives.

Les formes les plus fréquentes dans le milieu marin

Les bactéries Gram- prédominent (tableau 1), leur proportion est de 95% dans l'ensemble de la microflore totale (ZOBELL, 1944; TANNER et HERBERT, 1982; LECLERC et *al*, 1995). Cette prédominance serait due à la structure fine de leur paroi, riche en lipides qui leur évite l'éclatement cellulaire dû aux fortes pressions et facilite les échanges avec le milieu extérieur qui est caractérisé par une grande dilution des éléments nutritifs (BIANCHI et VANWANBEK, 1988 *in* BIANCHI 1988).

Tableau 1: Proportion des principales bactéries dans l'eau de mer (ZOBELL, 1946).

Groupe morphologique	Eau de mer %
Bacilles Gram-	94,6
Bacilles Gram +	1,2
Bacilles Douteux	0,9
Cocci	2,8
Autres Germes	0,5

Dans ce milieu ce sont les genres *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Cytophaga*, *Flavobacterium*, *Vibrio*, *Cellvibrio* qui prédominent dans l'eau de mer (PLUSQUELEC, 1984 ; LECLERC et al, 1995).

Un deuxième groupe vient après, se sont les bactéries allochtones qui sont charriées par les eaux de ruissellement et les eaux d'égouts. A leur arrivée en mer, cette microflore va réagir différemment aux conditions physico-chimiques du milieu, elle va survivre et s'adapter ou disparaître (LECLERC et al, 1977, POMMEPUY et al, 1992).

La charge bactérienne des eaux usées domestiques représente la principale source de micro-organismes pathogènes pour l'homme en milieu marin. Elle est très élevée, on y compte en effet 10^9 à 10^{10} bactéries par litre. Cette charge est principalement représentée par les Enterobacteriaceae (GAUTHIER et PIETRIE 1989). Parmi ces bactéries *Vibrio cholerae* peut être présent car excrété par les malades.

Une des questions que les microbiologistes marin se sont posés: existent-ils ou non des bactéries spécifiques au milieu marin?

La réponse à cette question n'est pas simple, (ZACCAI et FRANZETTI, 1999). Ce milieu marin, en raison de sa composition en NaCl, constitue un écosystème favorable à la sélection d'organismes halophiles.

1-2. L'halophilie et les bactéries marines

L'halophilie est un mot qui vient du grec, "hals" ce qui veut dire sel (ZACCAI et FRANZETTI, 1999).

Les microorganismes ont été classés selon leurs adaptation aux différentes concentrations saline (BRISOU, 1980).

- ◆ Les halophiles faibles qui supportent des concentrations de NaCl comprise entre 0,05 et 1 Mole,
- ◆ Les halophiles supportant des concentrations de NaCl comprise entre 1 à 3 Moles.
- ◆ Les halophiles extrêmes supportent des concentrations supérieures à 3 Moles.

De nombreuses espèces de la famille des *Vibrionacea* sont exigeantes en NaCl, certaines peuvent supporter des concentrations allant jusqu'à 20 à 25 ‰, d'autres supportent beaucoup plus que le taux moyen de salinité de la mer (TSUCHIGA et SHINODA, 1985 in MAUGERI et BRUNI, 1991).

1.2.1. Mécanisme d'adaptation:

Toute cellule normale plongée dans un milieu trop salé, perd son eau et finit par mourir de déshydratation. A cet effet, la couche d'hydratation nécessaire pour ce fonctionnement n'est pas formée car les molécules d'eau sont toutes piégées par le sel (EISENBERG et *al*, 1992).

Chez les bactéries halophiles cette règle semble inversée, elle meurent si la concentration en sel n'est pas suffisante, nous avons donc affaire à un mécanisme adaptatif qui est expliqué par une modification du métabolisme.

Les bactéries ont développés deux mécanismes pour lutter contre la déshydratation:

Les bactéries dite halotolérantes, peuvent s'adapter à différentes sortes de concentration en sel en fabriquant en grande quantité de petites molécules, par exemple du glycérol qui s'accumulent à l'intérieur des cellules. Au final, la concentration intérieure est égale à celle de l'extérieure, donc l'eau ne s'échappe plus et les réactions biochimiques ne sont pas inhibées. Lorsque la concentration extérieure en sel diminue, cette synthèse est stoppée et les cellules continuent à vivre normalement (ZACCAI et FRANZETTI, 1999). Pour les fortes concentrations en sel, les protéines des cellules deviennent insolubles et ne sont plus fonctionnelles.

Chez les organismes halophiles extrêmes, leurs protéines restent solubles et fonctionnelles dans de fortes concentrations en sel. C'est principalement du KCl qui est accumulé dans le cytoplasme de ces microorganismes et qui empêche la sortie d'eau.

Ces protéines se dénaturent dès que la concentration en sel diminue. En se sens, on peut dire que ces protéines sont elles même halophiles (EISENBERG et *al*, 1992).

Le sel intervient aussi dans d'autres phénomènes d'ordre physiologique.

1.2.2. La physiologie des halophiles et les ions sodium

Cette adaptation aux différentes concentrations de NaCl joue un rôle important non seulement dans la croissance mais aussi dans les phénomènes physiologiques:

1) Le transport des aliments: des études faite sur *Alteromonas haloplanktis* et *Vibrio fisheri* montre que la vitesse d'utilisation de ces nutriments atteint une activité maximale lorsque la concentration en sodium est de 0,3 Mole (BIANCHI et *al*, 1988).

2) UNENOTO et *al* (1977 in BIANCHI et *al*, 1988) ont montré l'oxydation du cofacteur NADH par la NADH oxydase qui exige le Na⁺ à 0,13 Mole chez le *V.alginolyticus*.

Une autre étude étendue à *V.natrigen*s et *V.fisher*i explique que l'oxydation du NADH par cellules s'effectue au niveau de deux sites qui sont activés par Na⁺: l'un se situe à l'extérieur de la membrane cytoplasmique et l'autre localisé sur la face interne de cette dernière.

D'après SHULACHEV (1985 in BIANCHI, 1988), chez *V. alginolyticus* à pH alcalin il apparaît un potentiel électrochimique de Na⁺ couplé à la respiration qui assure des fonctions osmotiques mécaniques et chimiques.

- 3) La présence de sel est exigée par certains vibrions pour l'oxydation de leurs substrats exogènes tel que la production d'indole à partir de tryptophane.

En plus du Na⁺, d'autres ions comme K⁺, Mg⁺⁺ et Ca⁺⁺ sont nécessaires à la croissance des micro-organismes.

1.3. Les Vibrionaceae

1.3.1. Systématique:

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

Règne : Protistes
Embranchement: *Procaryotes*
Classe: *Asporulales*
Ordre: *Spirillales*
Famille: *Vibrionaceae*
Genre: *Aeromonas - Photobacterium- Vibrio -Plesiomonas* .

Les récentes études d'homologie des ARN, ont montré que *Vibrio* et *Photobacterium* seraient proches tandis que les deux autres genres sont plus distants (PRESCOTT, et al, 1995).

1.3.2-Définition:

C'est en 1965 que Véron propose la première définition claire et précise de la famille des *Vibrionaceae* (VERON 1966 in LE MINOR, 1990).

Depuis cette date, la systématique de cette famille a évolué rapidement.

Les *Vibrionaceae* vivent dans l'eau et quelques espèces peuvent être rencontrées chez l'homme ou les animaux à sang froid qui sont utilisés comme vecteur pour leur propagatio

Classiquement quatre genres forment cette famille, *Vibrio*, *Photobacterium*, *Plesiomonas* et *Aeromonas* (BAUMAN, SCHUBERT, 1987 in LEMINOR, 1990).

Cette famille est composée de bacilles, (SINGLETON, 1997):

- ◆ Mobile (à ciliature polaire ou mixte) ou immobile.
- ◆ Gram négatif.
- ◆ Chimioorganotrophes et aéroanaérobies facultatives.
- ◆ Oxydase positive.
- ◆ Réduisant les nitrates en nitrites.
- ◆ Fermentant le glucose avec ou sans gaz.
- ◆ Se cultivant assez bien sur milieu ordinaire.

Les principaux caractères différentiels des 4 genres formant la famille, sont présentés dans le tableau 2.

- ◆ La présence d'oxydase est la caractéristique de 3 genres à l'exception de *Photobacterium* où sa présence est variable.
- ◆ L'arginine dihydrolase permet de différencier les *Vibrio* des trois autres genres.
- ◆ Le genre *Vibrio* et *Photobacterium* sont caractérisés par l'halophilie par rapport aux autres genres.
- ◆ La sensibilité au O129 est positif pour le genre *Vibrio* et *Photobacterium*, variable pour *Plesiomonas* et négative chez *Aeromonas*.

Tableau 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>Photobacterium</i>
Halophilie	D	-	-	+
Ciliature	PM _v	PL	PM	PM
Oxydase	+	+	+	D
Arginine dihydrolase	-	+	+	+
Lysine décarboxylase	+	+	D	+
Ornithine décarboxylase	D	+	-	-
Sensibilité O129	+	D	-	+

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

Plusieurs espèces du genre *Vibrio* se distinguent par la bioluminescence et au moins deux espèces de *Photobacterium* sont parmi les quelques bactéries marines douées de ce caractère.

Néanmoins selon la classification du Bergey's Manuel (systématique bactériologique, 1984), le genre *Photobacterium* a été regroupé dans le genre *Vibrio*.

Sous des conditions optimales, les bactéries suivantes émettent une faible lumière ***(HAROLD et EDDLEMM, 1999).

- ◆ *V.cholerea* émet une faible lumière à 40°C.
- ◆ *V.fisheri* émet une lumière jaune orangé, cultivé à 30°C.
- ◆ *V.phosphorium* (*Photobacterium*) émet de la lumière à partir des organes lumineux de certains poissons et dans l'eau de mer, c'est une bactérie qui se cultive à 4°C.
- ◆ *V.harveyi* (*Lucibacterium*) émet peu de lumière.
- ◆ *V.logei* cultivé à 4°C émet de la lumière.
- ◆ *V.natriegens* (*Beneckea*) émet une faible lumière, elle peut survivre une année dans un réfrigérateur lumineux.
- ◆ *V.splendidus1* cultivé à 40°C, émet une lumière sombre.

Bien que la plupart de ces bactéries soient libre, *P.phosphoreum* et *P.leiognathi* vivent en symbiose dans les organes lumineux des poissons (PRESCOTT et al, 1995).

De nombreuses espèces de *Vibrionaceae* sont saprophytes. Quelques unes sont pathogènes pour l'homme (*V. cholerae*, *V. parahemolyticus* et *Photobacterium shigelloides*) ou pour les animaux à sang froid (*Aeromonas salmonicida*) (LEMINOR, 1990).

1.4. Les Vibrions:

Le nom *Vibrion* a été utilisé dès le 17^{ème} siècle pour décrire des bactéries mobiles, de forme incurvée ou spiralée (LEMINOR, 1990)

Le genre *Vibrio* comprend plus de 30 espèces toutes aquatiques; les unes sont halophiles strictes, les autres non (LECLERC, 1993).

1.4.1. Historique du genre Vibrio:

Lors de l'épidémie du choléra sévissant à Florence en 1854, PACINI observe au microscope, sur la muqueuse de l'intestin de cadavres, une bactérie incurvée et très mobile qu'il a considérée comme l'agent pathogène du choléra (VERON et POPOFF, 1990).

Mais c'est Koch en 1883 – 1884 qui montre que «le bacille virgule» est bien l'agent pathogène responsable du choléra (LESNE et FOURNIER, 1997 *in* SUTRA *et al*, 1998).

Le 19^{ème} siècle a connus 7 grandes pandémies, la première a débutée en 1817 et a duré jusqu'à 1823, elle part de la Chine, gagne la Perse puis Bagdad et la Syrie, l'Egypte et le Caucase (LE GUYON, 1960).

La deuxième débute de 1826 à 1832, elle part de l'Afghanistan, la Perse, le Caucase, passe en Russie, puis en Allemagne à Dantzig et Hambourg, puis elle est signalée en Autriche, puis en Angleterre, à Calais, à Paris et finit en Amérique.

La troisième débute en 1846 jusqu'à 1861, elle fait des ravages en Arabie. La quatrième va de 1863 à 1876.

En 1883, se propage la cinquième pandémie par voie maritime, la sixième frappe la Russie, la Turquie, l'Angleterre et Paris de 1892 à 1896 (MOREIRA, 2000).

La septième débute en 1902, elle atteint l'Algérie en 1971 (GUECHI, 1985). La figure (1) montre l'expansion de la septième pandémie.

Il est possible qu'une 8^{ème} pandémie ait eu lieu en 1992 (LESNE et FOURNIER 98). La figure 2 montre la répartition du choléra en 1994 dans certaines régions du monde.

Toutes les espèces de *Vibrions* découvertes de 1854 à nos jours sont classées dans le tableau 3.

La deuxième espèce de *Vibrio* pathogène autre que *V.cholerae* a été décrite par GAMALEIA en 1888, et nommé *V metschnikovii* (SKERMAN *et al*, 1980).

Une autre espèce de *vibrio* pathogène pour l'homme et pathogène également pour les animaux marins; a été isolé en 1951: *V.parahaemolyticus*.

Dans les années 80 de nombreuses autres espèces de *Vibrions* ont été décrites dont quelques unes seulement sont pathogène pour l'homme.

Entre 1991 et 1997, 9 nouvelles espèces ont été décrites dans la littérature (FOURNIER, et LESEN, 1998).

Quatre autres espèces ont été découvertes entre l'an 1999 et 2000, (SHIEH ET CHEN, 2000).

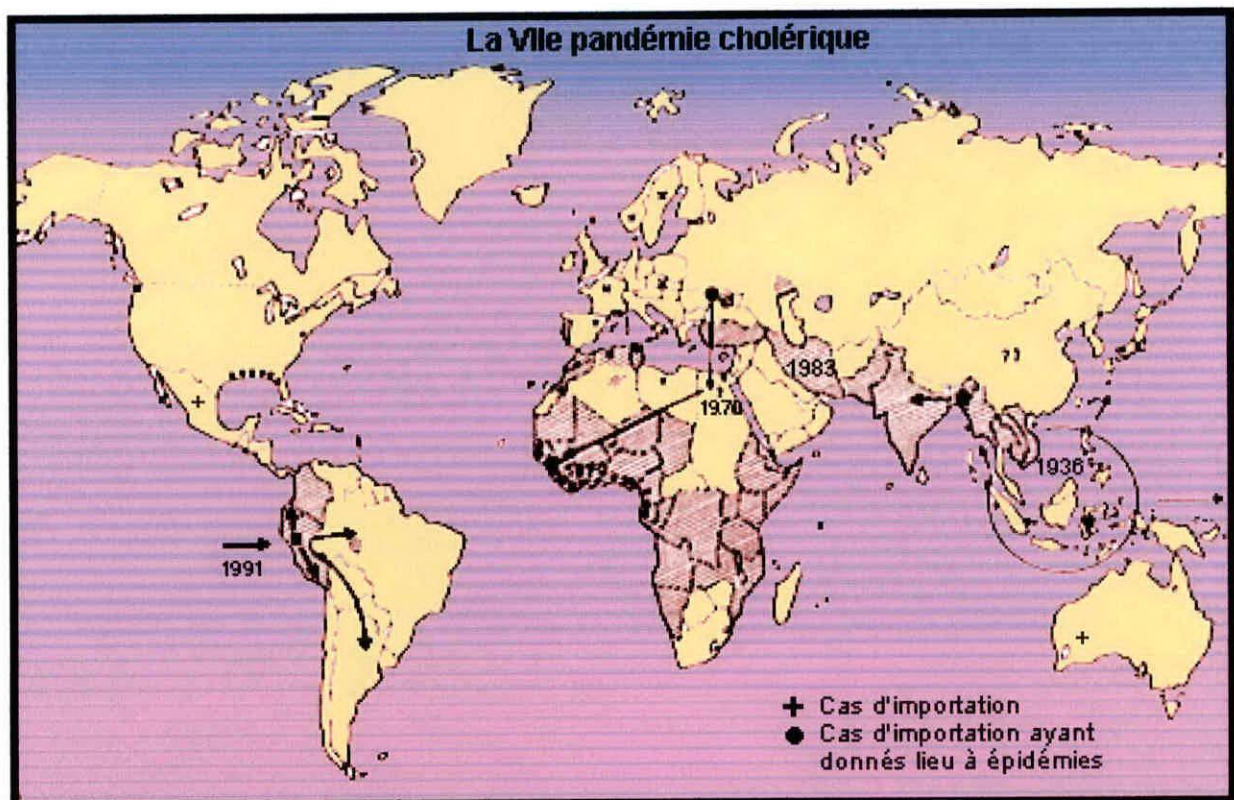


Figure1: La 7^{ème} pandémie cholérique dans certaines régions du monde (Lesne et Fournier 98).

