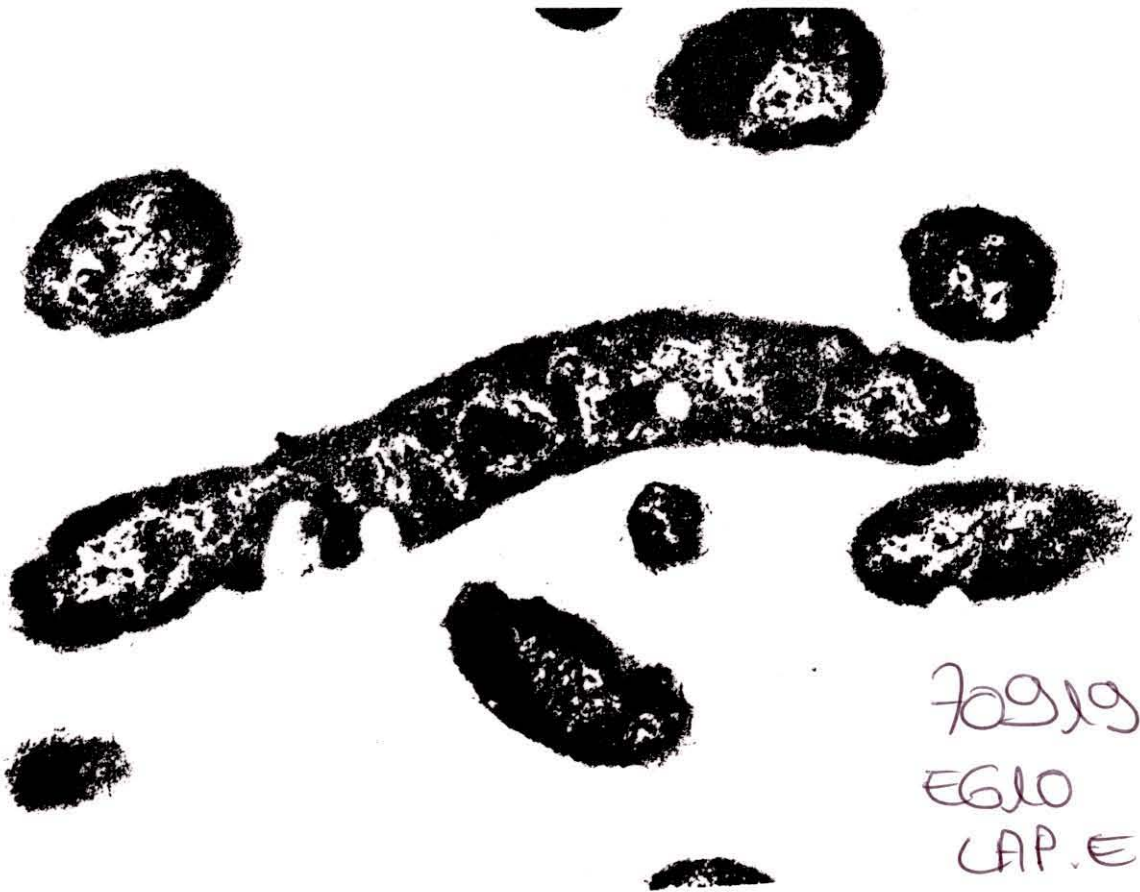


Université de Caen
DESS "Exploitation des Ressources Vivantes Côtières"
Année Universitaire 1996 - 1997

IFREMER
BIBLIOTHEQUE
LA TREMBLADE

**ETUDE D'UN MILIEU GELOSE SEMI- SELECTIF POUR LA
RECHERCHE DE *VIBRIO PENAECIDA*
TESTS DE NOUVELLES METHODES DIAGNOSTIQUES DANS LE CADRE DU
PROGRAMME DE RECHERCHE SUR LE SYNDROME 93**



LAPOUYADE Patrick

01 Mars - 31 juin 1997

Laboratoire de Génétique, Aquaculture et Pathologie
(La Tremblade)

Groupement d'Intérêt Economique de Recherche Aquacole (Nouvelle - Calédonie)
Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire (Nouvelle - Calédonie)

IFREMER Bibliothèque de la Tremblade



OLR 02021

Je remercie avant tout les personnes qui m'ont permis de pousser un peu plus loin mes investigations calédoniennes en m'offrant l'opportunité de travailler à leurs côtés.

Un grand merci donc à André GERARD pour m'avoir laissé perturber la relative quiétude de son laboratoire.

Merci à Franck BERTHE pour avoir eu confiance en moi et avoir souvent affronté l'administration à ma place...

Un merci tout spécial à Cyrille GOARANT qui le premier, m'a transmis sa curiosité naturelle et le « virus aquacole ».

Toute mon amitié à Philippe HAFFNER qui est resté de marbre malgré mes excès d'humeur et a toujours su me parler quand c'était nécessaire, cela manque tellement de nos jours !

Merci à Cécile LIPART pour tous les petits trucs qui sauvent et sa grande expérience de la lessive.

De même, je tiens à remercier Tristan RENAULT pour sa disponibilité et ses conseils, et Nathalie COCHENNEC pour sa bonne humeur et ses bidules électroniques.

Un grand merci à tous ceux qui, d'une manière ou d'une autre m'ont permis d'apprécier mon passage au laboratoire.

I. RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE	2
A. La Pénéiculture	2
B. Les atouts du territoire	3
C. La pathologie des crevettes	4
1. Pathologies non infectieuses et opportunisme	4
2. Maladies d'origine bactérienne	5
D. CHOIX D'UNE THERAPEUTIQUE	7
1. Traitements curatifs : les thérapeutiques antibactériennes	7
2. Prévenir c'est déjà guérir ?!	8
II. MATERIELS ET METHODES	10
A. Souches bactériennes de référence	10
B. Milieux de culture et de conservation des souches	11
C. Détection de <i>Vibrio penaeicida</i> et utilisation du milieu ZMSB	11
1. Tests de spécificité du milieu ZMSB	13
2. Recherche de <i>V. penaeicida</i> en eau de mer.	14
3. Caractérisation biochimique, confirmation de la présence de <i>V. penaeicida</i>	15
4. Elaboration d'un sérum anti- <i>V. penaeicida</i> AM101	17
III. RESULTATS	19
A. Caractérisation biochimique des souches de référence	19
B. Détection de <i>Vibrio penaeicida</i> et utilisation du milieu ZMSB	21
1. Tests de spécificité du milieu ZMSB	21
2. Recherche de <i>V. penaeicida</i> en eau de mer.	23
3. Caractérisation biochimique, confirmation de la présence de <i>V. penaeicida</i>	23
4. Tests des sérums anti- <i>V. penaeicida</i> AM101	23
IV. EN RESUME	24

INTRODUCTION

Dans les vingt dernières années, la production aquacole de **crevettes pénéides** a été dramatiquement affectée dans de nombreux pays par des maladies infectieuses généralement épidémiques et qui prennent peu à peu un caractère endémique.

Depuis 1993, les élevages néo-calédoniens subissent ainsi des pertes considérables durant la période de mai à octobre (dite saison froide). Ces épisodes morbides touchent l'ensemble des fermes aquacoles et engendrent parfois une chute de la production en dessous du seuil de rentabilité. Le "syndrome 93", terme consacré par l'usage pour désigner la mortalité anormale qui touche ces élevages, peut être relié à de nombreux facteurs. L'augmentation progressive des densités d'élevage dans les fermes, les apports nutritionnels mal maîtrisés et autres, affectent l'état physiologique et immunologique des animaux, corrélativement plus sensibles aux agents infectieux, qu'ils soient opportunistes ou pathogènes.

Il semblerait que l'amélioration des zootechnies, axé sur un accroissement de production, engendre un bouleversement de l'équilibre écologique existant, entre l'espèce exploitée, son milieu et les pathogènes éventuels qui s'y développent. Cette rupture révèle, dans la plupart des cas, une maladie qui peut alors engendrer une crise importante à l'échelle de l'exploitation.

A partir de 1994, diverses études bactériologiques effectuées en Nouvelle-Calédonie ont montré une forte prévalence de vibrions (agent causal résumé sous l'appellation de genre *Vibrio*) de type "1042" (code API 10E) lors des pics de mortalité. Par la suite, plusieurs essais d'infections expérimentales par injection intra-musculaire ont révélé le fort pouvoir pathogène du type bactérien isolé par rapport aux autres souches testées (Froissard *et al.*, 1995). Ces résultats et les études menées en identification des souches isolées (tests biochimiques et ribotypage) ont conduit à faire des vibrions du type de *Vibrio penaeicida* (Ishimaru *et al.*, 1995) la cible de toutes les attentions.

Alors qu'à l'heure actuelle, on ne bénéficie d'aucun procédé de vaccination des invertébrés (puisque leur système immunitaire n'est basé sur aucune médiation par immunoglobulines), l'acquisition de nouvelles techniques de **diagnostics** des maladies infectieuses et une meilleure connaissance des phénomènes pathologiques qui s'y rattachent, sont les conditions *sin equa non* d'une pérennisation du système aquacole.

Or, la caractérisation de *Vibrio penaeicida* par des tests biochimiques classiques prend souvent plus de temps qu'il n'est permis lorsque des vibrioses commencent à affecter les élevages et qu'il est nécessaire de les mettre rapidement sous contrôle pour éviter la propagation de mortalités désastreuses.

L'objectif de cette étude est donc de présenter un outil diagnostique utilisable dans la mise en évidence de *Vibrio penaeicida* dans les élevages néo-calédoniens. Lors de ce travail, nous avons cherché à développer un outil fiable (parce que donnant des résultats répétables), relativement rapide à mettre en place (délai de 24 à 48 heures), simple d'utilisation et peu prohibitif.