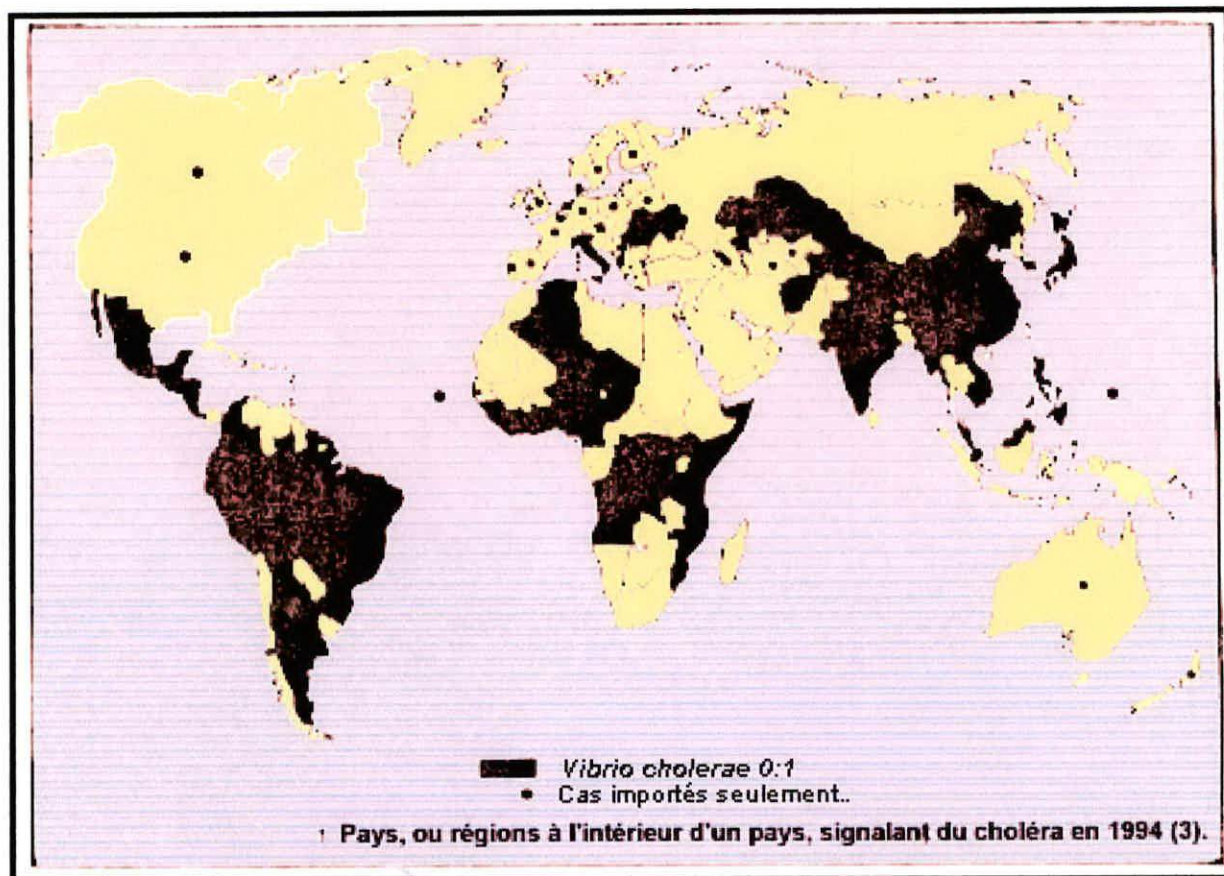


Figure2: Répartition du choléra en 1994 dans certaines régions du monde (Lesne et Fournier 98).

Tableau 3: Les espèces du genre *Vibrio* découvertes de 1854 à nos jour (LUNDER et al, 2000).

Espèces	Microbiologiste isolant	Année	Espèces	Microbiologiste isolant	Année
<i>V.cholerae</i>	Pacini	1854	<i>V.diazotrophicus</i>	Guerinot et al	1982
<i>V.metschnikovii</i>	Gamaleia	1888	<i>V.hollisae</i>	Hickram et al	1982
<i>V.fischeri</i>	Beiyrinck et al	1889	<i>V.aestuarians</i>	Tison et Seidler	1983
<i>V.marinus</i>	Russell	1892	<i>V.orientalis</i>	Yang et al	1983
<i>V.albensis</i>	Lehman et Newmann	1896	<i>V.tubialis</i>	Hoda et al	1983
<i>V.splendidus</i>	Beijerinck et al	1900	<i>V.furnissii</i>	Bremmer et al	1984
<i>V.anguillarum</i>	Bergman	1909	<i>V.lachariae</i>	Grimes et al	1985
<i>V.harveyi</i>	Johnson et hink	1936	<i>V.gincinnatiensis</i>	Brayton et al	1986
<i>V.costicola</i>	Smith	1938	<i>V.mediterrannei</i>	Pujalte et Gway	1986
<i>V.parahaemolyticus</i>	Fujino et al	1951	<i>V.salmonicida</i>	Egidius et al	1986
<i>V.natriegens</i>	Payne et al	1961	<i>V.navarrensis</i>	Urdaci et al	1991
<i>V.alginolyticus</i>	Miyanoto et al	1961	<i>V.mytili</i>	Pujalte et al	1993
<i>V.succinogenes</i>	Woline et al	1961	<i>V.iliopiscarivs</i>	Onarhein et al	1995
<i>V.proteolyticus</i>	Merkel et al	1964	<i>V.penaeicida</i>	Ishimaru et al	1995
<i>V.nigripulchritudo</i>	Baumann et al	1971	<i>V.ichthyoenteri</i>	Ishimaru et al	1996
<i>V.pelagius</i>	Baumann et al	1971	<i>V.trachuri</i>	Iwamoto et al	1996
<i>V.alginolyticus- iophagus</i>	Welton et woods	1973	<i>V.tapetis</i>	Boneyolt et al	1996
<i>V.vulnificus</i>	Reichelt et al	1979	<i>V.diabolicus</i>	Raguenes et al	1997
<i>V.nereis</i>	Harwood et al	1980	<i>V.scophthalmi</i>	Gerda-guellar et al	1997
<i>V.logei</i>	Harwood et al	1980	<i>V.haliotocoli</i>	Sawabe et al	1998
<i>V.gazogenes</i>	Harwood et al	1980	<i>V.pectenicida</i>	Lambert et al	1998
<i>V.fluvialis</i>	Lee et al	1981	<i>V.rumoiensis</i>	Yonoto et al	1999
<i>V.campbellii</i>	Baumann et al	1981	<i>V.wodanis</i>	Lunder et al	2000
<i>V.ordalii</i>	Schiewe et al	1982	<i>V.viscosus</i>	Lunder et al	2000
<i>V.mimicus</i>	Davis et al	1982	<i>V.aerogenes</i>	Shieh et al	2000

1.4.2-Classification:

La classification des vibriens fut longtemps influencée par leur morphologie: forme incurvée singulière et par l'extraordinaire pouvoir pathogène du Vibrien cholérique, ces deux caractères ont en réalité une importance taxonomique (LEMINOR, 1990).

De nombreuses études ont permis de classer les différentes espèces de Vibriens, cette classification est basée sur les données physiologique, génétique et biologique.

Parmi toutes les espèces de Vibrions, *V.cholerae* est l'espèce type (VERON et POPOFF, 1990).

1.4.2.1 La classification selon l'halophilie:

Ces Vibrions sont classés en 2 groupes: les espèces qui tolèrent de faible concentration de NaCl, nommées halotolérantes, parmi ces espèces: *V.cholerae*, *V.cholerae non 01*, *V.mimicus*, *V.metschnikovii* (DODIN et al, 1986; URDACI, 1987).

L'autre catégorie, celles qui tolèrent une concentration qui varie de 0,1 à 25 % et qui sont nommées halophiles strictes (BRISOU, 1980). Parmi ces espèces on cite: *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, *V.furnissii* et *V.costicola* (BRISOU, 1980; VERON et POPOFF, 1990).

1.4.2.2-La classification selon les caractères biochimiques:

Le caractère oxydase nous permet de différencier *V.metschnikovii* et *V.gazogene* des autres car elles sont oxydase négative.

Ces deux espèces ne réduisent pas les nitrates, ce caractère sert aussi à les différencier.

Ces deux espèces diffèrent par le fait que le *V.gazogene* est capable de produire le gaz en glucose alors que *V.metschnikovii* n'en produit pas (URDACI, 1987, BERGEY, 1994; ALISINA et BLANCH, 1994).

1.4.2.3-La classification selon Les caractères antigenique :

D'après l'OMS, *V cholérique* est un germe agglutiné par un sérum OM1, c'est à dire qu'il possède un antigène "O" désigné o:1 agglutinable par le sérum o:1 (DODIN et DOSSO, 1986).

C'est une caractéristique nécessaire et suffisante qui le différencie des vibrions non agglutinable, qui ne possèdent pas cet antigène, vibron non cholérique (V.N.C) (LECLERC, et al 1995).

1.4.2.4-Classification selon la pathogénicité pour l'homme:.

Le tableau 4 présente 41 espèces du genre *Vibrio* classées en espèces pathogènes et non pathogènes pour l'homme. Onze espèces seulement sont connues pathogènes pour l'homme.

Tableau 4: Le genre *Vibrio* jusqu'à 1998 (LESNE et FOURNIER, 1998)

Espèces pathogènes pour l'homme (11)	Espèces non pathogènes pour l'homme (29)
<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>	<i>V. aesturianus</i> <i>V. anguillarum</i> <i>V. campbellii</i> <i>V. costicola</i> <i>V. diabolicus</i> <i>V. diazotrophicus</i> <i>V. fischeri</i> <i>V. gazogène</i> <i>V. harveyi</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. navarrensis</i> <i>V. natriegens</i> <i>V. nereis</i> <i>V. nigripulchritudo</i> <i>V. ordalii</i> <i>V. orientalis</i> <i>V. pelagius</i> <i>V. pennaeicida</i> <i>V. proteolyticus</i> <i>V. salmonicida</i> <i>V. scophtalmi</i> <i>V. tapetis</i> <i>V. trachuri</i> <i>V. tubiashii</i>

1.4.3-Les caractères bactériologiques:**1.4.3.1-Morphologie:**

Les représentants du genre *Vibrio* apparaissent sous forme de bacilles droits ou incurvés, de 0,5–0,8 µm de longueur, sans endospore, ni microcyste, donnant une coloration de Gram négative (URDACI, 1987).

Les *Vibrions* sont doués d'une grande mobilité grâce à une ciliature polaire monotriche ou lophotriche (MEYER *et al.*, 1995). Les flagelles sont inclus dans une gaine émanant de la partie externe de la paroi cellulaire. Sur milieu solide, ils élaborent des flagelles latéraux, la présence de tels flagelles explique en partie le phénomène de «Swarming» ou d'essaimage. Ces flagelles latéraux ont un diamètre de 14 à 15 nm et une longueur de 0,9 µm (URDACI, 1987).

La plupart des espèces forment des colonies lisses, crémeuses, translucides, convexes à bord entier et de couleur blanchâtre (MARCHAL *et al.*, 1987; HARRIS *et al.*, 1996).

1.4.3.2-Caractères cultureux et métaboliques :

Les *Vibrions* se développent rapidement et sur une grande variété de milieu, leurs croissance est favorisée par les ions «Na⁺». Cette halophilie peut être modérée ou stricte (SINGLETON, 1997).

Du point de vue de la relation avec l'oxygène, les *Vibrions* se comportent comme des bactéries aéro-anaérobie.

Les *Vibrions* aérobies préférentiels sont aérophiles et forment des voiles plus ou moins fins à la surface des milieux liquides (PRESCOTT *et al.*, 1995).

Toutes les espèces se cultivent à 20°C, la plupart à 30°C, quelques unes à 40°C et 45°C, aucune à 50°C. Seules les souches de *V. metschnikovii* sont capables de croître dans l'eau peptonée (1%) sans addition de chlorure de sodium; toutes les autres espèces exigent la présence de Na⁺ pour leur croissance.

Un pH élevé entre 7,6 - 9 facilite la multiplication. des *Vibrions*. La plupart des espèces de *vibrions* n'ont pas besoin des facteurs de croissance organiques, sauf après une période de conservation prolongée (URDACI, 1987).

Les espèces de *Vibrio* présentent des métabolismes oxydatif et fermentatif, elles sont toutes chimio-organotrophe. La pluparts sont capables de pousser sur milieu minéral contenant du glucose et du chlorure d'ammonium.

Elles dégradent toutes le glucose dans les conditions d'anaérobiose par fermentation mixte avec comme produits finaux: les acides acétique, formique, lactique, pyruvique, succinique aussi bien que l'alcool éthylique.

Le nombre de composés organique pouvant servir de sources de carbone, d'énergie, diffère considérablement selon les espèces. Ces composés comprennent les pentoses, les hexoses, les disaccharides, les polysaccharides, les acides organiques, les alcools, l'acides gras, le monocarboxylique, les acides aminés, les substances aromatiques monocycliques.

La plupart des espèces libèrent des exo-enzymes telles que l'alginate, l'amylase, la chitinase, la désoxyribonucléase, la gélatinase et la lipase (DELLATTRE; *et al.*, 2000).

La grande majorité des représentants du genre *Vibrio* sont oxydase positive, propriété qui correspond à la présence de cytochromes de type C permettant de les différencier des membres de la famille des Enterobacteriaceae avec cependant deux exceptions: *V. Gazogene*, *V. metschnikovii*, oxydase négative, Seules ces espèces ne réduisent pas les nitrates en nitrites alors que toutes les autres espèces possèdent une nitrate réductase (URDACI, 1987; ALSINA et BLANCH, 1994).

Aucune espèce ne dénitrifie jusqu'au stade de l'oxyde nitreux ou de l'azote moléculaire.

1.4.4. Habitat-Ecologie

Le genre *Vibrio* comprend plus de 30 espèces qui toutes sont d'habitat aquatique (LECLERC, 1995).

Les *vibrions* halophiles présents essentiellement dans les milieux salés ou lagunaires; les *vibrions* non ou faiblement halophiles tel que *V. cholerae* peuvent avoir comme habitat les eaux douces et saumâtres avant de coloniser l'intestin humain (LESNE et FOURNIER, 1998). Les *Vibrions* halophiles modérés poussent en eau peptonée contenant 3 et 5 % de NaCl (URDACI, 1987).

Ils sont des hôtes très fréquents des fruits de mer d'où des intoxications, on cite quelque uns: *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. alginolyticus*, *V. furnissii*, *V. fluvialis* (GELINAS, 1995; LEMOINE et al, 1999).

Une place particulière doit être faite à certains *Vibrions* halophiles contaminant des orifices naturels (oreille, sinus).

Ils peuvent être associés à la surface de racines des plantes aquatiques comme *V. mimicus*; aux particules des sédiments comme *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus* et aux particules en suspension du plancton (DACOSTA, 1995; LEMOINE, 1999).

Le *Vibrion* se trouve dans l'intestin du malade, il est évacué en grande quantité dans les selles; *V. cholerae* se multiplie très rapidement dans le contenu intestinal des malades (FOURNIER, 1998). Ce microorganisme peut passer dans le sang, peut être éliminé par l'urine, occasionnellement par des vomissements (LE GUYON, 1960).

Une étude conduite par la Food and Drug Administration (FDA) aux USA pendant la période allant de 1981 à 1988, évalue les fréquences d'isolement de *Vibrio* dans différents produits de la mer (tableau 5).

Tableau 5 : Fréquence d'isolement de différentes espèces de *Vibrio* dans différents produits de la mer (LESNE et FOURNIER, 1998).

Denrée examinée	<i>Vibrio</i> isolée	Fréquence dans la denrée	Référence
Crevettes fraîches et congelées	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i> <i>V. cholerae non 01</i> <i>V. fluvialis</i>	30 %	PRASARD <i>et al</i> , 1994
Crevettes et poissons	<i>Vibrio.spp.</i>	13 à 36 %	LOWRY <i>et al</i> , 1989
Huîtres crues (FLORIDE, USA)	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	100 % 67 %	WONG <i>et al</i> , 1992; 1994
Huîtres cuites	<i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. vulnificus</i>	50 % 25 %	LOWRY <i>et al</i> , 1989
Crevettes crues congelées importées du Mexique de Chine et d'Equateur	<i>Vibrio spp</i>	36 %	BERRY <i>et al</i> , 1994
Huîtres crues originaires de la côte brésilienne	<i>V. alginolyticus</i> <i>V. parahaemolyticus</i> <i>V. cholerae non 01</i> <i>V. fluvialis</i> <i>V. furnissii</i> <i>V. mimicus</i> <i>V. vulnificus</i>	81 % 77 % 31 % 27 % 19 % 12 % 12 %	MATTE <i>et al</i> , 1994

1.4.5 Les infections dues aux Vibrions :

Le pouvoir pathogène est la propriété que possèdent certains germes de provoquer une maladie (HASLAY et LECLERC, 1993).

Les infections dues aux Vibrions pathogènes sont résumés dans le tableau 6.

Les *Vibrions* sont responsable des diarrhée parétale abondante et aqueuse, entraînant des déshydratations extrêmes, une perte d'électrolytes, des vomissements spontanés, des fièvres, des suppurations, des septicémies et des otites qui sont causés principalement par *V. alginolyticus*.

Tableau 6: Formes cliniques, des infections à *Vibrion* non cholérique (SUTRA et al, 1998).

Micro organisme	Véhicule de transmission	Formes clinique principale	Facteurs de risque chez l'hôte
<i>V.cholerae non pathogene 0139</i>	Eau de mer , fruits de mer	Gastro-entérites, otite, infection des tissus mous, septicémie	Plaie, cirrhose, Immunodéficience
<i>V.parahaemolyticus</i>	Eau de mer , fruits de mer	Gastro-entérites, infection des tissus mous,	Plaie, cirrhose, immunodéficience
<i>V.vulnificus</i>	Eau de mer , fruits de mer	Infection des tissus mous, septicémie	Plaie, cirrhose, diabète hemo-chromatoses, immunodéficience
<i>V.alginolyticus</i>	Eau de mer	Infection des tissus mous, otite	Plaie, perforation du tympan, otite, pré-existante
<i>V.carchaiae</i>	Requin	Infection des tissus mous	Plaie
<i>V.cincinnatiensis</i>	Eau de mer	Sépticémie	Inconnus
<i>V.furnisii</i>	Fruits de mer	Gastro-entérites	Inconnus
<i>V.fluvialis</i>	Eau de mer , fruits de mer ; poissons	Gastro-entérites, Sépticémie	Cirrhose
<i>V.metschnikovii</i>	Inconnu	Sépticémie	Inconnus
<i>V.mimicus</i>	Eau de mer , fruits de mer	Infection des tissus mous, otite	Inconnus

Les humains sont les seules hôtes naturels de *V.cholerae*, la transmission est faite par l'eau, les produits de la mer (OMS, 2000).

Le tableau 6 regroupe les formes cliniques principales, les facteurs de risque, chez l'hôte et les véhicules de transmission fréquents des 11 espèces de *Vibrions* pathogènes connus jusqu'en 1998 (FOURNIER et LESNE, 1998).

Les *Vibrions* affectent non seulement l'homme mais aussi les produits marins:

- ♦ Les algues peuvent être contaminés par des souches (HARRIS et al, 1996).
- ♦ En pathologie des poissons, dans le domaine infectieux, *V.anguillarum* est l'agent le plus pathogène chez les poissons et les autres animaux marins (VANDERZANT et NICKELS, 1972 in BRUNI et al, 1984); ROUABAH et al, (1988). *V.parahaemolyticus* et *V.alginolyticus* sont aussi considérés comme pathogènes pour les animaux marins selon SINDERMAN et al (1979 in BRUNI et al, 1986).

Des études bactériologiques ont permis de découvrir des maladies des produits de la mer liées au *vibrio* (tableau 7):

- ◆ Une maladie appelée maladie de l'anneau brun chez les palourdes, causée par *V. tapetis* (FIGUERAS et al, 1996).
- ◆ *V. anguillarum* est responsable d'ulcération et vibriose chez plusieurs hôtes, de septicémies et vibrioses chez le turbot (*Scophthalmus maximus*).
- ◆ Une maladie d'ulcération chez le saumon causée par *V. ordalii* (DECLERCK, 1991).
- ◆ Plusieurs maladies sont causées par *V. harveyi* chez les huitres, requins et crevettes (BULLOCK, 2000).

Tableau 7: Maladies de poissons causées par quelques espèces de *vibrio*. (DECLERK, 1991; ASSEFSAF et LEUBNA-DJEMMAZI, 1996; FIGUERAS et al, 1996).

Espèces	Maladies	Environnements	Hôtes
<i>V.ordalii</i>	Ulcération	Eau douce, eau de mer, aquaculture	Saumon
<i>V.anguillarum</i>	Vibrioses	eau de mer eaux saumâtres, aquaculture.	Plusieurs produits marin
	Septicémie, vibriose	eau de mer	Turbot (<i>Scophthalmus maximus</i>)
	Lésion du muscle	eau de mer	Saumon
Certaines espèces de <i>vibrio</i>	Necrose des muscles et des ligaments associés aux piquants	Eau de mer	L'oursin
<i>V.tapetis</i>	Anneau brun	Eau de mer, aquaculture	Palourde
<i>V. harveyi</i>	Gastro-entérites Infections Léthargie, anorexie, Nécroses des reins et des kystes sous cutanées	Aquaculture eau de mer Aquaculture	Merou Huitres perlières Requins
	Dégénérescence tissulaire de l'hépatopancréas	Aquaculture	Crevettes
<i>V.vulnificus</i>	Des lésions	Eau de mer	Huitres
<i>V.damsela</i>	Ulcère sur la peau	Aquaculture	Requins
<i>V.salmonicida</i>	Anémie et hémorragie	Elevage	Saumons

Matériel et méthodes

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. PRESENTATION DE LA ZONE D'ETUDE

2.1.1. Situation géographique :

La localité de Sidi-Fredj est une presqu'île située dans la partie Ouest de la baie d'El Djamilia qui mesure 6 Km de long (figure 3). Cette zone est délimitée par deux promontoires rocheux : Sidi Fredj à l'Ouest et Ras Acrata au Nord Est (figure 3).

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 presque 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.

2.1.2. Description du site étudié :

La plage Ouest est délimitée au Nord par la digue du centre de la 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 des gargotes. Certaines de ces habitations rejettent leurs eaux usées sur la plage.

Cette plage est très fréquentée durant la période estivale.

2.1.3. Choix des stations :

Pour des raisons pratiques de proximité et de moyens, nous avons opté pour une seule station de prélèvement qui se situe à 50 m de l'Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral.

2.2. METHODE D'ETUDE :

2.2.1. Etude des paramètres physico-chimiques:

La mesure des paramètres, température et potentiel d'hydrogène est nécessaire, et complémentaire à l'analyse microbiologique des échantillons.

Ils nous permettent de vérifier que les conditions sont normales. Toute variation de ces paramètres nous indique qu'il y'a une pollution.

Deux paramètres physico-chimiques ont été relevés:

La température (T°C): La température est mesuré in situ, à l'aide d'un thermomètre gradué de 0°C à 40°C. Celui ci est plongé dans l'eau quelques minutes.

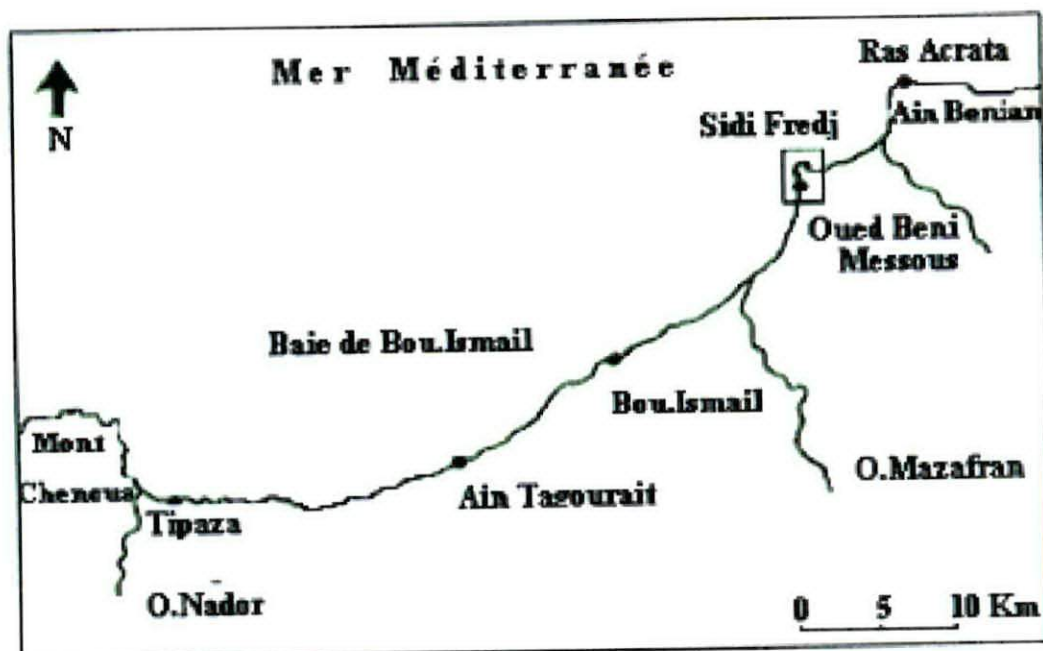


Figure 3: Situation géographique de la presqu'île de Sidi Fredj.

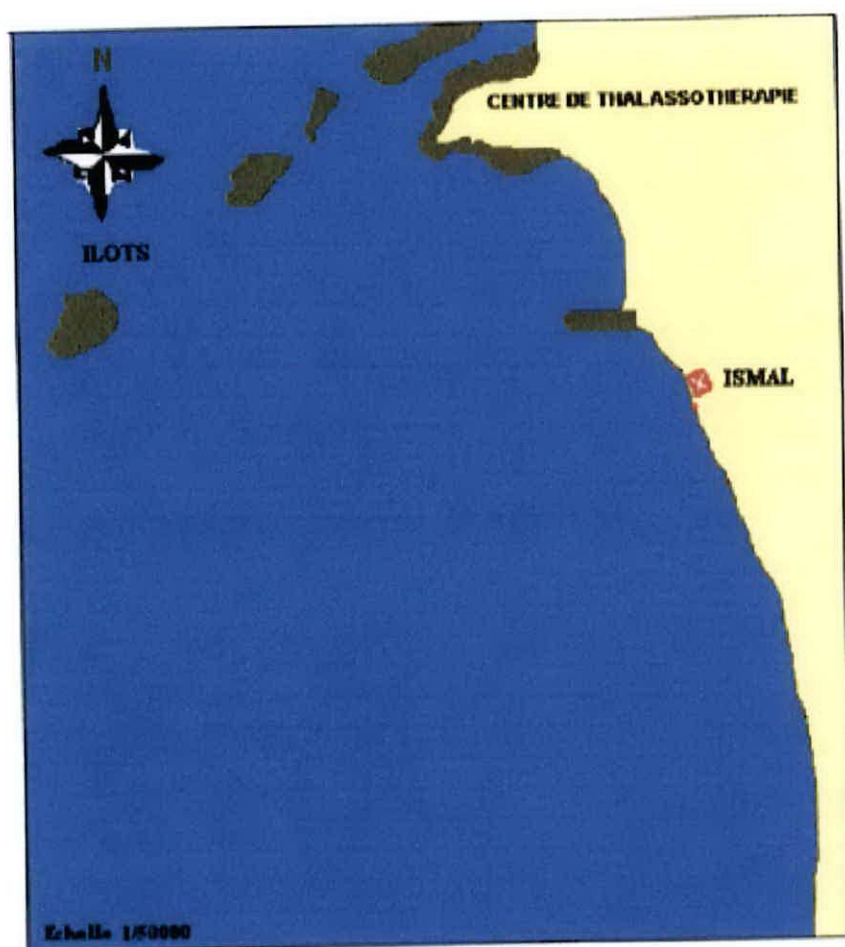


Figure 4: (+) Positionnement de la station de prélèvement.

Le potentiel d'hydrogène (pH) : La mesure du pH se fait au laboratoire à l'aide d'un pH-mètre électronique muni d'une électrode, de type «HANNA HI 8521», la mesure se fait après étalonnage de l'appareil avec des solutions tampon de pH7 et pH9.

2.2. Diagnostique bactériologique

2.2.1-Prélèvement des échantillons d'eau de mer.

Les prélèvements d'eau de mer destinés à l'analyse bactériologique doivent s'effectuer dans des conditions d'aseptie rigoureuse. Deux prélèvements sont effectués, un flacon destiné à la mesure des paramètres physico-chimiques, le second est destiné à l'analyse bactériologique.

Les bouteilles sont plongées à 20 cm de la surface, elles sont ouvertes et fermées dans l'eau pour éviter toute contamination, en prenant soin de laisser une certaine quantité d'air à l'intérieur de la bouteille pour l'homogénéisation.

Les échantillons recueillis sont transportés au laboratoire à température ambiante.

2.2.2-isolement des souches bactériennes :

La recherche des *Vibrions* effectuée est qualitative et quantitative, leur mise en évidence nécessite une étape d'enrichissement, une étape d'isolement, une étape de purification et l'identification biochimique.

Trois pH différents sont utilisés 8.5, 9 et 9.4.

- L'étape d'enrichissement s'effectue en eau peptonnée alcaline (EPA) 10x concentré enrichie de 2.5% de NaCl (annexe 2-2), préparée dans trois flacons de 200 ml au trois pH différents. Ces flacons sont remplis de 180 ml d'eau de mer. L'incubation se fait à 30°C pendant 18 à 24h (figure 5).
- L'étape d'isolement est pratiquée sur milieu sélectif TCBS (Thiosulfate, citrate, bile, saccharose) (annexe 2-2). Un volume de 0.1ml pris des différentes dilutions préparés de -1 à -4 est étalé à l'aide d'un rateau sur la gélose TCBS. Trois boîtes de Pétrie sontensemencées pour chaque dilution afin de réaliser l'étude quantitative. L'incubation des boîtes est faite en position renversée à des T°C de 30°C pendant 24h.
- L'étape de purification est réalisée, les colonies présomptives choisies en fonction de la forme, l'aspect et la couleur, sont réisolées sur TCBS, la notation du pH initiale est nécessaire sur chaque boîte. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24h (figure 5).
- Les colonies suspectes sont soumises à des examens biochimiques.

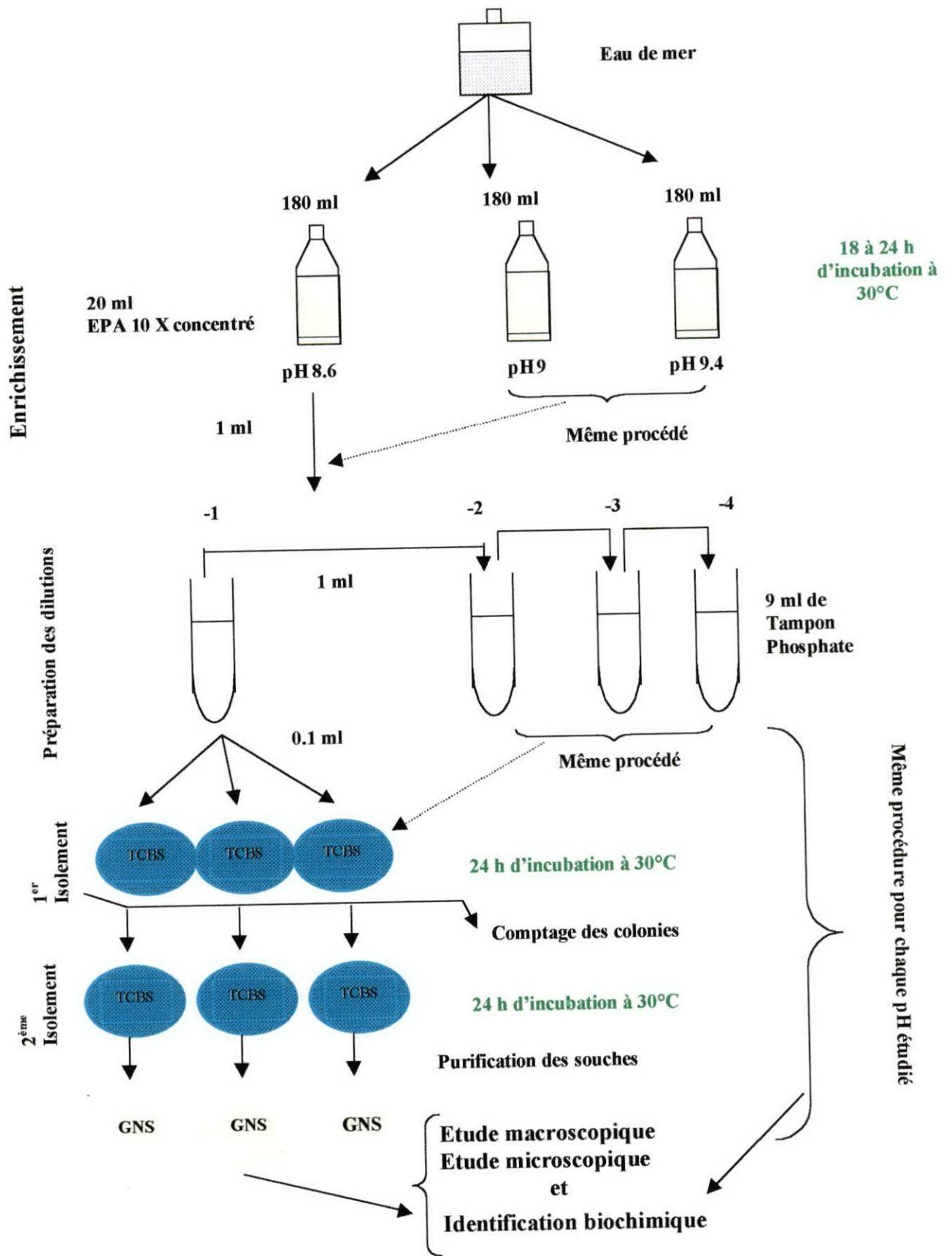


Figure 5: Technique de recherche des vibrios marins en fonction du pH.