Pour toutes ces raisons, priorité a été donnée à la mise au point d'un **milieu gélosé semi-sélectif** qui, relayé par une gamme de 12 **tests biochimiques** simples, permet de discriminer *Vibrio penaeicida* par rapport à d'autres bactéries vibrionacées susceptibles de se développer en pénéculture.

I. RAPPEL DE LA PROBLEMATIQUE

A. LA PENEICULTURE

C'est dans les années trente, sous l'égide du chercheur japonais Fujinaga, que débute l'histoire moderne de l'élevage des crevettes péneïdes. Depuis, cette activité n'a cessé de se développer.

Ainsi, l'augmentation de la production mondiale de crevettes à la fin des années 80 et pendant le début des années 90 est due essentiellement à des apports de plus en plus importants de la part de l'aquaculture.

Cette production a connu une constante augmentation entre 1986 et 1992, avant de connaître un arrêt brutal, en 1993 en raison de l'apparition de plus en plus fréquentes de maladies d'étiologies diverses. Après une reprise en 1994 (733 000 tonnes), suivie d'une nouvelle régression en 1995, l'élevage de crevettes péneïdes reste une activité importante à l'échelon mondial avec 712 000 tonnes produites en 1995 (Fish Farming international, Janvier 1996).

La Thaïlande, la Chine, l'Indonésie, et l'Amérique du Sud (notamment l'Equateur) fournissent à eux seuls les deux tiers de la production mondiale. Cependant, même ces pays à vocation aquacole doivent désormais faire face à l'apparition des maladies. Ainsi, l'Indonésie ne produit plus que 80 000 tonnes, l'Inde jusqu'à 60 000 tonnes alors que la production Chinoise se retrouve aux alentours des 70 000 tonnes.

Dans la majorité des pays producteurs de crevettes, la pénéculture est souvent passée d'un mode de production traditionnel extensif à un mode de production intensif et technologiquement complexe. Dans de nombreux cas, les zones et les surfaces d'élevage ont été multipliées de façon explosive, ce qui s'est traduit par des modifications et des altérations parfois graves de l'environnement. De fait, dans certaines régions du monde, la pénéculture se trouve dans une situation critique, en terme de pérennité et de développement, car des mortalités massives dues à des pathologies d'étiologies variées affectent les élevages.

Malgré un net retrait des productions après la crise de 1993, la production mondiale de crevettes a quand même dépassé 2,6 millions de tonnes l'année dernière. A l'heure actuelle, la récolte dans plus de 50 pays producteurs représente 27% de ce total grâce aux fermes d'élevage.

Enfin, en dépit d'une production annuelle estimée à 712.000 tonnes pour 1995 (78% par des fermes asiatiques) la demande reste en constante progression.

B. LES ATOUTS DU TERRITOIRE

Pour se positionner sur le marché, la **Nouvelle-Calédonie** dispose de nombreux atouts favorables à ce type d'activité :

- # une température de l'eau de mer propice à une **production annuelle** ;
- # l'existence de **terrains aménageables** près des mangroves ;
- # et enfin une **position stratégique** non négligeable dans le Pacifique relayée par une bonne desserte aérienne ;

C'est à partir de plusieurs espèces importées et testées, que *Penaeus stylirostris* a été retenue en vue de lancer la pénéculture en Nouvelle-Calédonie (figure 1).

Classe des MALACOSTRACÉS	
Sous-classe des EUMALACOSTRACÉS	
Super-ordre des PERACARIDÉS	
Ordre des DÉCAPODES	
Sous-ordre des PENAIDEA, comprenant deux super-familles	
❶ Les SERGESTOIDEA	❷ Les PENAEOIDEA
-Sergestidae avec 11 espèces	-Solenoceridae 17 espèces
	-Aristaeidae 8 espèces
	-Peneidae 110 espèces
	-Sicyoniidae 10 espèces
Le sous-ordre des Penaeidea contient 5 familles représentant 156 espèces connues dont 48 d'intérêt économique parmi lesquelles 20 sont actuellement produites par l'aquaculture.	

Figure 1 : rappels de systématiques

Tout d'abord, cette espèce est particulièrement intéressante en raison de ses bonnes performances de croissance jusqu'à 25-30 grammes, aussi bien en saison froide qu'en saison chaude. Ensuite, elle est appréciée sur le marché international où elle ne représente pour l'instant que 1% des crevettes d'aquaculture.

La *figure 2* présente l'évolution de la production Néo-calédonienne depuis 1989. L'augmentation des tonnages produits par le Territoire lors des six dernières années est liée d'une part à l'**accroissement des surfaces exploitées** et d'autre part, à l'**évolution de la maîtrise technique des élevages**.

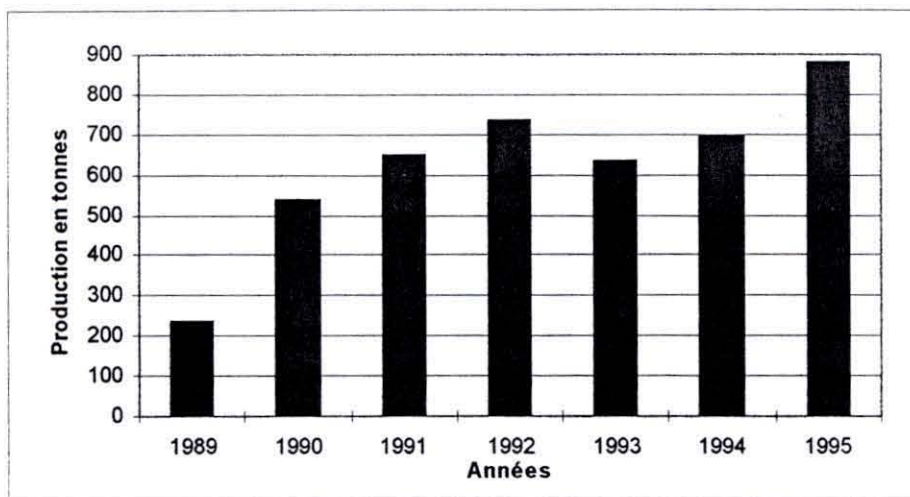


Figure 2 : Production de crevettes pénéides en Nouvelle-Calédonie de 1989 à 1995 (Rapport d'Activité SASV).

Cependant, cette **augmentation** globale est à nuancer en **fonction des sites**. En effet, en 1995, la ferme d'Aquamon enregistre une légère reprise (126,42 tonnes produites contre 113 en 1994). Inversement, la production des bassins de Dumbéa est en baisse et passe de 39 à 27 tonnes environ, tout comme celle de Sodacal (243 à 225 tonnes).

Parallèlement à une croissance de production, la **productivité** des sites est en **augmentation** puisqu'elle est passée de 1,41 tonnes par hectare et par an en 1989 à 5,25 t/ha/an en 1995. Mais là encore, le choix des techniques, la diversité des fermes quant à leur âge, leur conception, leur productivité ou encore leur gestion rendent difficile une appréhension globale de la filière.

Si divers problèmes liés à cette intensification n'ont pas permis d'atteindre les objectifs espérés en 1993-94, **on peut croire au développement de la filière** aux vues des nouveaux **projets d'exploitation** et du grand nombre de sites susceptibles d'être valorisés.

C. LA PATHOLOGIE DES CREVETTES

1. Pathologies non infectieuses et opportunistes

Il est évident que les conditions de l'environnement, tels que les températures, le pH, la salinité ou la teneur en oxygène dissous affectent directement les crevettes mais les symptômes engendrés par de tels affections comme leur étiologie sont particulièrement difficile à déterminer (syndromes "cramped tail", "carapace molle"...).

De plus, les animaux sont exposés à des populations bactériennes endémiques (germes libres dans le milieu ou dont les animaux peuvent être porteurs) qui trouvent dans les sites de production (écloserie surtout et grossissement dans une moindre mesure) des facteurs de développement très favorables en raison des conditions particulières de température, de densité et de nourrissage. Les concentrations de populations animales exacerbent alors les effets néfastes de nombreux agents potentiellement pathogènes alors que le confinement

empêche toute fuite face à un milieu devenu hostile : on peut dire que la conduite de l'élevage révèle les pathogènes.

La santé des animaux est donc la résultante d'un équilibre délicat entre ceux-ci, les pathogènes potentiels et le milieu de développement. C'est d'un point de vue global que l'on se doit d'appréhender le système d'élevage afin de mieux comprendre le phénomène multifactoriel de la pathologie.

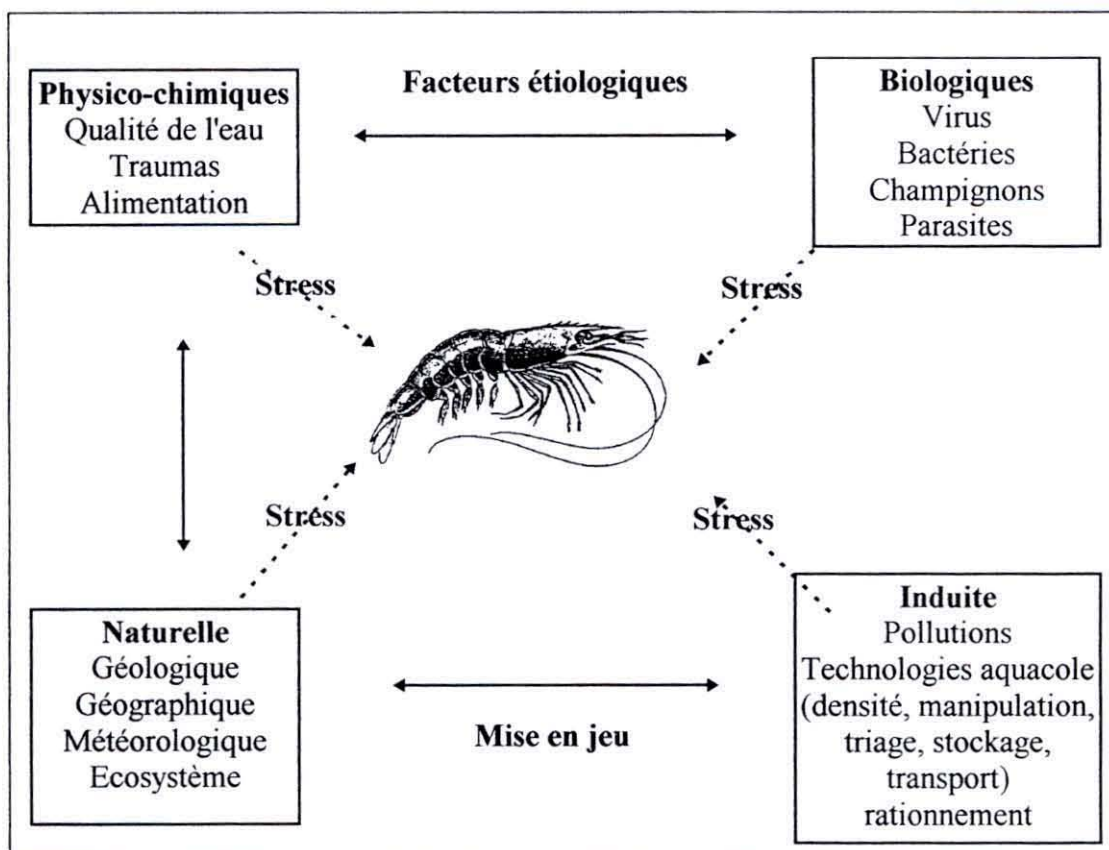


Figure 3 : Schéma général des causes des maladies des crevettes et de leur déclaration

(d'après de Kinkelin et al., 1994).

Si sur l'ensemble du territoire calédonien et à la station de St-Vincent la pénéculture reste une production de type semi-intensive (15 à 25 animaux/m² à l'ensemencement) à semi-intensive intensifiée (25 à 40 animaux/m²), il n'en demeure pas moins que nombre de problèmes liés à toute forme d'intensification persistent (Charmantier, 1991).

2. Maladies d'origine bactérienne

Les bactéries isolées du milieu marin sont essentiellement des germes à Gram négatif. Ces souches se caractérisent également par une exigence ou une tolérance vis-à-vis du NaCl, certaines ayant même des besoins accrus en ions K⁺, Mg²⁺ et Ca²⁺ par rapport aux bactéries terrestres non halophiles.

Les membres de la famille des Vibrionacées sont des bacilles Gram négatif en forme de bâtonnets droits ou incurvés. Les bactéries du genre *Vibrio* ont des dimensions de l'ordre

de 0,5 à 0,8 μm de large, et sont mobiles grâce à un ou plusieurs flagelles polaires. La plupart sont oxydase positifs et tous utilisent le glucose comme source principale de carbone et d'énergie avec acidification mais sans émission de gaz (sauf *V. furnissi*, *V. gazogenes* et *Listonella [Vibrio] damsela*). Les ions sodium stimulent leur croissance et sont même indispensables au développement de certaines espèces. Anaérobies facultatifs, ces micro-organismes sont très répandus en milieu aquatique selon un large spectre de salinité et constituent la plus grande part de la flore bactérienne marine. On peut également les rencontrer à la surface du tégument ou au niveau du tractus digestif de certains animaux marins.

Si une douzaine d'espèces seulement sont pathogènes chez l'homme, un grand nombre de vibrions sont responsables de maladies graves chez les vertébrés et les invertébrés marins.

Les *Vibrio* sont des bactéries aquatiques, océaniques ou non que l'on trouve sous forme libre (microvibrions adaptés aux conditions oligotrophiques) et fixée sur des supports comme les exosquelettes de chitine, la cellulose, les carbonates de calcium ou le zooplancton (Bianchi, 1976).

Il ressort des différentes études effectuées (Hernandez *et al.*, 1994 ; Itami *et al.* 1991) que la flore commensale des pénéides (tractus digestif : dégradation de l'amidon, des acides gras, de la chitine ou encore de la cellulose) est dominée par des germes des genres *Vibrio* et *Pseudomonas* qui sont pourtant potentiellement pathogènes.

Ces micro-organismes peuvent se révéler redoutables en aquaculture. Pour Ligthner (1980), la majorité des infections bactériennes des crustacés sont secondaires. Dans la quasi-totalité des cas d'infection bactérienne chez les adultes, des souches bactériennes Gram-, oxydase +, fermentatives, mobiles, sont incriminées et isolées sur et dans les animaux. La plupart sont des **vibrions** mais occasionnellement on trouve d'autres genres bactériens comme *Aeromonas* et *Pseudomonas*. Toutes font partie de la microflore associée naturelle des animaux, c'est à dire n'exprimant un pouvoir pathogène qu'en cas de faiblesse de ceux-ci. On tend de plus à considérer certaines infections à vibrions comme une rupture d'équilibre des conditions du milieu plutôt que dues à un pathogène spécifique.

Les infections prennent deux formes : les nécroses localisées de la cuticule ou des infections internes au niveau du tube digestif (Weppe *et al.*, 1991). L'agent pathogène provoque une érosion de la cuticule par la sécrétion de chitinases. Si l'hôte ne peut bénéficier d'une bonne défense immunitaire, l'infection dégénère en septicémie qui conduit à la mort de l'hôte (Berthe, 1995).

Depuis le début de l'année 1993, des mortalités anormales, sous forme de flambées épizootiques brèves (plusieurs centaines d'animaux morts chaque jour au bord des bassins), souvent associées à des pics de mues, des variations de température *etc.*, sont observées en élevage de pénéides en Nouvelle-Calédonie. Les taux de survie faibles, obtenus sur les derniers cycles, laissent supposer une mortalité chronique pouvant passer inaperçue.

Les individus malades ont une nage erratique en surface et près des bords. Ils montrent souvent un corps sombre, des appendices et branchies rouge-orangés, quelquefois des taches noires ("black spots") sur la carapace et un tube digestif généralement vide. L'examen direct des branchies révèle parfois une colonisation importante par des ciliés (*Zoothamnium*). L'hémolymphe de ces individus est massivement colonisée par des bactéries mobiles observables au microscope à contraste de phase et présente des temps de coagulation

augmentés. La population des bassins affectés montre une faible résistance au stress (mortalité importante lors des transferts ou des pêches partielles,...).

Plusieurs centaines de souches ont été isolées à partir d'individus malades ou pêchés au hasard dans les différents bassins du Territoire. Ces bactéries sont essentiellement des *Vibrionacées*.

Les cas de vibriose chez *P. japonicus* au Japon sont imputables à *Vibrio penaeicida*, isolée à partir de post-larves et de juvéniles. Cette maladie à caractère épidémique affecte les branchies, l'hémolymphe et les organes lymphoïdes en provoquant des lésions importantes. Les branchies présentent des tâches brunes et l'exosquelette des tâches blanches, d'où le nom de "White Pleura disease". *V. penaeicida* peut se trouver également dans l'intestin et dans la musculature et les lésions sont accompagnées de fortes mortalités (Tajahashi *et al.*, 1985 ; Ishimaru *et al.*, 1995)

En Nouvelle-Calédonie, de telles observations sont reliées depuis 1993-94 à un *Vibrio penaeicida* (Berthe, 1995 ; Froissard *et al.*, 1995)

D. CHOIX D'UNE THERAPEUTIQUE

1. Traitements curatifs : les thérapeutiques antibactériennes

La première mesure à prendre pour lutter contre les micro-organismes en élevage larvaire est de limiter leur prolifération avec l'ensemble de la faune bactérienne par des mesures préventives. En cas d'infection bactérienne les actions à conduire sont donc avant tout de s'assurer de bonnes conditions d'élevage et d'un protocole sanitaire strict en préalable à une quelconque action thérapeutique basée sur l'utilisation des antibiotiques. Cependant, force est de constater qu'en élevage industriel, les traitements curatifs ou préventifs sont désormais un mal nécessaire à la consolidation d'un système fragilisé pour des raisons de production.

Ainsi, les antibiotiques occupent aujourd'hui une place de choix dans l'arsenal thérapeutique vétérinaire (les immunostimulants et les antibiotiques destinés au traitement des animaux comme les crevettes sont des médicaments vétérinaires et donc soumis à prescription vétérinaire et à une autorisation administrative d'importation)

Ces succès ont entraîné des utilisations massives qui se comptent en milliers de tonnes et de nombreux abus ont entraînés des problèmes nouveaux, le monde bactérien ayant su s'adapter très rapidement. Quoique contrôlés, les quantités utilisées peuvent en effet atteindre des valeurs énormes (Taslihan *et al.*, 1994).

Pourtant, dès 1973, l'Organisation Mondiale de la Santé déclarait : "les résistances de plus en plus fréquentes chez les bactéries posent d'ores et déjà des difficultés dans la thérapeutique humaine et vétérinaire et pourraient, si la tendance actuelle se maintient, rendre les antibiotiques beaucoup moins efficaces qu'ils ne le sont aujourd'hui, privant l'humanité d'une arme extrêmement précieuse contre de nombreuses maladies. L'apparition de souches bactériennes antibiorésistantes est étroitement liée aux problèmes d'hygiène de l'environnement" (Avril, 1980).