2.3. Méthode d'identification

2-3-1. Etude qualitative :

a-Aspect macroscopique :

Les colonies sont observées à l'oeil nu et sous une loupe binoculaire, plusieurs membres des vibriens montrent une variation de la morphologie des colonies sur milieu non inhibiteur.

b-Aspect microscopique :

Une coloration de Gram est effectuée (annexe 2-1) à partir d'une culture de 24h. Seulement les souches Gram négative, batonnet en forme de bacille incurvé ou coccobacille sont retenue pour poursuivre les tests biochimiques.

c-Tests biochimiques :

Les tests biochimiques effectués sont résumés dans le tableau (8), seuls les tests qui caractérisent les vibriens sont développés. Tous les milieux de cultures utilisés ont été ajusté en NaCl à une concentration de 20% :

c.1. Oxydase :

L'oxydase est recherchée avec le disque oxydase (annexe2-2) à partir d'une colonie de 24h, l'apparition d'une coloration violette est considérée comme positive.

c-2-Fermentation des glucides :

Un milieu de base est utilisé (annexe 2-2). Les différents sucres à testés sont : arabinose, fructose, galactose, glycérol, glucose, maltose, mannitol, mannose, rhamnose, saccharose, lactose. Les lectures sont poursuivies durant toute la semaine.

c-3-Croissance à différentes concentrations de NaCl :

On incube à 30°C pendant 2 jours un bouillon peptoné renferment différentes concentrations en chlorure de sodium 0%-5%-7% et 10%.

c-4-Type respiratoire :

Il est déterminé sur milieu Hugh et Leifson salé (annexe 2-2). Deux tubes sontensemencés par souches, l'ensemencement est fait par piqure centrale dont un est recouvert d'une couche d'huile de vaseline stérile, le virage dans ce tube, de l'indication du pH du bleu au jaune indique une dégradation fermentative du glucose qui est la source de carbone et d'énergie du milieu.

Tableau 8 : Testes biochimiques pour l'identification des Vibrions (* voire annexe)

But	Test	Substrat	Milieu	Mode d'ensemencement	Produit / enzymes	Condition respiratoires	Après 24 heures d'incubation à 30°C	Réactifs ajoutés	Lecture (coloration)	
									Négative	Positive
Recherche de l'oxydase	Oxydase	Oxalate de diméthyl paraphénylène diamine	-	Une colonie	Oxyolase	Aérobiose		-	Rose	Violet
Recherche de nitrate réductase	N.R.	Nitrates	Bouillon nitraté	Quelques gouttes d'une suspension microbienne	Réduction en nitrate	Aérobiose		5 gouttes de Greïfs I et Greïfs II	Coloration rouge sinon addition de poudre de zine Incolore rose/rouge	
Métabolisme des glucides	Glucose	Type respiratoire	Hugh & Leifson	Piqûre centrale	Dégradation oxydative/ fermentation du glucose	Aérobiose/ anaérobiose		-	Bleu	Jaune
	Fermentation des glucides	Ara, Fru, Gala, Mal, Rh, Lac, Sac, Gly, Man *	Fermentation des glucides à 1% V/V *	Quelques goutte d'une suspension microbienne	Fermentation des sucres	Aérobiose		-	Jaune	Orange
	Recherche de l'ONPG hydrolase	Orthonitrophényl e-B-D galactopyranoside	-	Un disque ONPG dans une suspension microbienne	B-Galactosidase	Aérobiose		-	Jaune	Incolore
	Hydrolyse de l'amidon	Amidon	Gélose amidon	Par touche	Amylase	Aérobiose		Lugol	Bleu foncé	Auréole jaune
Etude des dérivés de l'acide pyruvique	Rouge de méthyle RM	Glucose	Clark et Lubs	Quelque gouttes d'une suspension microbienne	Production d'acides mixtes	Aérobiose		Rouge de méthyle	Coloration jaune	Coloration rouge
	Réaction de voges-Proskauer	Glucose	Clark et Lubs	Idem	Production d'acétoïne	Aérobiose		VP1 et VP2 lecture après 10mn	Coloration rouge cerise	Coloration jaune/rose
Métabolisme lipidique	Recherche d'une esérase	Tween 80	Gélose tween 80	Par touche	Esterase	Idem	-	Halo opaque	Inchangé	

Tableau 8 (suite): Testes biochimiques pour l'identification des Vibrions

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 goutte de Frasier	Pas de précipité blanchâtre	Précipité blancâtre
Dégradation des acides aminés	Recherche des décarboxylases	L C D	Lysine	Möeller	Quelques goutte d'une suspension microbienne	Lysine décarboxylase	anaérobiose	-	Coloration violet	Coloration jaune
		O D C	Ornithine			Ornithine décarboxylase				
		A D H	Arginine			Arginine décarboxylase				
	Tryptophane désaminase TDA	L-tryptophane		Urée -Indole	Idem	Tryptophane désaminase	Aérobiose	2 gouttes de perchlorure officinal	Coloration rouge crun (précipité)	Coloration jaune orangé
	Recherche d'une uréase	Urée		Urée -Indole	Idem	Uréase	Idem	-	Coloration rouge	Inchangé jaune
Production d'indole	Tryptophane		Urée -Indole	Idem	Tryptophane	Idem	Quelques gouttes de Kovacs	Anneau en surface rouge	Anneau brunâtre	
Production de H ₂ S	KIA	Thiosulfate		Hajna-Kliger	Culot : piqure centrale	Production de H ₂ S	Idem	-	Noircissement du culot	Inchangé
Métabolisme lipidique	Recherche d'une estérase	Tween 80		Gélose tween 80	Par touche	Esterase	Idem	-	Halo opaque	Inchangé

d. Sensibilité aux antibiotiques (ATB)

La méthode standardisée de l'antibiogramme selon les recommandations de l'OMS, (1999) a été utilisée.

Milieu :

Gélose Mueller Hilton, coulée en boîtes de Pétrie sur une épaisseur de 4 mm, les géloses sont séchées avant l'emploi.

Inoculum :

A partir d'une culture pure de 18h sur milieu d'isolement un touché est fait à l'aide d'une anse. Afin de préparer une solution en déchargeant l'anse dans 10 ml d'eau physiologique stérile, la suspension bactérienne est bien homogénéisée, sa densité optique «DO» doit être comprise entre 0.08 et 0.10 à 625nm.

L'inoculum peut être ajusté en ajoutant de la culture s'il est trop faible ou bien on ensemence dans les 15 mn qui suivent sa préparation.

Ensemencement :

Un écouvillon stérile est trempé dans la suspension bactérienne, essoré en pressant sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum. On frotte l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées, l'opération est répétée deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois. L'écouvillon est rechangé, pour chaque boîte.

Six disques d'antibiotiques sont espacés de 24 mm centre à centre, la liste des antibiotiques testés figure dans le tableau 9. L'incubation est faite à 37°C pendant 18h.

Lecture :

Les diamètres d'inhibition sont mesurés avec précision à l'aide d'un pied à coulisse, les résultats sont comparés aux valeurs critiques figurant dans le tableau 9, la bactérie est classée ensuite dans l'une des catégories : sensible ; intermédiaire ou résistante.

Tableau 9: Antibiotiques et leur zone d'inhibition.

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

e. Indice de Jaccard :

C'est la mesure d'affinité entre les souches qui s'exprime généralement par l'indice de ressemblance, soit de similitude, soit de distance (MEYER *et al*, 1995).

$$S_{AB} = nS^+ / (nS^+ + nd).$$

S_{AB} = coefficient de similitude entre souches A et B.

nS^+ = nombre de caractères semblables.

nd = nombre de caractères différents.

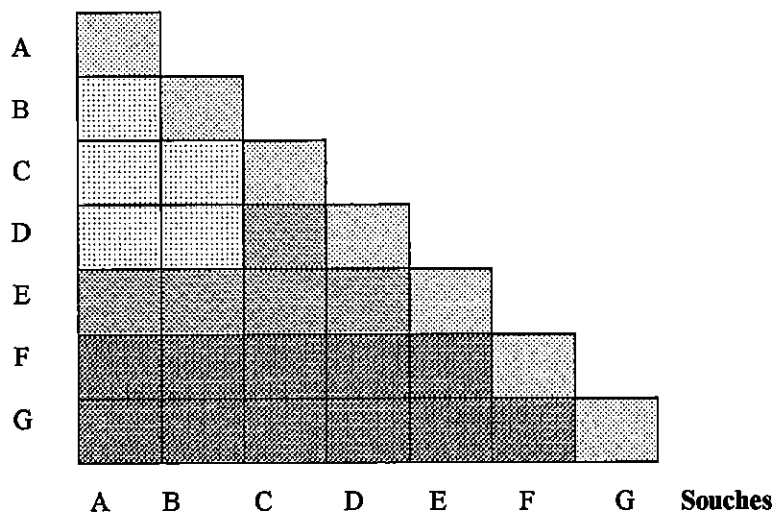
L'indice de Jaccard est le coefficient de similitude utilisé dans la méthode de référence de Sneath, seules interviennent ici les similitudes entre caractères positifs, les caractères négatifs n'étant pas pris en considération dans le calcul.

Les résultats obtenus seront représentés graphiquement par la méthode de classification de référence de Sneath

- **Méthode de classification et représentation graphique :**

Les méthodes de classification opèrent par division ou par agglomération, dans le dernier cas on regroupe les individus sur la base de leurs affinités en se référant à l'indice de similitude, la méthode conduit à définir des groupes ou taxons, ces derniers peuvent être représentés graphiquement. D'après la méthode de référence de Sneath, les coefficients de similitude sont reportés sur une matrice à double entrée et réordonnés de manière à faire apparaître le phénon groupes taxonomiques, le long de la diagonale de la matrice.

Souches



f. -La diversité spécifique :

Pour la diversité des espèces retrouvées en fonction du pH on a proposé de mesurer cette diversité avec la formule proposée par (LEGENDRE et LEGENDRE, 1984) qui est :

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

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'espèce de la collection.

2-3-2. ETUDE QUANTITATIVE :

Le comptage des colonies est réalisé à partir des boîtes de TCBS incubées dans la deuxième étape, le nombre des colonies, des trois boîtes est noté pour chaque dilution de chaque pH dans le tableau -annexe-, dans le but de faire une moyenne pour chacun des pH.

• Expression des résultats :

- a- Le calcul du nombre de micro-organismes N par millilitre (CFU/ml) en tant que moyenne pondérée, à l'aide de l'équation suivante (ISO, 1991) :

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

où

ΣC : est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues

n_1 : est le nombre de boîtes retenues à la première dilution.

n_2 : est le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution.

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution.

- b- afin de réaliser une représentation graphique moyenne en fonction du pH, une moyenne m est calculée pour chaque prélèvement (SCHWARTZ, 1992) :

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

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

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

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

Résultats et interprétation

3. RESULTATS ET INTERPRETATION:

3-1. LES PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUE:

Les données brutes des paramètres physico-chimiques obtenus dans la présente étude sont rassemblées dans le tableau (10).

Cette étude s'est déroulée au mois de juin et de septembre 1999, la température relevée est de 19°C au premier prélèvement et 25°C au deuxième et troisième prélèvement.

Le potentiel hydrogène relevé oscille entre 8.5 et 8.1.

Les résultats obtenus pour le potentiel hydrogène (pH) et la température (T°C) correspondent aux températures et pH mesurés habituellement dans la zone et la période d'étude.

Tableau 10: Résultat de la mesure des paramètres Physico-chimique de l'eau de mer.

Numéro de prélèvement	1	2	3
Les paramètres			
Date du prélèvement	12/06/1999	11/09/1999	25/09/1999
Lieu et station du prélèvement	Plage Ouest	Plage Ouest	Plage Ouest
Heure	14 h 30 mn	11 h	11 h
Le temps	Peu de nuage	Ensoleillé	Ensoleillé
Etat de la mer	Peu agitée	Calme	Calme
Potentiel hydrogène (pH)	8.5	8.32	8.1
Température (T°C)	19°C	25°C	25°C

3-2. RESULTATS DE L'IDENTIFICATION DES BACTERIES DANS L'EAU DE MER:

Selon plusieurs auteurs, le pH alcalin du milieu d'enrichissement favorise le développement des *Vibrions*, pour cela trois pH alcalin (8.6, 9 et 9.4) ont été choisis pour cette étude.

Au totale quarante quatre (44) souches ont été isolées et identifiées durant ce travail, toutes ces souches se sont révélées être des représentants du genre *Vibrio*. Parmi les souches choisies aucune espèce non-*Vibrio* n'a été isolé.

3-2-1. Résultats de l'observation macroscopique:

L'étude macroscopique des colonies est la première étape de notre étude. Pour cette étape, un milieu sélectif est utilisé, c'est le thiosulfate citrate bile sel et saccharose (TCBS) (annexe1). Ce milieu permet de distinguer les colonies suspectées être du genre *Vibrio*.

Les représentants du genre *Vibrio* sont de couleur verte sur le milieu sélectif (TCBS) (BRUNI ET GRISAFI, 1986 ; MARCHAL, 1987; LECLERC, 1995), à l'exception de deux espèces *V.cholerae* et *V.alginolyticus* qui sont observées en couleur jaune. Cette couleur est obtenue après fermentation du saccharose et acidification du milieu provoquant le virage du bleu de thymol et du bleu de bromothymol au jaune (FURNISS et DONOVAN, 1976; ; BRUNI et al 1986 ; MARCHAL, 1987; EUZEBY, 1999).

Les résultats obtenus ont permis de voir les caractères morphologiques communs et différents, ils sont rassemblés dans le tableau (11).

La forme des colonies observé est ronde, plate à bombé, d'aspect lisse pour la majorités comme décrite par (DELATTRE et al, 1986; BERTRAND, 1990). Leur diamètre varie de 2 à 5 mm. Il est le plus souvent de 3 mm. Le pourtour est clair ou opaque.

3-2-2. Résultat de l'identification microscopique:

La coloration de Gram nous a permis de distinguer les souches Gram négatif qui nous intéresse dans cette étude et d'éliminer les souches Gram positive qui ne font pas parti du genre *Vibrio*.

Six souches Gram positif ont été éliminées durant cette étape, le reste des souches est retenu pour poursuivre l'étude.

Tableau 3-2 : Aspect macroscopique des espèces de *Vibrio* identifiées.

ESPECES(*)	ASPECT	SUR	T C B.S
	FORME	DIAMETRE	COULEUR
<i>V.alginolyticus</i>	Ronde légèrement bombée lisse	2 à 3 mm	Jaune
<i>V.anguillarum</i>	Ronde lisse	3 mm	Verte
<i>V.campbellii</i>	Ronde bombée légèrement irrégulière	3 à 4 mm	Pourtour vert claire Centre foncé
<i>V.cholerae</i>	Ronde plate, lisse	2 mm	Jaune avec centre plus foncé.
<i>V.furnisii</i>	Ronde plate lisse	2 à 3 mm	Translucide avec centre foncé
<i>V.harveyi</i>	Ronde bombée lisse	2 à 3 mm	Pourtour clair Centre vert foncé
<i>V.marinus</i>	Ronde bombée	3 à 4 mm	Pourtour opaque vert clair
<i>V.mediterranei</i>	Ronde lisse	4 à 5 mm	Jaune
<i>V.metschnikovii</i>	Ronde peu striée	2 mm	Translucide
<i>V.nereis</i>	Ronde plate lisse	4 à 5 mm	Verte
<i>V.ordalii</i>	Ronde bombée	3 mm	Verte avec pourtour très foncé
<i>V.parahaemolyticus</i>	Ronde lisse	3 à 4 mm	Pourtour clair Centre vert foncé
<i>V.splendidus</i> 1	Ronde lisse	3 à 4 mm	Verte avec centre foncé Pourtour translucide

* : Noms des espèces citées après identification biochimiques.

Le tableau (12) rassemble tous les résultats concernant la forme et le mode de groupement, obtenus après la coloration de Gram des représentants probable du genre *Vibrio*.

Les représentants du genre *Vibrio* apparaissent sous forme bacille droits ou incurvés (PRESCOTT et al, 1995; FLANDROIS, 1997).

La majorité des souches observées au microscope, se présentent sous forme bacille incurvé, quelques unes se trouvent en bâtonnet droit, long ou court.

Certaines souches se présentent sous forme de cocobacille. Ces formes cocoides seraient dû selon URDACI, (1987), au stress de la culture.

Pour le mode de groupement, tous les bâtonnets observés sont en amas, à l'exception de quelques germes qui sont isolés.

Tableau12: Aspect microscopique des souches isolées.