Si l'on s'accorde à reconnaître l'efficacité des traitements antibiotiques en aquaculture, et essentiellement en élevage larvaire, il est donc désormais admis que l'utilisation de tels produits chimiques doit être raisonnée et se faire chez les stades de développement les plus réceptifs (l'âge des larves étant souvent déterminant dans la sensibilité à un pathogène donné). La réceptivité des larves comme la toxicité du produit devra être mieux prise en considération ; les manipulations, surpopulations, rejets ou produits organiques de dégradations..., augmentant la détérioration du milieu et affaiblissant notablement les animaux. Outre ces considérations primordiales, il est désormais urgent de mettre en oeuvre les nouvelles directives Européennes concernant l'usage des produits chimiques et notamment des antibiotiques.

2. Prévenir c'est déjà guérir ?!

Aujourd'hui, il est donc important d'obtenir une réponse rapide et claire quant au développement d'un ou plusieurs pathogènes donnés au sein de l'élevage. De ce fait, on peut alors mettre en place un traitement raisonné et plus approprié aux besoins des animaux.

Parallèlement aux approches curatives, des méthodes prophylactiques connaissent quelques succès avec la mise au point de vaccins lorsque cela est possible, pour les poissons par exemple. Mais, en dépit de ces nouvelles orientations de recherche qui semblent prometteuses, il persiste un manque de maîtrise en ce qui concerne les pathologies infectieuses dites de situation : terrains fragilisés, conditions environnementales floues, interactions bactériennes inconnues.

Face aux nombreuses inconnues provoquées par ces situations, les schémas thérapeutiques ou prophylactiques connus ne présentent pas toujours une solution adaptée et cela pour diverses raisons (Hébert *et al.*, 1986):

- sélection possible de bactéries résistantes,
- manque de standardisation,
- difficultés d'évaluation des contraintes thérapeutiques ou prophylactiques.

De nouvelles méthodes de diagnostics ont aujourd'hui vu le jour et s'imposent comme les alternatives nécessaires à l'usage délicat des antibiotiques

Les chercheurs ont essayé de développer de nombreuses stratégies de prophylaxie comme la **sélection de souches animales résistantes** (aux vues des nombreux sites infectés de façon chronique seules de tels souches pourraient solutionner le problème) ou encore l'utilisation d' **immunostimulants** (substances ou molécules permettant d'induire une réponse immunitaire préventive ou d'optimiser celle-ci face aux agressions du milieu d'élevage).

Devant les difficultés inhérentes à de tels projets (nombreux critères de sélection inconnus, manque de spécificité des immunostimulants...), les avancées technologiques de la biologie moléculaires ont apporté une solution certes coûteuse mais efficace.

En effet, l'utilisation des **anticorps poly ou monoclonaux** ou des séquences de DNA, et des techniques de Dot-Blot, Soft-Blot ou encore de PCR ce sont beaucoup

développées pour la détection fine et rapide de diverses maladies significatives et font désormais partie de l'arsenal diagnostics des chercheurs. Il reste cependant un pas à franchir pour que ces techniques diagnostiques **immunes** ou à base de chaînes de **DNA** soient utilisés en routine par les éleveurs directement sur le site de production. En effet, la complexité et surtout le coût de certaines de ces méthodes empêchent toute transmission vers l'aval de tels techniques de diagnostic.

Cependant, en poussant encore plus loin la prévention, les chercheurs essaient aujourd'hui de connaître et de modéliser les interactions hôte-pathogène pour maîtriser les mécanismes immunitaires des crevettes. Ainsi, depuis quelques années, une attention particulière a été portée sur la caractérisation des gènes responsables des réactions immunitaires.

Lors de notre travail, c'est dans cette optique de **diagnostic préventif** que nous avons cherché à nous placer. Cependant, en fonction de nos impératifs, nous avons décidé de privilégier une approche **simple** à mettre en place sur le terrain, **rapide, spécifique** et très peu coûteuse.

Pour toutes ces raisons, priorité a été donnée au développement d'un **milieu d'isolement gélosé** capable de révéler la présence de *Vibrio penaeicida* au sein d'un mélange bactérien plus ou moins complexe.

Par la suite, afin de renforcer la méthode, nous avons choisi de compléter notre milieu d'une **procédure d'identification biochimique** simple de type API.

Enfin, nous avons parallèlement testé un protocole de mise au point d'un **sérum** afin de confirmer nos travaux et de disposer d'un outil supplémentaire en cas de problèmes d'identification.

II. MATERIELS ET METHODES

A. SOUCHES BACTERIENNES DE REFERENCE

Les souches utilisées comme références pour nos tests sont données dans le tableau 1.

Les deux souches de *V. penaeida* (liste, tableau 1), AM₂₃, AM₁₀₁ AM₁₀₂ et KH₁ proviennent du GIE - RA de l'IFREMER (Nouvelle Calédonie). Les isolements ont été réalisé au Laboratoire Territorial de Diagnostic Vétérinaire (LTDV).

<i>Genre / Espèce</i>	N° de Référence.
<i>V. estuarianus</i> ^T	LMG 7909
<i>V. alginolyticus</i> ^T	ATCC 17749
<i>V. anguillarum</i>	LPAA 408
<i>V. anguillarum</i> ^T	LMG 4409
<i>V. anguillarum</i> ^T	CIP 6336
<i>V. campbelli</i> ^T	CIP 7067
<i>V. carchariae</i> ^T	LMG 7890
<i>V. damsela</i> ^T	CIP 102761
<i>V. fluvialis</i> ^T	CIP 103355
<i>V. harveyi</i> ^T	LMG 4044
<i>V. harveyi</i>	ATCC 14126
<i>V. hollisiae</i> ^T	CIP 101886
<i>V. logei</i> ^T	ATCC 15382
<i>V. marinus</i> ^T	CIP 102861
<i>V. navarrensis</i> ^T	CIP 103381
<i>V. nereis</i> ^T	LMG 3895
<i>V. nigripulchritudo</i> ^T	CIP 103195
<i>V. orientalis</i> ^T	LMG 7897
<i>V. proteolyticus</i> ^T	CIP 102892
<i>V. penaeida</i>	LTDV AM ₂₃
<i>V. penaeida</i>	LTDV AM ₁₀₁
<i>V. penaeida</i>	LTDV AM ₁₀₂
<i>V. penaeida</i> ^T	LTDV KH ₁
<i>V. salmonicida</i> ^T	NCMB 2262
<i>V. splendidus</i> ^T	ATCC 33125
<i>V. tubiashi</i> ^T	CIP 102761

Tableau 1 : Souches de références et origines.

B. MILIEUX DE CULTURE ET DE CONSERVATION DES SOUCHES

Les souches sont prélevées à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée à la flamme à partir de tubes de conservation.

La culture est effectuée en eau peptonée, additionnés de NaCl à 1,5 %.

L'étalement se fait sur un milieu d'isolement nutritif (type ZoBell 2216E) ou sélectif pour les Vibrionacées (TCBS : thiosulfate - citrate - sel biliaire - sucrose - agar) en utilisant la méthode des cadrans.

L'entretien des souches se fait sur un milieu de croissance solide (TCS : tryptocaseïne-soja) ou liquide (ZoBell, eau peptonée, *etc.*) additionnés de NaCl à 1,5 % (confère annexes pour milieu de sélection ou de croissance).

L'incubation des bactéries se fait entre 22 et 28°C suivant l'optimum de la souche considérée.

C. DETECTION DE *VIBRIO PENAECIDA* ET UTILISATION DU MILIEU ZMSB

La mise au point d'une procédure de détection de *V. penaeicida* nécessite deux conditions :

Tout d'abord, il s'agit de parvenir à isoler ce dernier parmi la multitude d'espèces voisines que présente la microflore bactérienne associée aux élevages de crevettes pénéides.

Ensuite, il faut que cette distinction puisse être réalisée dans des délais assez courts, de l'ordre de 24 à 48 heures.

Il existe en fait peu de caractéristiques biochimiques permettant de différencier *V. penaeicida* des *Vibrio* classiques avec lesquels il peut être confondu (annexe 1). Parmi ces caractères, nous avons sélectionné ses capacités à acidifier le mannitol et le saccharose puisque ces caractéristiques semblent les plus "sélectives" : seulement 5 autres espèces présentent le même profil.

<i>Genre / Espèce</i>	Acidification des sucres	
	Mannitol	Saccharose
<i>V. estuarianus</i> ^T	+	+
<i>V. alginolyticus</i> ^T	+	+
<i>V. anguillarum</i> ^T	+	+
<i>V. campbellii</i> ^T	v	-
<i>V. carchariae</i> ^T	+	+
<i>V. damsela</i> ^T	-	-
<i>V. fluvialis</i> ^T	+	
<i>V. harveyi</i> ^T	+	v
<i>V. hollisae</i> ^T	-	-
<i>V. logei</i> ^T	v	v
<i>V. marinus</i> ^T	-	-
<i>V. navarrensis</i> ^T	v	+
<i>V. nereis</i> ^T	v	+
<i>V. nigripulchritudo</i> ^T	-	-
<i>V. orientalis</i> ^T	+	+
<i>V. proteolyticus</i> ^T	+	-
<i>V. penaeccida</i> AM ₂₃	-	-
<i>V. penaeccida</i> AM ₁₀₁	-	-
<i>V. penaeccida</i> AM ₁₀₂	-	-
<i>V. penaeccida</i> KH ₁	-	-
<i>V. salmonicida</i> ^T	+	-
<i>V. splendidus</i> ^T	+	v
<i>V. tubiashi</i> ^T	+	+

Tableau 2 : Rappels bibliographiques de deux caractères physiologiques de quelques Vibrio spp.

+ : acidification du sucre considéré

- : pas d'acidification

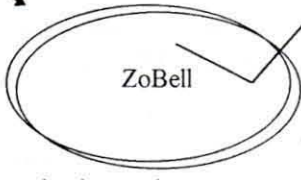
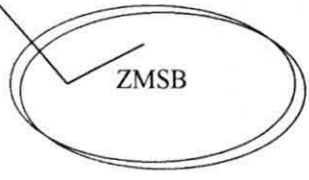
Nous avons donc cherché à mettre au point un milieu sélectif susceptible de mettre en évidence cette caractéristique des *Vibrio* pour l'identification présomptive de *Vibrio penaeccida*.

Pipette Pasteur

Prélèvement (eau d'élevage)

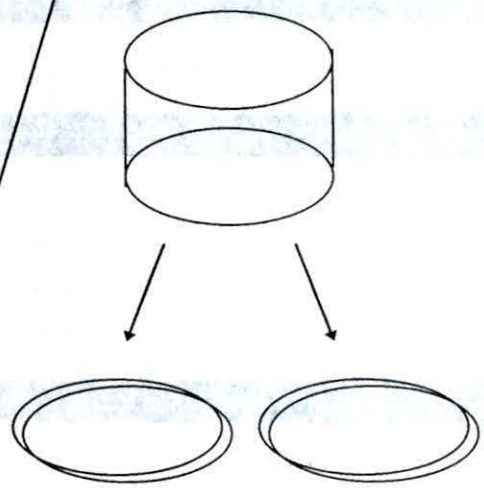
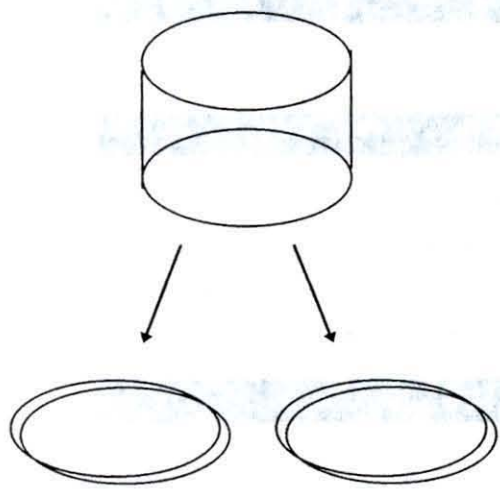
100 µl

100 µl



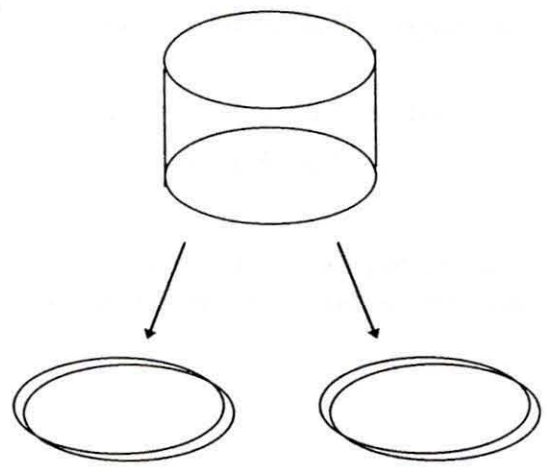
Confirmation biochimique des colonies vertes présumés être des *Vibrio penaeicida*

"Replica Plating Tools"



ZoBell - Glycérol pH 8,0

ZMSB pH 8,0



ZoBell saccharose et bleu de bromothymol pH 8,0

ZoBell mannitol et bleu de bromothymol pH 8,0

Composition du milieu sélectif :

ZoBell 2216E modifié en ZMSB (ZoBell Mannitol Saccharose Bleu de bromothymol) :

Pastone :	4 g
Extrait de levure :	1 g
Agar :	15 g
Mannitol :	1 %
Saccharose :	1 %
Bleu de bromothymol :	0,08 %
Eau de Mer Artificielle (EDMA) :	1 litre

Tous les ingrédients, à l'exception des sucres, sont dissous par agitation à 100 °C. Le milieu est ensuite refroidi à la température de surfusion pour ajuster le pH vers 8,0 ($\pm 0,2$) avec une solution de NaOH à 5 M. Après passage à l'autoclave, on ajoute stérilement les sucres et on homogénéise le mélange à 50 °C avant de le couler en boîtes de Pétri. La conservation du milieu se fait à 4° C. Le milieu brut est de couleur bleu plus ou moins clair selon le pH final (fixé à 8,0 en raison du *preferendum* des Vibrionacées).

Sur ce milieu, les colonies qui n'acidifient ni le mannitol ni le saccharose présentent une coloration verte alors que le processus d'acidification, entraînant un changement de pH provoque l'apparition d'une coloration de teinte jaune qui diffuse dans la gélose autour des colonies acidifiantes.

Dans la problématique qui nous concerne, le milieu sélectif ZMSB est cependant avant tout utilisé comme un outil de présélection puisque sa spécificité est largement limitée. La différence de coloration facilite la distinction de colonies présumées qui doivent être soumises par la suite à une série de tests biochimiques plus poussés censés garantir la procédure d'identification.

1. Tests de spécificité du milieu ZMSB

La première étape de notre travail consiste donc à tester la spécificité du milieu ZMSB sur un ensemble de souches *Vibrio* marines assez large (souches de références, tableau 1).

On peut réaliser l'empreinte d'une culture sur gélose primaire (milieu ZoBell) à l'aide d'un tampon stérile ("Scienceware® Replica Plating Tool # 37848) ayant la forme et le diamètre d'une boîte de Pétri.

A partir d'une culture primaire sur gélose on peut alors repiquer toutes les colonies qui se développent sur ZoBell tout en conservant leur disposition sur de nouveaux milieux.

Les milieux de répliques choisis sont :

- # ZMSB (pH 8,0);
- # ZoBell mannitol et bleu de bromothymol (pH 7,5 à 8,5);
- # ZoBell saccharose et bleu de bromothymol (pH 7,5 à 8,5);
- # TCBS (pH 8,6);
- # ZoBell additionné de 2 % de glycérol (pH 8,0).

Les colonies vertes, non acidifiantes, qui se développent sur ZMSB sont considérées a priori comme des isolats positifs de *V. penaeicida*.

Les milieux ZoBell additionnés uniquement d'un des deux sucres et de bleu de bromothymol, servent de témoins de vérification. On veut en effet éviter des réactions faussement négatives ou inversement.

Enfin, un milieu minimum comme le ZoBell additionné de glycérol permet d'augmenter considérablement la production de pigments noirs (grisâtre) insolubles qui s'accumulent sous forme cristalline dans les colonies bactériennes comme *V. nigripulchritudo* facilitant ainsi leur reconnaissance puisque *V. penaeicida* ne possède pas cette caractéristique (Buchanan *et al.*, 1974)

Après 24 heures d'incubation sur ZoBell (flore totale) à 19, 22, 28 ou 35° C (suivant le *preferendum* de la souche), on prélève une UFC (Unité Formant Colonie) pour l'étaler sur milieu ZMSB à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. On réalise alors des observations après 24, 48 et 72 heures d'incubation.

Parallèlement, on réalise l'empreinte des colonies développées sur un milieu ZoBell puis on effectue des répliques sur les milieux cités précédemment.

Après 24 heures ou moins, les boîtes répliquées et la culture primaire sont disposées sur une table lumineuse, et, par un jeu de superposition successives des boîtes deux à deux, les colonies suspectes sont relevées et sélectionnées pour une caractérisation ultérieure.

2. Recherche de *V. penaeicida* en eau de mer.

Afin de valider notre méthode, on cherche à savoir s'il est possible de retrouver *V. penaeicida* dans un mélange contenant de nombreux types (ou quelques types connus) de *Vibrio*.

a) Estimer la croissance de l'AM101 en bouillon :

- Mettre une UFC en bouillon de 5 ml à partir d'une culture sur ZoBell ou Marine Broth de 24 heures.
- Prélever 1 ml de bouillon à 3, 5 et 24 heures de croissance pour réaliser une gamme de dilution de pur à 10^{-6} .
- Prélever 100 µl de chaque dilution pour un étalement sur ZoBell ou Marine Broth.
- Faire un comptage sur boîte de Pétri après 24 heures à 28 °C.

b) Réaliser un mélange connu entre flore totale de l'eau de mer et AM101...

- Prélever 100µl à partir d'un bouillon en eau peptoné de 3 heures. Etaler pour comptage sur ZoBell.
- Prélever 10 ml d'eau de mer et réaliser un comptage de la flore totale (ZoBell) et vibronacée (TCBS).
- Mélanger les 100 µl dans les 10 ml d'eau de mer.

c) ... ou ... **Réaliser un mélange connu entre AM101 et une ou plusieurs souches de référence.**

- Prélever environ 100 µl de chaque souche à partir d'un bouillon de culture. Etaler pour comptage sur ZoBell.
- Mélanger le tout dans 10 ml d'eau de mer stérile.

d) **Dilution du mélange et sélection des milieux :**

- Faire une gamme de dilution du pur à 10^{-6} .
- Réaliser les comptages sur les milieux
_ ZMSB
_ ZoBell
_ TCBS

3. **Caractérisation biochimique, confirmation de la présence de *V. penaeicida***

Par la suite, il nous est apparu intéressant d'utiliser un petit nombre (12) de caractéristiques clés, permettant de discriminer les colonies suspectés d'être des *V. penaeicida* parmi les souches révélées sur ZMSB.

Afin d'affiner la détermination, on réalise donc un repiquage des colonies de *V. penaeicida* présumées et des témoins (souches de références) sur ZoBell pour un croissance de 24 heures à 28°C.

Ces souches (apparaissant comme mannitol et saccharose négatives) sont alors utilisées pour ensemercer un portoir de tests biochimiques basés sur le principe des galerie API.