ESPECES (*)	Caractéristiques des germes après la coloration de Gram	
	FORMES	MODE DE GROUPEMENT
<i>V.alginolyticus</i>	Uniquement les bacilles incurvés	Essentiellement isolés
<i>V.anguillarum</i>	Surtout des cocobacilles, quelques bacilles	Observés en amas
<i>V.campbellii</i>	Cocobacilles, parfois en bacilles incurvés	Surtout en amas
<i>V.cholerae</i>	Bacilles incurvés en virgule	Surtout en amas
<i>V.furnisii</i>	Bacilles incurvés, quelques-uns un en bâtonnet court	Les bâtonnets en amas, les incurvés isolés
<i>V.harveyi</i>	Surtout de bacilles incurvés parfois droits	Essentiellement isolés
<i>V.marinus</i>	En virgule	En groupe, quelques-unes isolés
<i>V.mediterranei</i>	Bacilles incurvés et cocobacilles	Surtout isolés
<i>V.metschnikovii</i>	Cocobacilles droits, bacilles ou incurvés	Généralement en amas
<i>V.nereis</i>	Bacilles incurvés et bâtonnets droit long	Isolés plutôt qu'en amas
<i>V.ordalii</i>	Bacilles incurvés	Présence d'amas
<i>V.parahaemolyticus</i>	Bacilles incurvés, quelques-uns batônnets droits	Surtout en amas
<i>V.splendidus I</i>	Bacilles incurvés et en bacilles	En groupe, d'autres isolés

* : Noms des espèces citées après identification biochimiques.

3-2-3. Résultats de l'identification biochimique:

Les caractères cultureux biochimiques des quarante quatre souches que nous avons isolées se répartissent en 13 espèces de *Vibrio* en se référant aux caractères donnés par :

BAUMAN et SCHURBERT, (1984); ROXWELL, (1970 in URDACI, 1987; ALISINA et BLANCH, 1994 ; BERGEY'S, 1994) (tableau 13).

Toutes les souches ont été incubées à une température de 30°C et cela pour tous les tests effectués.

Parmi les caractères biochimiques les plus importants caractérisant le genre *Vibrio*; le test oxydase permet de différencier les Entérobactéries des *Vibrio*, il a également permis de différencier *V.metschnikovii* et *V.gazogène* des autres espèces de *Vibrio* puisque ces deux espèces ont une oxydase négative (tableau 14).

Le test de la nitrate réductase est également négative pour ces deux espèces, contrairement aux autres espèces isolées. Ces deux caractères biochimiques ont essentiellement permis la confirmation de l'espèce *V. metschnikovii* et *V. gazogene*.

Toutes les espèces identifiées ne produisent pas de gaz à partir de glucose, à l'exception de *V. gazogene* qui se caractérise essentiellement par la production de gaz, c'est le test discriminant entre *V. metschnikovii* et *V.gazogene*.

Chez les bactéries à métabolisme fermentatif comme la famille des *Vibrionaceae*, l'arginine dihydrolase est un caractère de différenciation important. Les espèces isolées présentent une analogie avec celles de la bibliographie consultée (URDACI, 1987; BLANCH, 1994). L'arginine dihydrolase (ADH) est présente chez les espèces suivantes: *V.metschnikovii*, *V.splendidus*1 ; *V.nereis* et *V.anguillarum*.

La recherche de l'acétoïne (VP) a été effectuée pour l'identification des Vibrions halophile, un (VP) négatif a été retrouvé chez toutes les espèces isolées, exception faite pour *V.metschnikovi* et *V.alginolyticus*

La production de H₂S est inexistante pour les 44 souches testées.

La mise en évidence de la dégradation du saccharose est nécessaire dans cette étude biochimique, toutes les espèces cultivées ont dégradé ce sucre, à l'exception de *V.parahaemolyticus*. Par ailleurs c'est le seul caractère qui différencie *V.alginolyticus* (saccharose⁺) de *V.parahaemolyticus* (saccharose⁻).

Tableau 13 : suite des caractéristiques biochimiques des vibriens

29	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+		+	+	+	+	-	-	-	+	V	-	+	+	+	+	+	+	+	+	V	+	V	
30	+	+	-	+	-	-	-	-	-			-	+	+	+			-	+			-	-	-	+	+	+						
31	+	+		-	-	-	-	-	d			+		+								-	-	-	+	+	+						
32	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+					
33	+	+		-	-	-	-	-	-			-	-																				
34	+	+			+	-	-	-	-			-	-	-	-																		
35	+	+	-	-	+	V	V	-	+	+	V	V	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	+	V	+	-	V		
36	+	+	-	-	-	-	-					+	V	+	-	-	-	V	V	-	-												
37				-	-	-	-	-	+			-	+																				
38	+	+	-	-	V	-	-	-	+	-	V	+	+	+	+	-	-	-	V	V	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
39	+	+	-	-	-	+	+	V	+	+	V	+	+	+	+	+	V	-	V	-	-	V	+	+	-	+	+	V	+	-	-	-	+
40	-		-		-	-	-	-	V		V		+						+														

+ : caractère positif ; - : caractère négatif ; V : caractère variable ;

- | | | |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------|
| 1 <i>V. aesturianus</i> | 16 <i>V. hollisae</i> | 31 <i>V. penaeicida</i> |
| 2 <i>V. alginolyticus</i> | 17 <i>V. logei</i> | 32 <i>V. proteolyticus</i> |
| 3 <i>V. anguillarum</i> | 18 <i>V. marinus</i> | 33 <i>V. salmonicida</i> |
| 4 <i>V. campbelli</i> | 19 <i>V. mediterranei</i> | 34 <i>V. scophtalmi</i> |
| 5 <i>V. cholerae</i> | 20 <i>V. metschikovi</i> | 35 <i>V. splendidus I</i> |
| 6 <i>V. cincinnatiensis</i> | 21 <i>V. mimicus</i> | 36 <i>V. splendidus II</i> |
| 7 <i>V. costicola</i> | 22 <i>V. natrigenes</i> | 37 <i>V. tapetis</i> |
| 8 <i>V. diazotrophicus</i> | 23 <i>V. nereis</i> | 38 <i>V. tubiashii</i> |
| 9 <i>V. fisheri</i> | 24 <i>V. nigripulchritudo</i> | 39 <i>V. vulnificus</i> |
| 10 <i>V. fluvialis I</i> | 25 <i>V. ordalli</i> | 40 <i>V. wodanis</i> |
| 11 <i>V. fluvialis II</i> | 26 <i>V. orientalis</i> | |
| 12 <i>V. furnisii</i> | 27 <i>V. parahaemolyticus</i> | |
| 13 <i>V. gazogenes</i> | 28 <i>V. pelagius I</i> | |
| 14 <i>V. harveyi</i> | 29 <i>V. pelagius II</i> | |
| 15 <i>V. halioticoli</i> | 30 <i>V. pectinacida</i> | |

Tableau 14: Résultats d'identification biochimique des espèces isolées suspectées être du genre *Vibrio*

Especies	Tests																																		
	Oxydase	Reduction-nitrate	Gaz en glucose	Essai image	ADH	LDC	ODC	YP	Indole	Citrate	Urée	ONPG	Gélatinase	Amylase	30°C	40°C	42°C	0%	5%	7%	10%	Arabinose	Fructose	Galactose	Glycérol	Glucose	Maltose	Mannitole	Mannose	Rhamnose	Saccharose	Lactose	H ₂ S	Type respiratoire	
<i>V.alginolyticus</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	AF	
<i>V.anguillarum</i>	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	AF	
<i>V.campbelli</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	AF	
<i>V.cholerae</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	AF	
<i>V.furnisii</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	AF	
<i>V.harveyi</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	AF	
<i>V.marinus</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	AF
<i>V.mediterranei</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-	AF	
<i>V.metschnikovii</i>	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	AF	
<i>V.nereis</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	AF	
<i>V.ordalii</i>	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	AF
<i>V.paraahaemolyticus</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	AF
<i>V.splendidus I</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	-	AF

(+) : résultat positif ; (-) : résultat négatif ; (AF) : aérobie facultatif.

3-2-4. Résultats des tests Antibiotiques:

Un antibiotique est défini comme une substance d'origine biologique ou synthétique agissant spécifiquement sur une étape essentielle du métabolisme des bactéries (LECLERC, 1995).

Pour la détermination de la sensibilité aux agents antibactériens, dix antibiotiques ont été utilisés (tableau 15).

Les tests effectués sur les 13 espèces identifiées ont montré la sensibilité chez certaines et la résistance chez d'autres.

Les tests effectués révèle que la totalité des espèces identifiées sont résistante à la bacitracine, ceci confirme l'appartenance des espèces isolées aux Gram négative un des caractéristique des *Vibrions*.

La totalité des isolats sont sensible à la gentamycine au chloramphenicol et à la tétracycline (BRUNI et GRISAFI, 1986; FLANDROIS, 1997).

V.cholerea identifié espèce pathogène pour l'homme, présente une résistance à la polymyxine et aux sulfamides (DODIN et DOSSO, 1986). Ce germe est sensible à de nombreux antibiotiques dont les cyclines (PFEIFFER, 1999).

V.alginolyticus présente également un maximum de résistance (tableau 15).

L'espèce *V.parahaemolyticus* pathogène pour l'homme et *V.anguillarum* pathogène essentiellement pour les espèces marines, semblent être résistantes seulement à la polymyxine, sensible aux autres.

Enfin et d'après les résultats obtenus, on peut dire que les cinq espèces pathogènes identifiées: *V.cholerae*, *V.metschnikovii*, *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus* et *V.furnisii*, sont sensibles au antibiotiques suivants: la gentamicine, le chloramphénicol et la tétracycline.

Tableau 15: Résultats des tests d'antibiotiques effectués sur les souches isolées.

Antibiotiques Espèces	Bactracine	Chloramphénicole	Gentamicine	Néomycine	Polymyxine	Rifampicine	Spiramycine	Streptomycine	Sulfamide	Tétracycline	Composé vibriostatique
<i>V.metschnikovii</i>	< 6	30 s	24 s	22 s	2 R	26 s	1.8 R	17 s	28 s	20 s	15
<i>V. parahaemolyticus</i>	< 6	34 s	3 4 s	25 s	13 R	22 s	20 IN	24 s	21 s	28 s	17
<i>V.harveyi</i>	0 R	36 s	21 s	18 s	14 R	24 s	15 IN	16 s	22 s	27 s	19
<i>V.alginolyticus</i>	0 R	35 s	24 s	13 IN	2 R	26 s	0.5 R	20 s	27 s	26 s	15
<i>V.marinus</i>	7.5 R	30 s	22 s	18 s	12 R	25 s	16 IN	16 s	0.5 R	24 s	16
<i>V.furnisii</i>	-	-	20 s	-	-	25 s	15 IN	-	21 s	-	18
<i>V.mediterranei</i>	4 R	32 s	24 s	25 s	11 R	18 I	21 IN	14 IN	20 s	20 s	18
<i>V.campbellii</i>	0 R	32 s	20 s	20 s	12 R	25 s	1 R	14.5 IN	17 s	30 s	19
<i>V.cholerae</i>	0 R	36 s	22 s	17 s	0.5 R	22 s	17 IN	15 s	D	30 s	14
<i>V.anguillarum</i>	-	30 s	28 s	30 s	13 R	29 s	21 IN	21 s	24 s	28 s	15
<i>V.ordalii</i>	-	34 s	24 s	20 s	13 R	23 s	17 IN	19 s	14 IN	24 s	18
<i>V.splendidus I</i>	-	36 s	24 s	18 s	15 s	25 s	11-15 IN	25 IN	13 IN	26 s	19
<i>V.nereis</i>	0 R	36 s	20 s	18 s	19 s	28 s	21 IN	14 IN	36 s	27 s	17

R: résistant, S: sensible, IN: intermédiaire ; Chiffre: diamètre moyen d'inhibition en (m.m) ; R, S, IN=Classification lu sur INSP, (1999).

3-2-5. Mesure d'affinité entre les souches:

Le calcul d'un indice de ressemblance entre les espèces, soit de similitude entre les caractères biochimiques des espèces du genre *Vibrio* identifiées et celles retrouvées dans la bibliographie (URDACI, 1987; ALSINA et BLANCH, 1994), a été effectués en utilisant l'indice de Jaccard.

Il est important de préciser que pour faire une classification précise et fiable, il faut comparer de nombreux caractères, au moins "50" et de préférence plusieurs centaines (MEYER et al, 1995).

Trente deux (32) tests ont été utilisés pour le calcul de l'indice de Jaccard, tous les tests biochimiques effectués dans ce travail n'ont pu être inclus dans le calcul de cet indice.

En effet, la comparaison s'est effectué avec les caractères biochimiques relevés dans la bibliographie. Les tests de sensibilité aux antibiotiques n'ont pas été inclus dans le calcul de l'indice de Jaccard.

Le tableau (16) et le diagramme (figure 6) nous ont permis de voir et d'émettre des hypothèses, quant à l'appartenance de chaque espèce au genre *Vibrio* en comparaison les caractères des espèces du genre trouvé dans la bibliographie.

Les pourcentages maximaux représentent *V.cholerae* et *V.harveyi*, le degré de similitude est de 100%.

Dans la fourchette (95-99 %) une seule espèce est retrouvée, il s'agit de *V.alginolyticus*.

Selon ces résultats nous pouvons dire que les trois espèces isolées à savoir *V.harveyi*, *V.cholerae* et *V.alginolyticus* présentent une similitude de 100% pour *V.harveyi* et *V.cholerae* et de 97% pour *V.alginolyticus* avec le tableau d'identification bibliographique.

Les souches ayant un indice de similitude supérieure ou égale à 85% sont considérées comme faisant partie de la même espèce (LECLERC et al, 1995).

Ceci confirme nos résultats, en effet les espèces suivantes : *V.metschnikovii*, *V.anguillarum*, *V.mediterranei*, *V.campbelli*, et *V.nereis* présentent respectivement un degré de similitude de : 88%, 88%, 94%, 94% et 91%.

Pour *V.marinus* (84%) et *V.parahaemolyticus* (84%), il aurait été intéressant de faire des tests supplémentaires à savoir biochimiques et antigéniques pour éventuellement confirmer leur appartenance respective aux espèces sus-citées.

Le reste des espèces présentent une affinité inférieure à 85%, les valeurs oscillent entre 72% et 81%.

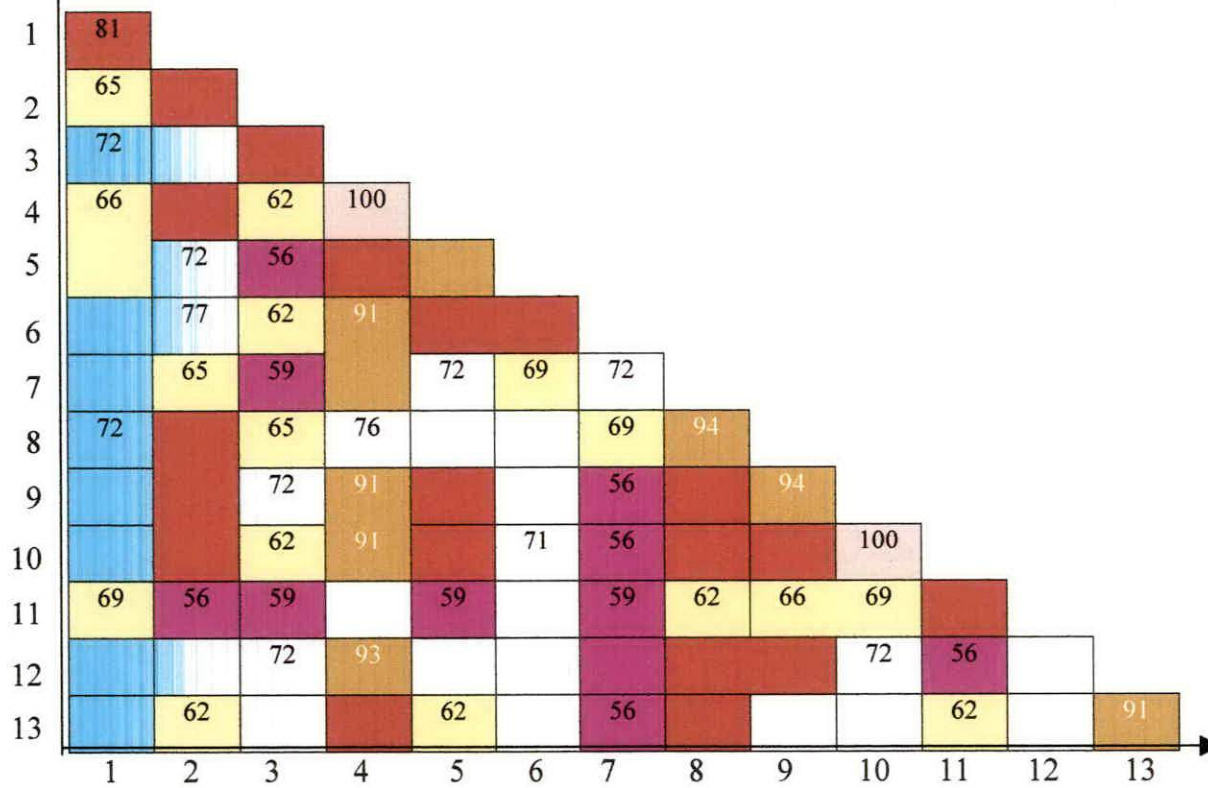
Enfin, il apparaît qu'un degré de similitude de 96% représente les espèces *V.harveyi* et *V.metschnikovii* entre elles.

Il est également préférable d'inclure de nombreux types de données: morphologique, biochimique et physiologique pour pouvoir séparer les caractères communs entre ces deux espèces (MEYER et *al*, 1995; PRESCOTT et *al*, 1995).