Ce portoir se présente sous la forme d'une boîte plastifiée contenant 8 rangées de 12 puits d'environ 1,5 ml, tous les éléments étant autoclavables.

On réalise donc une suspension épaisse de la souche considérée dans un 1 à 2 ml d'EDMS additionné de tampon Tris.

On ensemence alors chaque puit du portoir avec 50 µl de la suspension obtenue.

a) **Le portoir**

On réalise les tests classiques suivants :

Croissance sur NaCl :

Gamme de salinité variable de 0 à 10 %.

Lecture (24h) : trouble +, pas de changement -

Voges - Proskauer (V.P.) :

Lecture (24h) : ajouter une goutte des réactifs VP1 et VP2 (Kits réactifs pour galerie classique - Sanofi Diagnostic Pasteur, ref. 53911) après 10 à 15 mn : rouge +, incolore -

Indole :

La production d'Indole est observé après 24 heures d'incubation de la souche bactérienne dans un milieu Urée-Indole (Kits réactifs pour galerie classique - Sanofi Diagnostic Pasteur, ref. 53911), par addition de quelques gouttes de réactifs de Kovacks (anneau rouge : positif ; anneau jaune inchangé : négatif).

Nitrite - Nitrate

La réduction des nitrates en nitrites s'observe à partir d'une culture en bouillon additionné de 1% de KNO₃ (milieu jaune de nitrate de potassium , d'eau distillé et d'une infusion cerveau-coeur). Après 18 à 24 heures, l'addition de 3 à 4 gouttes d'une solution d'acide sulfanilique (Nitrite I, Kit réactifs pour galerie classique - Sanofi Diagnostic Pasteur, ref. 53911) puis d'une solution d'alpha-naphtylamine (Nitrite II) provoque un virage au rouge de la solution si la réaction est positive (souche NR⁺ : réduction de NO₃ en NO₂). Si la réaction précédente est négative, on ajoute une pincée de poudre de zinc. Après agitation, une coloration rouge apparaît en 5 minutes environ si le zinc a réduit le NO₃ en NO₂. On conclue alors que la bactérie est NR⁻.

Si la solution reste incolore cela indique que le stade nitrites est dépassé, la bactérie est alors NR⁺⁺⁺.

A.D.H., L.D.C., O.D.C. :

Lors de la recherche des décarboxylases et dihydrolases bactériennes, on utilise les milieux LDC, ODC et ADH près à l'emploi. Les bactéries vibrionacées (Gram négatifs aéro-anaérobies facultatifs à métabolisme fermentatif), fermentent le glucose et dans un premier temps, les milieux s'acidifient (virage du violet au jaune de l'indicateur coloré). A pH acide, les décarboxylases et dihydrolases présentent une activité maximale. Dans un second temps, lorsque les bactéries étudiées présentent les enzymes en question, les métabolites aminés formés à partir des aminoacides alcalinisent les milieux et font virer l'indicateur de pH au violet (formation de putrescine à partir de l'ornithine, de cadavérine à partir de la Lysine et d'agmatine à partir de l'arginine).

A partir d'une culture de la souche à étudier, on prépare une suspension épaisse en eau de mer stérile additionnée de tampon Tris. On ensemence chacun des tubes puis on les bouche par addition d'huile de paraffine pour obtenir une anaérobiose convenable.

A la lecture (1 à 4 jours), un virage au jaune (acide) indique un résultat négatif, un virage au violet (alcalin) un résultat positif. Le tube témoin doit impérativement être jaune (témoin de croissance)

Gélatinase :

Pour la recherche de la gélatinase, on utilise un film photographique qui trempe dans le bouillon bactérien. Si la gélatine recouvrant le film est attaquée (présence de la gélatinase), les grains d'argents sont alors libérés et on observe un dépôt dans le fond du tube.

4. Elaboration d'un sérum anti-*V. penaecida* AM101

a) Préparation des antigènes bactériens.

La souche est cultivée dans un bouillon TSB, additionné de glucose à 2% et de NaCl à 1,5 %. La concentration bactérienne est estimée par comptage à environ 4.10^8 bactéries / ml après 24 heures de croissance à 28 °C.

Après centrifugation (3000 g, 10 minutes), le culot est repris dans de l'eau distillée puis congelé et décongelé plusieurs fois afin de rompre les membranes bactériennes.

La première solution antigénique est obtenues par 5 séries de congélations / décongélations, alors que la seconde est récupérée après seulement 2 séries de congélations / décongélations.

Avant l'inoculation aux souris, la suspension est rendue isotonique (300 mOsM) par dilution au 1:2 dans une solution de NaCl à 1,8 %.

Une troisième solution antigénique est préparée en vue d'obtenir une ascite : l'inactivation bactérienne est obtenue par passage au bain marie de 1 heure à 65 °C. La remise en suspension se fait dans 1 ml afin de concentrer la suspension. Puis, on réalise une suspension bactérienne de 100 µl dans 700 µl d'adjuvant de Freund.

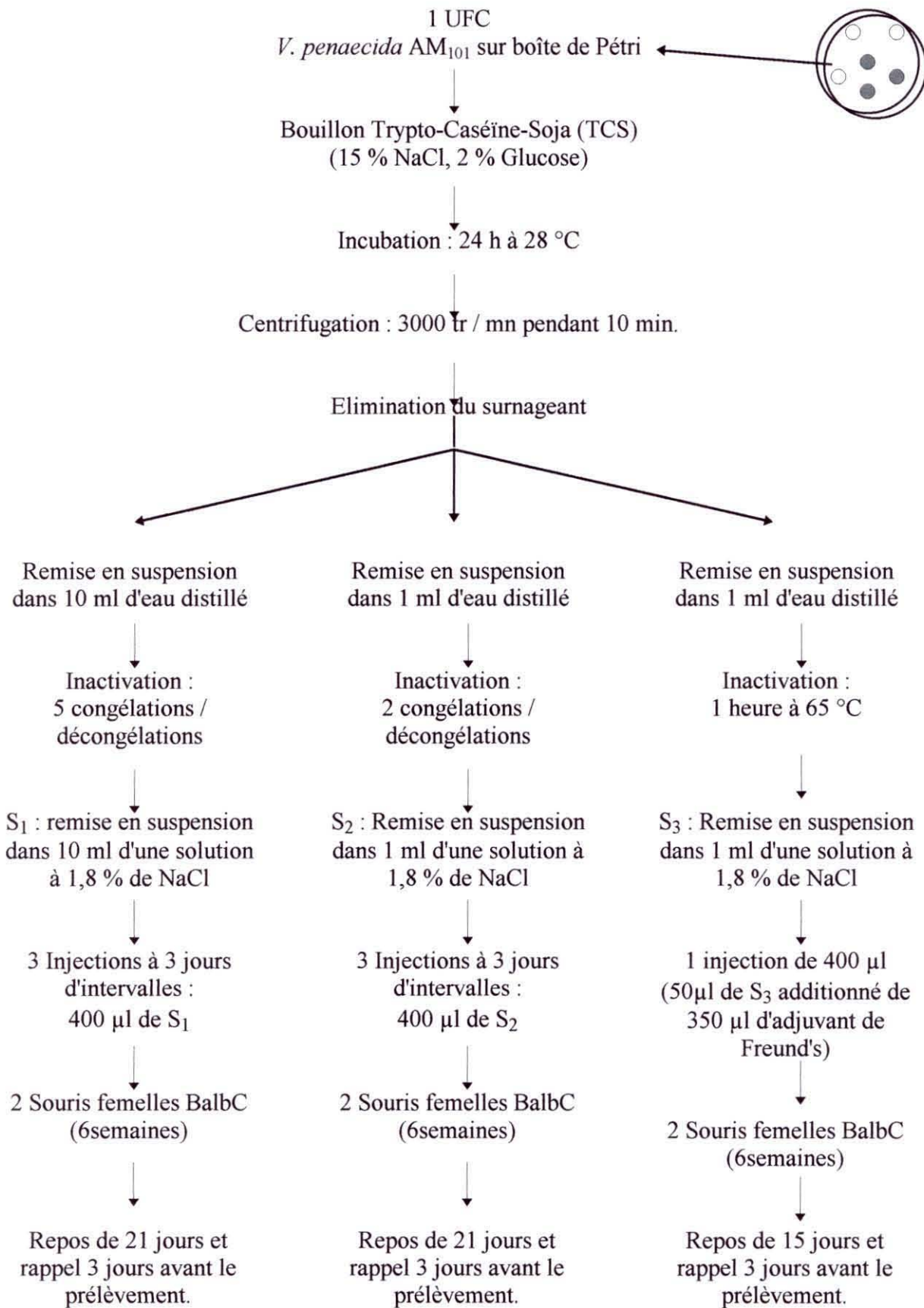
b) Immunisation des souris

Trois paires de souris femelles Balb/c ont été immunisées avec les trois suspensions bactériennes de *V. penaecida* AM101. L'immunisation consiste en trois injections de 400 µl à 500 µl par voie intrapéritonéale à trois jours d'intervalles, puis en un repos de 3 semaines et finalement, en un rappel trois jours avant le prélèvement.

c) Test de spécificité des sérums ou des ascites

La spécificité des différents sérums et ascites a été testé sur deux souches bactériennes : *V. penaecida* et *V. nigripulchritudo*. On réalise un mélange entre le sérum (ou l'ascite) et une suspension épaisse de la bactérie à tester. On observe alors l'agglutination éventuelle sur une lame de verre.

ELABORATION DU SERUM



III. RESULTATS

A. CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES SOUCHES DE REFERENCE

Les tests effectués sur les souches de référence sont présentés dans les tableaux suivants.

Genre / Espèce	T °C (*)	Mobilité	TCBS	Gram	Oxydase	ONPG	D-Glc	Lact	H ₂ S	Viande-foie
<i>V. aestuarianus</i>	20°	+	+	-	+	+	+		-	A.A.F.
<i>V. alginolyticus</i> ^T	20°	+	+	-	+	-	+	-	-	A.A.F.
<i>V. anguillarum</i> ^T	20°	+	+	-	+	+	+	-	-	A.A.F.
<i>V. campbelli</i> ^T	28°	+	-	-	+	-	+	-	-	A.A.F.
<i>V. carchariae</i> ^T	20	+	+	-	+	-	+	-	-	A.A.F.
<i>V. damsela</i> ^T	28°	+	-	-	+	-	+	+	-	A.A.F.
<i>V. fluvialis</i> ^T	20°	+	+	-	+	+	+	-	-	A.A.F.
<i>V. gazogenes</i>	20°	+		-	-	+	+	-	-	A.A.F.
<i>V. harveyi</i> ^T	20°	+	+	-	+	+	+	-	-	A.A.F.
<i>V. hollisae</i>	28°	+	+	-	+	-	+	-	-	A.A.F.
<i>V. marinus</i> ^T	15°	+		-	+		+	-	-	A.A.F.
<i>V. mytili</i> ^T	20°	+	+	-	+	+	+	+	-	A.A.F.
<i>V. navarensis</i> ^T	20°	+	+	-	+	+	+	+	-	A.A.F.
<i>V. nereis</i> ^T	20°	+		-	+	-	+	-	-	A.A.F.
<i>V. nigripulchritudo</i> ^T	28°	+	-	-	+	+	+	-	-	A.A.F.
<i>V. orientalis</i> ^T	20°	+		-	+		+	-	-	A.A.F.
<i>V. penaecida</i> KH ₁	28°	+	-	-	+	+	+	-	-	A.A.F.
<i>V. penaecida</i> AM ₁₀₁	28°	+	-	-	+	+	+	-	-	A.A.F.
<i>V. proteolyticus</i> ^T	20°	+		-	+	-	+	-	-	A.A.F.
<i>V. salmonicida</i> ^T	4°	+		-	+	-	+	-	-	A.A.F.
<i>V. splendidus</i> ^T	28°	+	-	-	+	+	+	-	-	A.A.F.
<i>V. tubiashi</i> ^T	28°	+		-	+	+	+	-	-	A.A.F.

TCBS + : acidification du saccharose (colonies jaunes)

- : pas d'acidification (colonies vertes)

∅ : un vide signifie que la croissance est difficile sur ce milieu

Souche polluée ayant nécessité une purification

AAF : Aérobie-Anaérobie facultatives

Tableau 3 : Tests effectués en bactériologie classique, visant à garantir la pureté des souches de conservation.

Genre / Espèce	T (°C)	Salinité (%)	VP	Indole	Nitrate	Témoin	ADH	LDC	ODC	Gélatinase
<i>V. aestuarianus</i>	28	6	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>V. anguillarum</i> ^T	28	6	+	+	+	-	+	-	-	+
<i>V. hollisae</i> ^T	28	<6	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>V. marinus</i> ^T	28	<6	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>V. nigripulchritudo</i> ^T	28	<6	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>V. nigripulchritudo</i> <i>AM₁₀₂</i>	28	6	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>V. penaecida</i> <i>AM₂₃</i>	28	<6	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>V. penaecida</i> <i>AM₁₀₁</i>	28	<6	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>V. penaecida</i> <i>AM₁₀₁</i>	28	<6	-	+	+	-	-	-	-	+
<i>V. penaecida</i> <i>KH₁</i>	28	<6	-	-	+	-	-	-	-	+
<i>V. splendidus</i> ^T	28	6	-	+	+	-	+	-	-	+
<i>V. tubiashii</i> ^T	28	6	-	+	+	-	+	-	-	+

Tableau 4 : Confirmation de la pureté des isolats par tests biochimiques.

Certaines souches présentent la particularité de dissocier sur ZoBell. On entend par là une modification de l'aspect de la colonie sur le milieu de sélection ; celle-ci passe alors d'une couleur crème classique à une coloration plus brune et très "brillante". Ce phénomène, cumulé à des problèmes de pollutions a rendu difficile l'isolement de la souche de *V. penaecida* qui nous intéresse dans cette étude.

B. DETECTION DE *VIBRIO PENAECIDA* ET UTILISATION DU MILIEU ZMSB

1. Tests de spécificité du milieu ZMSB

La culture de différentes espèces ou souches bactériennes de référence sur ZMSB nous a dans un premier temps permis de confirmer l'utilité d'un tel milieu.

Genres / espèces pH	ZoBell Mannitol			ZoBell Saccharose			ZMSB		
	7.5	8	8.5	7.5	8	8.5	7.5	8	8.5
<i>V. aestuarianus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>V. alginolyticus</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>V. anguillarum</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>V. campbelli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. carchariae</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>V. damsela</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. fluvialis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>V. gazogenes</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>V. harveyi</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>V. hollisae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. marinus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. mytili</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>V. navarensis</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>V. nereis</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>V. nigripulchritudo</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. orientalis</i>	+	+	+	+	+	+			
<i>V. penaeicida</i> AM101	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. penaeicida</i> KHI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. proteolyticus</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>V. salmonicida</i> T	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>V. splendidus</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+
<i>V. tubiashii</i>	+	+	+	+	+	+			

Tableau 5 : Spécificité du milieu ZMSB

+ : acidification du milieu (jaune).
- : pas d'acidification du milieu (vert).

Colonies vertes (pas d'acidification)

Acidification d'un seul sucre

Des variations de pH de 7,5 à 8,5 du milieu ZMSB n'influencent pas de façon sensible la croissance des espèces bactériennes considérées ni leur coloration.

La plupart des souches non acidifiantes qui poussent sur ZMSB produisent des colonies rondes, plates et d'un vert plus ou moins foncé. Elles devraient être, à priori, considérées comme des isolats positifs de *V. penaeicida*. Comme on s'y attendait, plusieurs espèces présentent cette caractéristique :

- # *V. campbellii*
- # *V. damsela*
- # *V. hollisae*
- # *V. nigripulchritudo*

N.B. : on notera que *V. marinus* n'a pas été incorporé dans les travaux présentés par la suite en raison de difficultés lors de son isolation et de sa mise en culture puisque cette souche ne se développe pas au delà de 15 à 18 °C.

Par la suite, on a donc cherché à mettre en évidence des différences de coloration chez ces souches concernées par des étalements successifs sur des milieux ZMSB de pH différents.

En fonction des espèces bactériennes, on a en effet pu observer des différences très claires de coloration, probablement dues à des variations de pH induites par le métabolisme des bactéries.

Genres / espèces	ZMSB			ZoBell + Glycérol
	pH 7.5	8	8.5	8,0
<i>V. campbellii</i>	c	c	c	c
<i>V. damsela</i>	c	c	c	c
<i>V. hollisae</i>	v	v	v	v
<i>V. nigripulchritudo</i> [†]	v / f	v / f	v / f	g
<i>V. penaeicida</i> AM ₁₀₁	v	v	v	v

c : colonies verts clairs ;
v : colonies vertes ;
v / f : colonies vertes à vertes très foncé ;
g : colonies grises à noirâtre.

Tableau 6 : Coloration des colonies sur ZMSB

Ainsi, les souches de *V. campbellii* et de *V. damsela* présentent une coloration très pâle sur ZMSB si la culture est âgée de 24 à 48 heures ; coloration qui change complètement par la suite puisque, comme la plupart des autres espèces cultivées sur ZMSB au delà de 48 heures, celles-ci entraînent quand même une acidification du milieu qui peu à peu entraîne un virage au jaune.

La souche de *V. hollisae* disponible au laboratoire présente exactement le même aspect sur ZMSB que les souches de *V. penaeicida* utilisées dans nos expériences. Cependant, parmi les souches non acidifiantes considérées, seule *V. hollisae* est capable de résister à des températures de l'ordre de 35 °C ce qui permet une isolation facile des germes de cette espèce (annexe 1).

Enfin, pour *V. nigripulchritudo*, le problème paraît plus délicat puisque la coloration gris-noire des colonies semblent difficilement répétable au fur et à mesure des repiquages que ce soit sur le milieu ZMSB ou sur ZoBell.

Cependant, en utilisant un ZoBell complétement en glycérol à 2 %, on déclenche l'apparition des pigments noirs caractéristiques de cette espèce bactérienne.

Pour les cas où ces critères ne sauraient être suffisant à la détection de *V. penaeicida*, nous avons procédé à des tests de caractérisation à partir de mélanges, tout en poussant plus loin la reconnaissance biochimique des souches afin d'obtenir l'outil le plus informatif possible.

2. Recherche de *V. penaeicida* en eau de mer.

Lors de l'expérimentation à partir de mélanges, la différenciation de *V. penaeicida* des autres souches *Vibrio* est bien plus claire et plus facile qu'à partir d'un milieu comme le TCBS où les *penaeicida* poussent très mal (annexe 4).

D'une part, la coloration jaune induite par les bactéries acidifiant le mannitol et / ou le saccharose rend facile leur distinction des souches intéressantes. D'autre part, le milieu est facile à répliquer selon la méthode indiquée. Enfin, en utilisant une gamme de dilution assez importante, on peut facilement isoler les espèces bactériennes sur un tel milieu afin d'en établir une culture pour des tests plus poussés.

En revanche, le milieu ZMSB ne semble pas très sélectif même si tous les comptages effectués sur ZMSB sont inférieurs à ceux effectués sur ZoBell. En effet, on retrouve après comptages à peu près 80 % des *V. penaeicida* et environ 60% des autres espèces bactériennes utilisées la marge de 20 % d'écart ne comblant pas la marge d'erreur liés à la méthode.