Tableau 16: résultats du calcul de l'indice de Jaccard entre les résultats de notre travail et celle de la bibliographie.

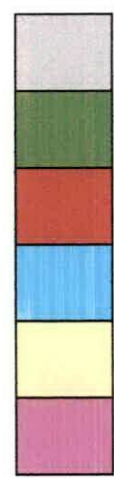
Espèces <i>Vibrio</i> (URDACL, 1987 ; ALISINA et BLANCH, 1994)	Espèces <i>vibrio</i> du présent travail												
	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. marinus</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. mediterranei</i>	<i>V. campbelli</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. ordalii</i>	<i>V. splendidus I</i>	<i>V. nereis</i>
	88%	65%	65%	75%	75%	50%	40%	62%	56%	59%	56%	56%	65%
<i>V. parahaemolyticus</i>	65%	84%	53%	90%	69%	70%	37%	75%	72%	90%	53%	62%	62%
<i>V. anguillarum</i>	72%	78%	88%	87%	75%	47%	50%	68%	66%	75%	53%	62%	69%
<i>V. harveyi</i>	68%	81%	62%	100%	75%	53%	50%	78%	78%	84%	59%	65%	69%
<i>V. alginolyticus</i>	69%	72%	56%	87%	97%	53%	53%	72%	78%	87%	59%	62%	69%
<i>V. marinus</i>	78%	72%	62%	91%	84%	84%	53%	78%	81%	78%	59%	69%	72%
<i>V. furnissii</i>	75%	65%	59%	78%	72%	69%	72%	72%	75%	78%	53%	62%	66%
<i>V. mediterranei</i>	72%	84%	68%	96%	75%	75%	69%	94%	87%	90%	59%	75%	84%
<i>V. campbelli</i>	75%	81%	72%	91%	87%	75%	56%	81%	94%	87%	62%	72%	78%
<i>V. cholerae</i>	78%	81%	62%	91%	81%	71%	50%	81%	84%	100%	56%	72%	78%
<i>V. ordalii</i>	69%	56%	59%	78%	59%	75%	59%	62%	66%	69%	81%	66%	72%
<i>V. splendidus I</i>	75%	78%	72%	93%	75%	75%	53%	81%	81%	72%	56%	78%	78%
<i>V. nereis</i>	78%	62%	78%	87%	62%	75%	56%	84%	78%	78%	62%	78%	91%

Résultat personnel



- 1-V.metschnikovii
- 2-V.paraaenolyticus
- 3-V.angiillarum
- 4-V.harvevii
- 5-V.alginolyticus
- 6-V.marinus
- 7-V.furnisii
- 8-V. Méditerranée
- 9-V.campbellii
- 10-V.cholérae
- 11-V.ordalii
- 12-V.splendidusi
- 13-V.nereis

- 100 %
- 90% - 99 %
- 80% - 89 %
- 70% - 79 %
- 60% - 69%
- 50% - 59 %



Résultats
URDACI 87

3.3. RESULTATS ET INTERPRETATION DE L'ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DE L'EAU DE MER

• 3-3-1. L'aspect quantitatif

L'estimation de l'importance quantitative des populations bactérienne présentes dans le milieu marin par l'intermédiaire des cultures en milieu solide permet la numération seulement des germes viables (BIANCHI et BIANCHI, 1972).

Cette étude nous permet d'évaluer le nombre de germes (*Vibrio* et autres), présent dans l'eau de mer et aussi de déterminer le potentiel hydrogène préférentiel pour la croissance du plus grand nombre de colonies.

Pour faciliter la lecture, trois dilutions ont été effectuées (-1) (-2) (-3), la première dilution à donner des boîtes en nappe ce qui les a rendu impossible à dénombrer, pour chaque dilution trois boîtes sontensemencées.

Les résultats bruts des nombres de colonies dénombrés pour les trois boîtes de chaque dilution en fonction de chaque pH testé est rassemblés dans les tableaux en annexe (1).

La moyenne calculée à partir de nombre de colonies formant unité contenue dans 1ml d'eau de mer (CFU/ml) des trois boîtes a été relevé pour chaque prélèvement et reporté dans le tableau (17)

Tableau 17 : Le nombre de colonies formant unité par millilitre (CFU/ml) pour les trois prélèvements effectués et le pH correspondant.

Prélèvement pH	N°1	N°2	N°3	(m) moyenne CFU / ml
8.6	89.67 10 ²	196 10 ²	163.67 10 ²	14185.84
9	50.67 10 ²	98.33 10 ²	103.67 10 ²	7995.75
9.4	18.33 10 ²	2.33 10 ²	5.33 10 ²	607.89

Après normalisation des données, une représentation graphique de l'analyse quantitative moyenne des germes dans l'eau de mer en fonction du pH est réalisée (figure 7)

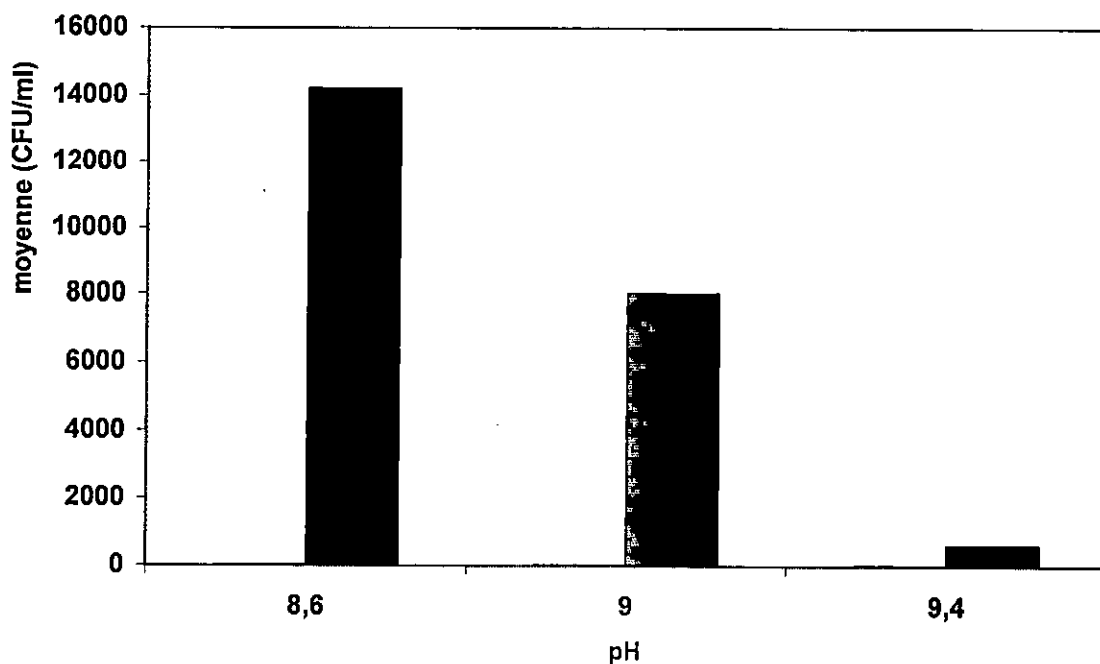


Figure 7 : Représentation graphique de l'analyse quantitative moyenne des germes dans l'eau de mer de la plage Ouest de Sid -Fredj en fonction du pH.

Les milieux de culture à pH différents présentent une grande différence quant aux nombres de colonies relevées, dans les trois prélèvements effectués (tableau 17, graphiques en annexe 1).

Les résultats obtenus des moyennes calculées à partir des trois échantillons réalisés (tableau 17) ainsi que la figure (7), laissant voir une population bactérienne importante au niveau de l'échantillonensemencé dans l'EPA caractérisé par un potentiel hydrogène de 8.6, la moyenne calculée est de 14185.85 CFU/ml.

Ce résultat important est dû probablement à l'adaptation des bactéries marine à cette valeur du pH (8.6) qui semble être proche de celle de l'eau de mer relevée dans cette étude (8.1 à 8.5).

A pH 9, le nombre moyen des colonies formant unité dans 1 millilitre d'eau de mer est moins important, (7995.75 CFU/ml) il présente plus que la moitié de celui du pH précédent (figure 7).

Il faut noter que l'histogramme représentant la moyenne des colonies des trois prélèvements à pH 9.4 (figure 7) nous montre que c'est une valeur faible et qui est de 607.89 CFU/ml.

Les méthodes de culture traditionnelle ne permettent pas de faire un bon comptage. Elles négligent les cultures viables et non cultivables, qui peuvent être obtenue par la méthode à épifluorescence (TROUSSELLIER *et al*, 1985).

• **3-3-2. L'aspect qualitatif**

Le tableau (19) rassemble toutes les espèces du genre *Vibrio* isolées de l'eau de mer des trois prélèvements effectués. Le nombre de souches obtenu par espèce après modification du pH est également signalé dans le tableau ci dessous:

Tableau(19): les souches de vibrio isolé de l'eau de mer aux trois prélèvements en fonction du pH du milieu d'enrichissement.

Espèces \ pH	1 ^{er} prélèvement			2 ^{ème} prélèvement			3 ^{ème} prélèvement			Nb
	8.6	9	9.4	8.6	9	9.4	8.6	9	9.4	
<i>V.parahaemolyticus</i>	1	3	-	-	-	-	2	1	-	7
<i>V.splendidus</i> 1	-	2	-	-	-	-	-	4	-	6
<i>V.campbelli</i>	2	-	-	2	-	-	-	-	2	6
<i>V.cholerea</i>	1	-	1	2	1	-	-	-	-	5
<i>V.alginolyticus</i>	2	2	-	-	1	-	-	-	-	5
<i>V.harveyi</i>	2	-	-	-	2	-	1	-	-	5
<i>V.metschnikovii</i>	2	1	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>V.mediterrannei</i>	2	-	-	-	-	-	-	-	-	2
<i>V.marinus</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>V.furnissii</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>V.ordalii</i>	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
<i>V.nereis</i>	-	-	-	1	-	-	-	-	-	1
<i>V.anguillarum</i>	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1

Nb= nombre de souches rencontrées/44, (1, 2, 3) = nombre de souches testées, (-)= Absence

Les espèces sont présentent en fonction du nombre de fois où elles ont été isolées durant ce travail.

***V. parahaemolyticus* :**

C'est l'espèce la plus souvent rencontrée dans nos prélèvements. Elle a été identifiée sept fois dans le premier et troisième prélèvement tableau (19).

C'est une espèce selon BRISOU et DENIS, (1980) relativement répandue dans l'environnement maritime.

Cette espèce *V. parahaemolyticus*, ne peut se multiplier que si la température de l'eau est supérieure à 15°C, or au cours de ce travail la température de l'eau de mer relevée varie entre 19°C et 25°C, ceci confirme sa présence dans nos échantillons (URDADI, 1987 ; BOURGEOIS et al, 1990 ; DACOSTA, 1995).

C'est une espèce halotolérante, elle a besoin de 1% de sel pour survivre et tolère jusqu'à 8 à 10% (GELINAS, 1995), ceci confirme sa présence dans nos isolats.

Son isolement est positif au deux pH testés 8.6 et 9, comme l'indique DACOSTA, (1995) et FDA, (1998) ; cette espèce se multiplie à des pH entre 4.8 et 11, l'optimum se situe entre 7.5 et 8.5. Nous ne l'avons pas isolée à pH 9.4

***V. splendidus* 1:**

Comme *V. parahaemolyticus* *V. splendidus* a été isolée au premier et troisième prélèvement, le nombre d'isolats est de six (6) (tableau 19).

D'après les identifications faites à l'aide des données de la bibliographie (URDADI, 1987 ; BERGEY'S, 1993 ; ALISINA et BLANCH, 1994) c'est un *V. splendidus* qui appartient au biotype I.

Il semble que cette espèce préfère un potentiel d'hydrogène de 9, elle n'a été isolée qu'à ce pH

***V. campbellii*:**

L'espèce *V. campbellii* a été isolée au cours des trois prélèvements à pH 8.6 et 9.4. Elle a été aussi fréquente que *V. splendidus*, nous l'avons identifiée six fois.

***V. cholerae*:**

Le *V. cholerae*, espèce pathogène pour l'homme, a été fréquente dans notre étude, elle a été identifiée cinq fois. Sa présence est mise en évidence au premier et au deuxième prélèvement voir tableau (19).

V.cholerea est une espèce d'habitat aquatique, mais aussi des eaux usées (BIANCHI, 1988 ; POGGI, 1990 ; HASLAY, 1993). Sa présence dans notre étude qualifie cette plage comme une plage où l'eau est de mauvaise qualité.

Elle semble tolérer les trois potentiels d'hydrogène du milieu d'enrichissements, ceci est dû probablement à sa tolérance à un pH non seulement neutre (7.6), mais aussi alcalin qui peut aller jusqu'à (10) (VERON et POPOFF, 1990 ; GAUTHIER et SCOVILL, 1991 ; FLANDROIS, 1997 ; PIEFFER, 1999).

Elle semble tolérée aussi la concentration saline utilisée dans cette étude (2.5%), PIEFFER, (1999) indique que c'est une espèce qui pousse à la concentration en sel de 2 à 8%; l'optimum se situe entre 1 et 2.5% (URDACI, 1987).

***V.alginolyticus* :**

Sur quarante quatre souches obtenues, cinq représentants *V.alginolyticus* ont été identifiés, sa présence a été mise en évidence à la température de 19°C (premier prélèvement) et à 25°C (deuxième prélèvement) tableau (19).

DELATTE et DELESMONT, (1986), FOURNIER (1998), mentionnent qu'elle est fréquemment isolée dans les mois où les eaux sont plus chaudes.

Sa présence dans nos isolats peut être confirmée par les études de BRISOU, (1980), MARCHAND, (1986) qui signalent que *V.alginolyticus* est caractérisée par une halophilie marquée et pousse dans des milieux supplémentés par 0.5 à 11% de NaCl.

En ce qui concerne le potentiel hydrogène, cette espèce est isolée à deux pH 8.6 et 9. Son absence est visible à pH 9.4 dans les cinq isolements, ceci montre une préférence de cette espèce pour des pH variant probablement entre 8 et 9.

***V.harveyi*:**

Cette espèce est également isolée cinq fois dans notre travail, elle a été trouvée dans les trois prélèvements effectués tableau (19).

Un de ces caractères bactériologiques positif est sa croissance à pH (10). Dans notre travail cette espèce n'est présente qu'au pH 8.6 et pH 9. Son absence dans le pH 9.4 et peut être dû à un stress de la culture ou à une variation de la température d'incubation. Il faut noter que c'est une espèce qui pousse à des températures de 20°C, 35°C et 42°C (EUZEBY, 1999).

V.metschnikovii:

Bien que notre échantillonnage se soit déroulé pendant une période où les températures de l'eau de mer étaient relativement élevées, *V.metschnikovii* espèce pathogène opportuniste (RAJASH et al (1981, in BIANCHI, 1988)) a été isolé quatre fois au premier prélèvement, ce prélèvement se caractérise par une des plus faibles températures (19°C). Cela rejoint les travaux de MARCHAND, (1986) qui stipule que les basses températures favorisent la croissance de cette espèce.

Cependant MARCHAND, (1986) et URDACI, (1987) précisent que c'est uniquement son abondance qui diminue de 65% en hiver et à 35% au mois de mai et octobre.

Ce même auteur indique qu'il s'agit d'une espèce qui s'accommode de salinités allant de 0 à 10%, ceci confirme sa présence dans nos isolats.

Contrairement aux espèces sus citées, le *V.mediterraneii* est isolée deux fois, et *V.anguillarum*, *V.marinus*, *V.furnissii*, *V.ordalii* et *V.nereis*, ont été isolées une seule fois tableau (19).

D'après ces résultats, toutes ces espèces sont isolées après enrichissement dans l'EPA à potentiel hydrogène de 8.6, à l'exception de *V.ordalii* qui a été identifié à partir du milieu de culture à pH 9.

3.3.2.1. La diversité spécifique

Dans cette étude nous avons testé l'effet du potentiel hydrogène sur le milieu d'isolement des *Vibrions*, pour cela trois pH ont été utilisés à savoir 8.6, 9 et 9.4.

Toutefois, il est important de préciser que la concentration de NaCl du milieu d'enrichissement (EPA) est ajusté au cours de ce travail à 2.5 %. Cette concentration en NaCl a été choisie car la plupart des membres de la famille des *Vibrionaceae* poussent de façon optimale à cette concentration en sel (ALSINA et BLANCH, 1994).

A partir de tous les tests effectués sur les 44 souches qui se sont révélées être des représentants du genre *Vibrio*, 13 espèces ont été déterminées. La diversité spécifique a été calculée selon la présence ou l'absence des différentes espèces comparativement à la totalité des espèces et cela pour chaque pH.

Le tableau (18) rassemble toutes ces espèces, avec leur diversité spécifique en fonction des potentiels hydrogène testés.

Tableau 18 : La diversité spécifique totale des espèces isolées en fonction du pH testé est représentée graphiquement par l'histogramme suivant.

Espèces	pH 8.6	pH 9	pH 9.4
<i>V.alginolyticus</i>	+	+	-
<i>V.anguillarum</i>	+	-	-
<i>V.campbellii</i>	+	+	+
<i>V.cholerae</i>	+	+	+
<i>V.furnissii</i>	+	-	-
<i>V.harveyi</i>	+	+	-
<i>V.marinus</i>	+	-	-
<i>V.mediterrannei</i>	+	-	-
<i>V.metschnikovii</i>	+	+	-
<i>V.nereis</i>	+	-	-
<i>V.ordalli</i>	-	+	-
<i>V.paraahaemolyticus</i>	+	+	-
<i>V.splendidus I</i>	-	+	-
Nombre d'espèces	11	8	2
Diversité spécifique	85%	61%	15%

(+)=Présent (-)= Absent

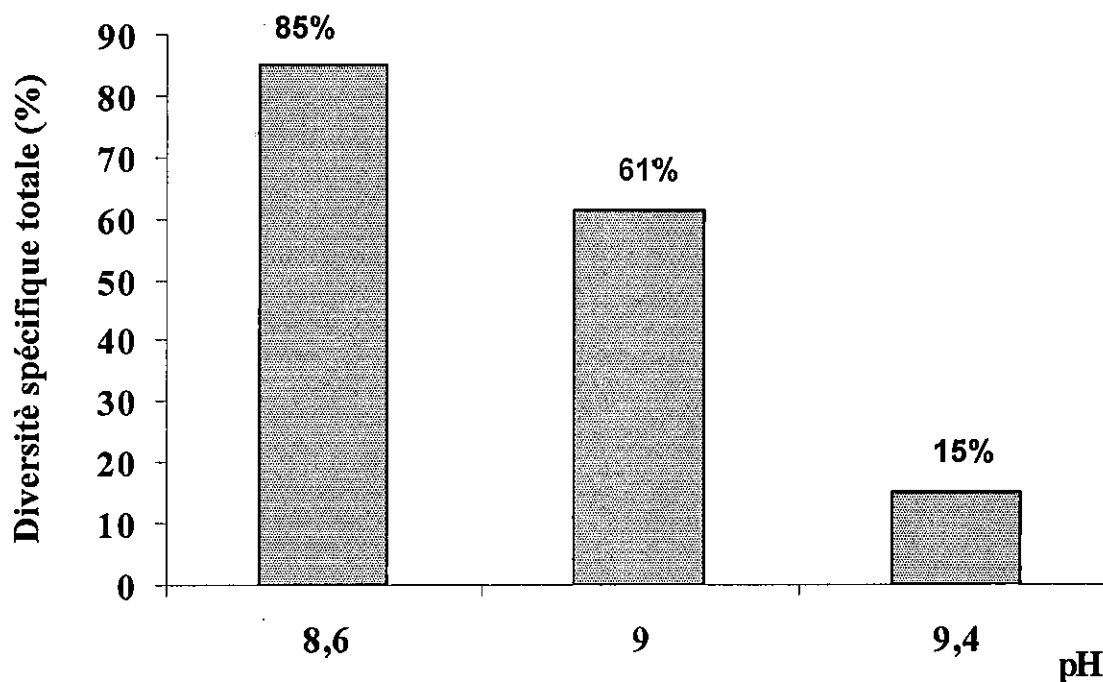


Figure 8: Diversité spécifique totale des espèces du genre vibrio en fonction du pH.

La représentation graphique de la diversité totale, met en évidence un maximum d'espèces pour un potentiel hydrogène de 8.6. Cette diversité totale représente un pourcentage maximum de 85%.

A ce pH on observe un grand nombre d'espèces isolées, 11 ont pu proliférer.

Pour le pH (9), huit (8) espèces ont été détectées La diversité totale est de 61%.

Par contre à pH 9.4 qui est le potentiel hydrogène le plus alcalin, deux espèces seulement ont pu se multiplier, sa diversité calculée en pourcentage est de 15%.

Ces résultats obtenus correspondent à ceux de URDACI, (1987) ; ALSINA et BLANCH, (1994); FDA (1998) qui disent qu'un pH-élevé entre 7.6 et 9 facilite la multiplication des espèces du genre *Vibrio*.

4. Etude comparative :

L'étude menée par HENNICHE et REFFAF, (1999) sur l'isolement et l'identification des *Vibrio* dans la presque ile de Sidi Fredj, nous a permis de constater que les mêmes espèces de *Vibrion* isolées de l'eau de mer se retrouve dans ce présent travail, à l'exception de *V. vulnificus* et *V. fluvialis* (tableau 20).

Tableau 20: Etude comparative des espèces isolées dans l'eau de mer en fonction du pH, dans ce présent travail et celle de HENNICHE et REFFAF, (1999).

Espèces communes aux deux études	Espèces isolées par HENNICHE et REFFAF, (1999)	Espèces du présent travail
<i>V. anguillarum</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. alginolyticus.</i>
<i>V. campbelli</i>	<i>V. campbellii</i>	<i>V. anguillarum</i>
<i>V. marinus</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. marinus</i>	<i>V. cholerea</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. furnissii</i>
	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. harveyi</i>
	<i>V. vulnificus</i>	<i>V. marinus</i>
		<i>V. mediterrannée</i>
		<i>V. metschnikovii</i>
		<i>V. nereis</i>
		<i>V. ordalii</i>
		<i>V. parahaemolyticus</i>
		<i>V. splendidus1</i>

Il est important de souligner qu'au cours de ce travail, quatre espèces non isolées chez HENNICHE et REFFAF, (1999) ont été identifiées dans l'eau de mer de la plage Ouest de Sidi Fredj. Il s'agit de *V. furnissii*, *V. harveyi*, *V. nereis* et *V. mediterranei*.

Seulement sept espèces ont été identifiées à partir de l'eau de mer en fonction du pH dans l'étude de HENNICHE et REFFAF, (1999) contre 13 espèces dans ce travail. Ceci est peut être du à la période de prélèvement et à la méthode de travail qui diffèrent entre les deux études.

Par ailleurs, il est à noter que les même résultats de la diversité spécifique se retrouvent dans les deux contributions. En effet, d'après HENNICHE et REFFAF, (1999) le potentiel hydrogène le plus prolifique en espèces est de 8.6 et 9. Le même résultat est observé durant notre étude.

En comparaison avec le travail effectué par BOUDJAKDI, (2001) qui consiste en un isolement et une identification des vibrions dans le sédiment en fonction de la salinité, on retrouve pratiquement les mêmes espèces.

Le travail effectué par BOUDJAKDJI, (2001) a permis d'isoler les Vibrions après sélection d'un pH de 8.6 et de différentes salinités. La comparaison s'est effectuée entre les espèces isolées à une salinité de 2.5‰, salinité utilisée au cours de ce travail.

Les espèces suivantes *V. fluvialis I*, *V. fluvialis II*, *V. gazogene* et *V. vulnificus* n'ont pas été isolées dans l'eau de mer analysée, ils se retrouvent dans le sédiment prélevé par BOUDJAKDJI, (2001).

De plus, vu la variation des pH dans cette étude, quatre espèces ont été isolées contrairement au travail sus-cités, il s'agit de *V. metschnikovi*, *V. furnisii*, *V. anguillarum* et *V. ordali*.

En conclusion nous pouvons dire que l'étude comparative n'a pas révélé de grandes différences. Les deux études nous donnent à peu de variations les mêmes résultats. Nos résultats confirment ceux de HENNICHE et REFFAF, (1999).

Conclusion générale

CONCLUSION GENERALE

Dans ce présent travail nous avons tenter d'une part de déterminer le meilleur potentiel d'hydrogène pour l'isolement des *Vibrio*, et d'autre part de faire une identification de ce genre se trouvant dans l'eau de mer par l'étude des caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques.

Cette étude effectuée dans la plage Ouest de Sidi Fredj a relevé une grande diversité d'espèces, «13» espèces du genre *Vibrio* parmi les quarantaines connues à ce jour ont été isolées (LESNE et FOURNIER, 1998 ; LUNDER et al, 2000).

La salinité testée au cours de cette étude est de 2.5%, elle nous a permis également d'affiner la sélectivité des espèces halophiles.

◆ Etude quantitative

Cette étude nous a permis de dénombrer un grand nombre de colonies dans les échantillons à potentiel hydrogène 8.6 et 9, il s'agit respectivement de 3957 UFC/ml et de 1287 UFC/ml .

◆ Etude qualitative

Le pH 8.6 et 9 ont donné une plus grande diversité d'espèces, 11 et 8 espèces respectivement.

Cinq espèces parmi les «13» identifiés sont considérés comme pathogènes : *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus*, *V.alginolyticus*, *V.furnissii* et l'espèce pathogène opportuniste, *V.metschnikovi* (LAURENT et al, 1998 ; EUZEBY, 2000). L'espèce la plus pathogène pour les animaux marins (MARCHAND, 1986 ; ROUABAH et al, 1988) a également été détecté dans les isolats, il s'agit de *V.anguillarum*.

Le *V.parahaemolyticus* est l'espèce la plus souvent isolée, cette bactérie peut être la cause de toxi-infection grave, elle constitue dans certains pays un réel problème de santé publique en raison de la consommation accru des produits de la mer, en particulier de produits crus.

Par ailleurs, ce travail nécessiterait un nombre plus représentatif d'échantillons, il serait donc souhaitable d'étaler dans le temps une étude annuelle, biologique, écologique et toxigène afin d'avoir une sélection maximale du genre étudié de la famille des *Vibrionnaceae*.

Bibliographie

- ◆ **AFNOR, 1991.** Directives générales pour le dénombrement des micro-organismes: Méthodes pour le comptage des colonies à 30°C. ISO 4833. Normes française homologués, 2^{ème} Edit. 5p
- ◆ **ALSINA M ; BLANCH A.R ; 1994.** A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species. J. Appli. Bacteriol. 76 :79-85.
- ◆ **ANONYME, 1989.** Mémento Technique de l'Eau. Tome1. Edit. Degrémont et la Lyonnaise des eaux. Distribution Lavoisier: Tech et Doc: 592p.
- ◆ **ANONYME, 1998.** Culture de bactéries luminescentes. <http://www.users.imagnet.fr/~pol/PHOTOBAC2.htm>.
- ◆ **ANONYME, 1998.** Pandémies de choléra. Pour la science N°252. 6p. www.citeweb.net/svt32/journaux/cholera.htm.
- ◆ **ASSEFSAF A et LEUBNA-DJEMMAZI L, 1996.** Evaluation du stock et dynamique de l'oursin comestible *Paracentrotus lividus* (LAMARCK) dans la presqu'île de Sidi-Fredj. Mémoire Ing. ISMAL. 111p.
- ◆ **BERGEY, 1994.** Bergey's manuel of déterminative bacteriology. 9th Edit. William et Wilkins. 787p.
- ◆ **BIANCHI A ; BIANCHI M, 1972.** La numération des populations bactériennes du milieu marin. Tetys; 3(4): 697-704.
- ◆ **BIANCHI M ; MARTY D; BERTRAND J.C; CAUMETTE P; GAUTHIER M; 1988.** Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques. Edit. Masson. 447p.
- ◆ **BOUCHEMLA S.T ; 1998.** Contribution à l'étude de la dispersion des bactéries fécales dans l'eau de mer rejetée par l'émissaire du centre de Thalassothérapie : Modélisation et évaluation de la qualité microbiologique. Mémoire Ing. ISMAL. 69p.
- ◆ **BOURGEOIS C.M ; MESCLE J.F ; ZUCCA J ; 1990.** Microbiologie alimentaire. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaire. 2^{ème} Edit, Tome1, Paris : Lavoisier .422p.
- ◆ **BRISOU J ; 1955.** La microbiologie du milieu marin. Edit. Flammarion. Paris, Fr :11-31.
- ◆ **BRISOU J.F ; 1980.** Les bactéries marines. Edit. Masson. 209p.
- ◆ **BRUNI V ; CRISAFI E ; MAUGERI T. L ; ZACCONE R ; 1986.** Isolement et identification des vibriions d'une station expérimentale de mariculture. GERBAM, deuxième colloque international de bactériologie marine. CNRS. Edit. IFREMER. Acte de colloque n°3 : 475-481.

- ◆ **BULLOCK G.L ; 2000.** Vibriosis in fish. Fish Disease Leaflet (1977). Fish and wildlife service, Division of fisheries and wetlands Research, Washington, D.C. 20240. 1987.3p.
- ◆ **COUTURE B; 1990.** Bactériologie Médicale. Edit. Décaris Vigot. 258p.
- ◆ **DACOSTA Y ; 1995.** Effets comparés des différents modes de conditionnement sur la croissance des bactéries pathogènes responsable des intoxications alimentaires. Paris : Yves Dacosta .142p.
- ◆ **DECLERCK IR D, 1991.** La pathologie des poissons. Cours dans le cadre de stage international sur la pêche maritime, (AGCD). Université de grande Faculté des Sciences Agronomiques. 4p.
- ◆ **DELATTE J.P ; DELESMONT R ; 1986.** Vibrions halophiles et apports thermiques sur le littoral Français de la mer du Nord. GERBAM, deuxième colloque international de bactériologie marine. CNRS, Edit. IFREMER, N° 3 : 491-497.
- ◆ **DELLATRE J.M ; GRIMONT P.A.D ; KLIER A ; PAPIEROK B ; TANDEAU DE MARSAC N ; 2000.** Eau, microbes et santé. *Euroconférence sur l'eau*. Vargaftig B.B. Edit. Inst. Pasteur ; Paris, Fr ; 23-25-mars 2000 .15p. Euroconf@pasteur.fr.
- ◆ **DODIN A; CHAMOISEAU G; LEPERS J.P; CHARTIER C; 1986.** Epidemiologie et hygiène. Transport du vibron cholérique : Rôle éventuel du chameau. *Acad. Sc. Paris*, t 303, série III N° 13: 557-559.
- ◆ **DODIN A, DOSSO M; 1986.** Ecologie des vibron pathogènes. *GERBAM, deuxième colloque international de bactériologie marine-* CNRS, Edit. IFREMER, N° 3 :499-505.
- ◆ **DODIN A; FOURNIER JM; 1992.** Méthode de laboratoire pour le diagnostic du vibron cholérique et les autres vibrions. Unité choléra. Inst.Pasteur. Paris. 148p.
- ◆ **EDDELMAN H; 1998.** Isolation of Pure Culture of Bacteria. *Vibrio phospharum* from Squid or Ocean Fish. Bacteria Index page/INDIANA BIOLAB Web Sites/indbio@diskmet.com.
- ◆ **EISENBERG H; MEVARECH M; ZACCAI J; 1992.** Advances in protein chemistry. La Recherche N°317: 65-67.
- ◆ **EUZEBY J.P; 1999.** *V. harveyi*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. www.sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/harveyi.html
- ◆ **EUZEBY J.P ; 1999.** *V.pectenicidai*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. 5p. www.sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/tvibriopectenicida.html

Bibliographie

- ◆ **EUZEBY JP; 1999.** Principaux caractères bactériologiques permettant de différencier *V.haliotocoli* des autres espèces du genre *Vibrio* présentant des caractères phénotypiques communs. 4p. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/haliotocoli/html
- ◆ **EUZEBY J.P; 1999.** Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. Principaux caractères bactériologique permettant de différencier *V.pectenicida*, *V.penaicida*, et *V.tapetis* des autres espèces du genre *Vibrio* phénotypiquement apparentées. Dictionnaire de bactériologie. 2p. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/pectenicida/htm
- ◆ **EUZEBY J.P; 1999.** *V.scophthalmi*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. 3p. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/scophthalmi.html
- ◆ **EUZEBY J.P; 2000.** *V.wodani*. Dictionnaire de bactériologie vétérinaire. 5p. www.sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/wodani.html
- ◆ **FDA ; 1998.** Bacterial pathogen growth. Chapter' 20 ; Appendix 4. *In fish an fishery products hazars and controls guide*, 2nd. Departement of haelth and human services, Food and drugs administration, center for food safety and applied nutrition, office of sea food, Washington, DC :241-244. www.Seafood.ucdavis.edu/HACCP/compendium/chapt20.htm.
- ◆ **FIGUERAS A; ROBLEBO J.A.F; NOVOA B; 1996.** Brown ring disease and parasites in clams (*Rudi tapes decussatus* and *R. Philippinarum*) From Spain and Potugal. *J. Shell fish Res*, N°15:363-368
- ◆ **FLANDROIS J.P ; 1997.** Bactériologie Médicale. Collection Azoy. Press universitaire de Lyon : 201-205.
- ◆ **FOURNIER J.M; DASSY B; FSIHI H; BOUTONNIER A.; VILLENEUVE S ; 1996.** Programme de recherche sur un vaccin anticholérique chimiquement défini: Unité du choléra et des vibrions :1-4. www-sv.cict.fr/bacterio/bacdico/vv/cholvib.htm
- ◆ **FURNISS A.L ; DONOVAN T.J ; 1976.** The Gram négative non sporing rods : Vibrios Collins CH ; Lyne P.M (Editors). Microbiological methods. 4th Edit Butterworths : 341-396.
- ◆ **GAUTHIER M ; PIETRI C ; 1989.** Devenir des bactéries et virus entérique en mer. Micro-organisme dans les écosystèmes océanique. Edit. Masson. 447p.
- ◆ **GELINAS P ; 1995.** Répertoire des micro-organismes pathogènes. Edit. Edisem . 207p
- ◆ **GUECHI Z ; 1986.** Epidemiologie du choléra en Algérie de 1971 à 1985. *Arch. Inst. Pasteur en Algérie*, 55: 15-24.
- ◆ **HARIS L; OWENS L; SMITH S;1996.** A sélection médium for *Vibrio harveyi*. Appl.. Environ. Microbio; N°62: 3548-3550. www.bacterio.cict.fr/bacdico/vv/harveyi.html.

Bibliographie

- ◆ **HASLAY C ; LECLERC H ; 1993.** Microbiologie des eaux d'alimentation. Edit. Tec et Doc . 495p
- ◆ **HENNICHE A ; REFFAF M ; 1999.** Isolement et identification des Vibrions dans la presqu'île de Sidi Fredj. Mémoire Ing. ISMAL . 60p
- ◆ **LECLERC H ; BUTTIAUX R ; GUILLAUME J ; WATTRE P ; 1977.** Microbiologie appliquée. Edit. Doin, Paris. 223p.
- ◆ **LECLERC H ; GAILLARD J.L ; SIMONET M ; 1995.** Microbiologie générale : la bactérie et le monde bactérien. Edit. Doin, Paris. 535p.
- ◆ **LEGENDRE L ; LEGENDRE P ; 1984.** Ecologie numérique: le traitement multiple des données écologiques. Press de l'Université du Québec. 2^{ème} Edit. Masson
- ◆ **LE GUYON R ; 1960.** Précis de bactériologie. Edit. Doin. 955p.
- ◆ **LEMINOR L ; 1990.** Bactériologie médicale. Médecin-science ; 2^{ème} Edit. Flammarion, Paris. 1107p.
- ◆ **LEMOINE T ; GERMANETTO P ; GIRAUD P ; 1999.** Toxi-infection alimentaire collective à *V.parahaemolyticus*. Cours de L'IDE. 11p. www.rnsp-sante.fr/beh
- ◆ **LESNE J ; FOURNIER M ; 1998.** Manuel de Bactériologie Alimentaire. Edit. Polytechnica : 260-304.
- ◆ **LUNDER T ; SORUM H ; HOLSTAD G ; STEIGERWALT A.G ; MOWINCKEL P ; BRENNER D.J ; 2000.** Phenotypic and genotypic characterization of *Vibrio viscosus* sp. nov. and *Vibrio wodanis* sp. nov. Isolated from Atlantic salmon (*Salmo salar*) with winter ulcer. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* :427-450.www.sv.cict.fr/bacterio/uw/vibrio.html.
- ◆ **MARCHAL M ; BOURDON J.L ; RICHARD C.L ; 1987.** Les milieux de cultures pour l'isolement et identification biochimique des bactéries. 3^{ème} Edit. Doin. 505p.
- ◆ **MARCHAND M ; 1986.** Etude écologique des Vibrions du bassin d'Arcachon. *GERBAM, deuxième colloque international de bactériologie marine-* CNRS. Edit. IFREMER N°3: 483-489.
- ◆ **MAUGERI T.L ; BRUNI V ; 1991.** Les Vibrions halophiles comme index de qualité des eaux et des produits marins. Revue Internationale d'Océanographie Médicale. *CERBOM*. Tomes 101-102-103-103: 72-82.
- ◆ **MEYER A ; DEIANA J ; LECLERC H ; 1995.** Cours de microbiologie générale, nouveau programme. Doin 2^{ème} Edit : 365p.
- ◆ **MOREIRA V.M ; 2000.** Traitement du cholera :Généralités, Epidémiologie. AMHERJ. Brésil. 13p.www.cholera_princi.htm.

Bibliographie

- ◆ **OMS/PNUE, 1995.** Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage récréatif et des zones conchylicoles. Partie I. Recommandation générale. EUR/CEHO 041(2) Rev.1.67p
- ◆ **OMS/PNUE, 1995.** Recommandations pour la surveillance sanitaire des zones côtières à usage réactif et des zones conchylicoles. Organismes indicateurs bactériens (partie II). EUR/ICP/CEH041(3). 150p.
- ◆ **OMS ; 2000.** Le choléra. Aide mémoire N°107. www.who.int.
- ◆ **PEIFFER B ; 1998.** Infection alimentaire à *Vibrio parahaemolyticus*. 2p. www.chez.com/guatemalt.
- ◆ **PEIFFER. B ; 1999.** CHOLERA.8p. www.cholera.htm.
- ◆ **PLUSQUELLEC A ; 1984.** Contribution à l'étude de la pollution bactérienne des eaux littorales. Cas particulier de la baie de Concarneau la forêt. Thèse Doc. 3^{ème} cycle.Univ. Bretagne Occidentale; Brest. 190p.
- ◆ **POGGI R; 1990.** Impacts sanitaires des contaminations microbiologiques. *Actes de colloque sur la mer et les rejets urbains*. IFREMER N°11 : 115-132.
- ◆ **POMMEPUY M ; DUPRAY E; GUILLAUD J.F; DARRIEN A; L'YAVANAC J; CORMIER M ; 1991.** Rejets urbains et contamination fécale. *Oceanologica acta*. Vol.SP, N°11 : 321-327.
- ◆ **POMMEPUY M; DUPRAY E; GUILLAUD J.F; DARRIEN A; L'YAVANAC J; CORMIER M; 1992.** Enteric bacteria survival factor. *Wat. Sci. Tech.* Vol 25, N°12:93-103.
- ◆ **POMMEPUY M ; CORMIER M ; AUDIC J.M ; LE GUARDER F ; GUILLAUD J.F ; 1994.** Le devenir des micro-organismes rejetés en mer. Equinoxe spécial environnement littoral. N°47/48 : 58-60.
- ◆ **PRESCOTT ; HARLEY ; KLEIN ; 1995.** Microbiologie. De Boeck Université 2^{ème} Edit. 1014p.
- ◆ **PRIEUR D ; PARKES J ; 1999.** La biomasse cachée des fonds océaniques. La recherche N°317:58-61
- ◆ **RAMESH A ; VENUGOPALAN V.K ; 1986.** Ecophysiological studies on luminous bacteria associated with marine gasteropods. GERBAM, deuxième colloque international de bactériologie marine. CNRS. Edit. IFREMER N°3 : 445-450.
- ◆ **ROUABAH A ; GUEORGUIEV G ; BELKACEM D M ; BERRAK A ; 1988.** Guide pratique des maladies du poissons d'eau douce. Edit. C.E.R.P ; BOU ISMAIL.47p.

Bibliographie

- ◆ SHIEH W.Y ; CHEN A.L ; CHIU H.H ; 2000. *Vibrio aerogenes* sp. Nov ; a facultatively anaerobic marine bacterium that ferments glucose with gaz production. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* : 321-329. www.sv.cict.fr/bacterio/uw/vibrio.html.
- ◆ SINGLETON P ; SAINSBURY D ; 1984. Abrégé de bactériologie. Edit. Masson : 151.
- ◆ SINGLETON P ; 1997. Bactériologie. Dunod 4^{ème} Edit. 415p.
- ◆ SKERMAN V.B.D; MCGOWAN V; SNEATH P.A.A; 1980. Approved lists of bacterial names.. *Int. J Syst. Bacteriol*: 225-420. www.sv.cict.fr/bacterio/uw/vibrio.html.
- ◆ SUTRA L; FEDERIGHE M; JOUVE J.L; 1998. Manuel de Bactériologie Alimentaire. Polytechnica. Edit. Paris: 261-303.
- ◆ TANNER A.C ; HERBERT R.A ; 1982. A numerical taxonomic study of Gram negative bacteria isolated from the Antarctic marine environment . Edit. *CNEXO*, N°13 : 31-38.
- ◆ TROUSSELLIER M ; ALBAT M ; ANDRE P ; BALEUX B : 1985. Dénombrements directes des bactéries dans les milieux aquatique par microscopie en épifluorescence : distribution et précision des mesures, *Revue française des sciences de l'eau*, 35-49p.
- ◆ URDACI-BERTRAN M.C ; 1987. Le genre *Vibrio* : Approche eco-épidémique et taxonomie des espèces isolées du Sud Ouest européen. *Thèse Doct*, Univ. Bordeaux I. 181p.
- ◆ VERON M ; POPOFF M ; 1990. Vibrionaceae. Leminor, Veron Edit. Médecin-science 2^{ème} Edit. Flammarion, Paris : 1095-1107.
- ◆ ZACCAI J ; FRANZETTI B ; 1999. Un pacte moléculaire avec le sel. *La recherche* N°317: 62-64.
- ◆ ZOBELL C.E ; 1946. *Marin hydrobiology. A monograph on hydrobacteriology*. Waltham. Mass. USA, Edit. Chronica Company.230p.

AMERICAN EXPRESS

Annexe

Annexe 1 : Résultats bruts de l'analyse quantitative (Comptage des colonies).

Prélèvement n°1 :

pH/dilution	-1			-2			-3		
8.6	In	In	N	83	101	85	0	0	0
9	N	In	N	17	95	40	0	0	0
9.4	In	N	N	0	10	20	0	0	0

Prélèvement 2 :

pH/dilution	-1			-2			-3		
8.6	In	In	In	170	156	250	10	2	0
9	N	N	N	95	168	30	0	0	0
9.4	N	N	N	2	1	4	0	0	0

Prélèvement 3 :

pH/dilution	-1			-2			-3		
8.6	In	In	In	230	168	93	0	0	0
9	N	N	N	93	53	165	0	0	0
9.4	N	N	N	5	6	5	0	0	0

Annexe 2-1

La coloration Gram

Technique:

- ◆ Recouvrir la lame complètement de la solution 1 (Solution de violet cristallisé) puis colorer pendant une (1) minute.
- ◆ Rincer prudemment à l'eau distillée pendant environ 5 secondes.
- ◆ Recouvrir la lame complètement de la solution de Lugol, puis laisser agir pendant une (1) minute.
- ◆ Rincer prudemment à l'eau distillée pendant environ 5 secondes.
- ◆ Immerger la lame dans une solution décolorante $\frac{3}{4}$ (alcool à 85°) en remuant pendant environ 20 à 60 secondes.
- ◆ Rincer à l'eau distillée pendant environ 5 secondes.
- ◆ Recouvrir la lame complètement de la solution de Fushine (ou Safranine), colorer pendant une (1) minute et décanter.
- ◆ Rincer prudemment à l'eau distillée pendant environ 5 secondes.
- ◆ Laisser sécher.

Annexe 2-2 :

◆ **Eau peptonée alcaline concentrée 10 fois**

Composition en g/l :

peptone	15
Nacl	25
Eau distillée	11

Autocalver à 120 ° C pendant 15 minutes .
PH ajuster à 9 pour qu'il soit à 8.6 après autoclavage.

Utilisation : Milieu d'enrichissement des Vibrions.

◆ **TCBS (Thiosulfate citrate Bile Salts Sucrose, Kobavasi, 1963)**

Composition en g/l :

Peptone de caseïne	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 desséchée	5.0
Cholate de sodium	3.0
Saccharose.....	20.0
Chlorure de sodium	3.0
Citrate ferrique.....	1.0
Bleu de thymol.....	0.04
Bleu de Bromothymol.....	0.04
Agar-agar.....	14.0

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

Utilisation : Milieu sélectif des Vibrions.

• **GNAB :**

Composition en g/l :

Peptone.....	10
Extrait de viande de bœuf	10
Laurylsulfate de sodium	0.1
Chlorure de soduim.....	20
Carbonate de soduim	5
Sacharose.....	10
Agar.....	10

pH final 9.2

Utilisation : Milieu d'isolement des vibrions.

• **Milieu de Muller-Hinton :**

Composition en g/l :

Infusion de viande de bœuf.....	300
Hydrolysate de caseïne.....	17.5
Amdon.....	1.5
Gélose	17

Utilisation : Etude de la sensibilité aux antibiotiques.

Oxydase :

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

• **Bouillon nitraté salé:**

VL semi-solide	1000ml
Glucose.....	2g
Nitrate de sodium	5g

• **Milieu clark et lubs:**

Composition en g/l :

Peptone tryptique polypeptone.....	5 à 7
Glucose.....	5
Phosphate bipotasique.....	5

Dissoudre en chauffant légèrement. pH final : 7. Répartir à raison de 5 ml par tube ; stériliser par autoclavage de 30 minutes 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 mytil.

La voie butylène glycolique est déterminée par la réaction Vogues-Proskauer.

• **Les 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.

Les différents sucres sont stérilisés par filtration et ajoutés à une concentration finale de 1%

Utilisation : Détermination de la dégradation ou non des sucres.

• **Recherche de decarboxylases : (LDC,ODC, ADH)**

Milieu de Falkow :

Composition en g/l

Extrait de levure	3
Glucose	1
NaCl.....	5
Bromocrésol poupre (solution à 1.6 %)	1

Prévoir trois (3) lots auxquels on ajoute respectivement 0.5 % de L-lysine (monochlorohydrate) et un lot témoin sans aminoacides.

*PH finals : 6.3 -6.4. La stérilisation est effectuée à 120 °C pendant 15 minutes.

Utilisation : la mise en évidence de la lysine decarboxylase, ornithine decarboxylase et l'arginine dihydrolase.

• **Milieu urée- Indole:**

L-tryptophane	0.3 g
KH ₂ PO ₄	0.1 g
K ₂ HPO ₄	0.1 g
NaCl.....	0.5 g
Urée.....	2 g
Alcool à 95%.....	1 ml
Rouge de phénol à 1%	0.25 ml
Eau distillée.....	100 ml

Dissoudre L-triptophane dans l'eau distillée chauffée à 60°C ; refroidir et dissoudre les autres ingrédients. Stérilisation par filtration.

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

• **Milieu manitol- mobilité:**

Composition en g/l :

Peptone trypsique de viande	20
Agar.....	4
Mannitol.....	2
KNO ₃	1
Rouge de phénol à 1%.....	4 ml

pH final : 7.6-7.8. Autoclaver à 110 °C pendant 30 minutes.

Utilisation : Ce milieu permet de rechercher simultanément la fermentation du manitol et la mobilité.

• **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 : 7.4. 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-ammoniaque.....	1
Phosphate bipotassique.....	1
Citrate de sodium.....	5
Chlorure de sodium.....	2*
Bleu de bromothmol.....	0.08
Agar.....	15

*La formule proposé par le diagnostics Pasteur ne contient que 1g de Citrate de sodium.

Dissoudre à chaud .Ajuster à pH 6.8

Répartir à raison de 5 à 7 ml par tube . Autoclaver 15 minutes à 120°C.

Utilisation : seules les bactéries possédant une Citrate-perméase sont capables d'utiliser le ncitrate comme soudre 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 20 minutes à 115°C.

Utilisation : Etude du type respiratoire.

• **Gélose gélatine :**

Composition en g/l :

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

Utilisation : la gélatine 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 distillé.....	1000ml

ph ajusté 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 3

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

Famille	Antibiotique	Origine	Décou- -verte	Spectre d'activité			
				Cocci +	Gram -	Bacille +	Gram -
Polypeptides	Polymixines	<i>Bacillus polymyxa</i>	1947	-	-	-	+
basiques	Bacitracine	<i>Bacillus licheniformis</i>	1945				
Phénicol	Chlorophénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	1944	+	+	+	+
Oligosaccharides	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	1944				
	Neomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>	1949	+	+	+	+
	Gentamycine	<i>Micromonospora monosporae</i>	1967				
Macrolides	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	1954	+	+	+	+
Rifamycines	Rifampicine	<i>Streptomyces méditerranée</i>	1948	+	+	+	+
Tétracyclines	Tétracycline	<i>Streptomyces texasi</i>	1953	+	+	+	+

Tableau 2: Mode d'action des antibiotiques (SINGLETON et SAINSBURY, 1984 ;LECLERC et al 1993)

Antibiotique	Symbole de l'ATB	Mode d'action
Inhibition de la synthèse protéique		
Teraccyline	TE	Fixation sur la sous-unité 30 s du ribosome de la fixation de l' aminoacyl-ARNt sur le site ribosomale spécifique
Phénicolés		Fixation sur la sous-unité 50s du ribosome et inhibition de la formation de la liaison peptidique.
Macrolides		Fixation de la sous-unité 50s de la fixation de l' aminoacyl-ARNt , de la formation de la liaison peptidique , ou de la translocation du peptide.
Neomycine	N	Fixation sur la sous-unité 30 s, empêche la synthèse protéique
Streptomycine	S	Fixation sur la sous-unité 30 s, empêche la synthèse protéique
Gentamycine	GM	Fixation sur la sous-unité 30 s du ribosome, empêche la synthèse des protéines
Altération des membranes		
Polymixines	PB	Désorganisation membranaire par fixation sur les phospholipides et le LPS
Inhibition des acides nucléiques		
Sulfamides	SS	Inhibition de la synthèse des folates (précurseurs des bases puriques) par compétition avec la dihydroptéroate-synthétase
Rifampicines	RA	Inhibition de la transmission de l'ADN par fixation sur l'ARN polymérase ADN dépendante.