3. Caractérisation biochimique, confirmation de la présence de *V. penaeicida*

Lorsqu'un doute subsiste sur la nature de la souche isolée, où lors d'une étude de type environnementale où l'on a affaire à de nombreux types bactériens susceptibles d'être confondus avec *V. penaeicida*, on peut utiliser certains tests biochimiques simples basés sur le système API.

Lors de nos essais en mélanges, ces tests ont à chaque fois confirmé la nature des souches isolées et ce dans un délai de 24 heures maximum.

Facile à mettre en place le portoir diagnostic est très simple à utiliser puisqu'il s'agit uniquement de verser quelques µl de la suspension bactérienne choisi dans les puits du portoir. Pour plus de rapidité et de fiabilité, l'utilisation d'une pipette multi-canaux semble cependant indiquée.

4. Tests des sérums anti-*V. penaeicida* AM101

Des trois protocoles testés, seul le premier (solution S₁) nous a permis d'obtenir un sérum agglutinant spécifique de *V. penaeicida*. Nous avons donc confié nos résultats aux services du GIE - RA pour qu'ils puissent pousser les tests plus loin sur le terrain.

IV. EN RESUME

L'utilisation du mannitol et du saccharose d'une part et celle du glycérol d'autre part dans un milieu sélectif comme le ZMSB permet une différenciation claire des espèces Vibrionacées qui acidifient ces sucres et présentent une pigmentation noire en présence de glycérol.

La plupart des *Vibrio* qui ne présentent pas ces caractéristiques sont de type *penaecida* hormis *V. campbellii*, *V. damsela* et *V. hollisae*, facilement différenciables selon de nombreux autres critères.

Il semble cependant important de porter notre attention sur le fait que, dans le cadre d'une étude environnementale par exemple, d'autres espèces bactériennes peuvent créer des problèmes d'identification avec le milieu ZMSB. Comme le proposent (Reali *et al.*, 1997), on peut alors se servir d'un filtre mis en culture sur un milieu comme le ZMSB et réaliser par la suite une série de tests de confirmation des bactéries présumées gênantes. Cette méthode a l'avantage de faire gagner encore un peu de temps à l'utilisateur.

Quoiqu'il en soit, nos travaux confirment l'hypothèse de départ, à savoir, que ce type de milieu semi-sélectif peut être considéré comme un bon outil de présélection. La présence de *V. penaecida* devra par la suite être confirmée soit par quelques tests biochimiques simples, comme ceux que nous proposons ici, ou par des tests de biologie moléculaire.

BIBLIOGRAPHIE

- Alsina, M. and A. R. Blanch. 1994. Improvement and update of a set keys for biochemical identification of *Vibrio* species. **J. App. Bact.** 77:719-721.
- Alsina, M., J. Martínez-Picado, J. Jofre, and A. R. Blanch. 1994. A medium for presumptive identification of *Vibrio anguillarum*. **App. Environ. Microbiol.** 60:1681-1683.
- Audiot, P., 1996. Contribution à la préparation de sondes anticorps monoclonaux pour le diagnostic du syndrome « bolitas » chez la crevette pénéide *Penaeus vannamei* infectée par *Vibrio harveyi*. **Thèse EPHE**, 98 pp.
- Avril, J-L., 1980. Les antibiotiques. **Que sais-je ?** Presses Universitaires de France, **1803** : 125 pp.
- Berthe, F. 1995. Etat et perspectives du programme d'assistance à la filière crevettes de Nouvelle Calédonie par la recherche en pathologie. **Ifremer GIE RA** Nouméa. Rapport d'activités du 01/09/94.
- Berthe, F., 1995. Rapport sur la pathologie des pénéides en Nouvelle-Calédonie. Rapport d'activité, **Ifremer GIE RA** Nouméa, 122 pp.
- Buchanan, R.E. and Gibbons, N.E. 1974. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 8^e edition. Williams and Wilkins Company, Baltimore. idem 1996
- Carnahan, A. M., J. Harding, D. Watsky, and S. Hansman. 1994. Identification of *Vibrio hollisae* associated with severe gastroenteritis after consumption of raw oysters. **J. Clin. Microbiol.** 32:1805-1806.
- Diagnostics Pateur. 1987. Milieux et réactifs de laboratoire Pasteur. 3^e édition. **Diagnostics Pasteur**, Marnes La Coquette.
- Difco Manual.
- Hada, H. S., P. A. West, J. V. Lee, J. Stemmler, and R. R. Colwell. 1984. *Vibrio tubiashii* sp. nov., a pathogen of bivalve mollusks. **Int. J. Syst. Bact.** 34:1-4.
- Hernandez-Cruz, C.M., Salhi, M., Hernandez-Palacios, H., Izquierdo, M.S., 1994. Improvements in the culture of *Sparus aurat* L. larvae in relation to the use of antibiotics, phytoplankton and rearing system. **Aquaculture** **124** : 269-274.
- Ishimaru, K., Akagawa - Matsushita, M. and Muroga, K. 1995. *Vibrio penaecida* sp. nov., a pathogen of Kuruma prawns (*Penaeus japonicus*). **International Journal of Systematic Bacteriology**. 45 : 1345 - 138.
- Itami, Toshiaki, Takahashi, Yukinori, Yneoka, Kenji and Yan, Yu, 1991. Survival of larval giant tiger prawns *Penaeus monodon* after addition of killed *Vibrio* cells to a microencapsulated diet. **Journal of Aquatic Animal Health**, **3** : 151-152.
- Koblavi, S., 1996. Identification et typage moléculaires des *Vibrionacées*. **Thèse de doctorat de l'Université Paris VII**, **385 pp.**

- Lorian, Victor, M.D., 1975. Some effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on bacteria. **Bull. N. Y. Acad. Med.**, vol. **51**, No. 9.
- Mialhe, D., Boulo, V., Bachère, E., Hervio, D., Cousin, K., Noel, D., Ohresser, M., le Deuff, R. M., Despres, B., and Gendreau, S., 1992. Developpement of new methodologies for diagnosis of infectious diseases in mollusc and shrimp aquaculture. **Aquaculture**, **107** : 155-164.
- Reali, D., Pretti, C. and Cognetti - Varriale, A.M. 1997. *Pasteurella piscida* (Janssen and Surgalla, 1964) : a simple method of isolation and identification from rearing - water. **Bull. Eur. Ass. Fish Pathol.**, 17 (2), 51 - 54.
- Sung, H. H., Kou, G. H., and Song, Y. L., 1994. Vibriosis Resistance Induced by Glucan Treatment in Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*). **Fish Pathology**, **29 (1)**, 11-17.
- Taslihan, A. and Kokarkin, C., 1994. Status of antibiotics in shrimp hatchery in Indonesia. **Workshop on Coastal Environmental Management for sustainable Aquaculture**, 6pp.
- Urdaci - Bertran, M. C., 1987. Le genre *Vibrio* : Approche éco - épidémiologique et taxonomie des espèces isolées du Sud - Ouest européen. **Thèse de doctorat n°119, Université de Bordeaux I**, 181pp.
- Weppe, M., Renault, T., Haffner, P, Malfondet, C., 1991. Synthèse des travaux effectués en bactériologie des élevages de crevettes pénéides. **DRV/AQ/TAH**, 91.60, 48 pp.

ANNEXES

ANNEXE 1

*SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE DES
CARACTERES PHENOTYPIQUES ET
PHYSIOLOGIQUES DES VIBRIO SPP.*

ANNEXE 2

MILIEUX DE CULTURE ET DE CONSERVATION DES SOUCHES

Les souches sont prélevées à partir de tube de gélose utilisés pour la conservation (à l'aide d'une pipette pasteur stérilisée sous la flamme). L'étalement se fait sur milieu ZoBell en utilisant la méthode des cadrans.

Les milieux de conservation ou de sélection utilisés sont les suivants :

Zobell

Pastone pasteur.....4 g
Extrait de levure pasteur.....1 g
Agar.....15 g
Eau de mer artificielle (EDMA).....1 litre

ZMSB

Pastone pasteur.....4 g
Extrait de levure pasteur.....1 g
Agar :15 g
Saccharose.....
Mannitol.....
EDMA.....1 litre

TCBS

Thio-Citrate-Bile-Saccharose.....88 g
Eau Distillé (ED).....1 litre

TCS adapté à la culture des souches marines

Tripto-caséine-Soja : 40 g
NaCl.....15 g
ED.....1 litre

MEVAG adapté à la culture des souches marines :

Extrait de viande.....	15 g
KCl.....	3 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	3 g
Rouge de phénol (Sigma).....	0,01 g
ED.....	1 litre

ANNEXE 3

***MILIEUX POUR PORTOIR
DIAGNOSTIQUE***

Voges - Proskauer (V.P.) :

Milieu de Clark et Lubs :

Peptone.....	5 g
Phosphate dipotassique.....	5 g
Glucose	5 g
Eau de mer artificielle.....	1000 ml

pH : 7,4 - 7,6

Lecture (24h) : ajouter une goutte des réactifs VP1 et VP2 (Kit réactifs pour galerie classique - Sanofi Diagnostic Pasteur, ref. 53911) après 10 à 15 mn : rouge +, incolore -

Nitrite - Nitrate

Peptone.....	10 g
Extrait de levure.....	1 g
NaCl.....	10 g
Nitrate de potassium	1 g
E.D.	1000 ml

pH : 7,4 - 7,6

Lecture (24h) : ajouter une goutte des réactifs NIT1 et NIT2 (Kit réactifs pour galerie classique - Sanofi Diagnostic Pasteur, ref. 53911) rouge + (nitrite) si inchangé, ajouter un peu de poudre de zinc : inchangé + (nitrate) rose -

Gélatinase :

Mettre une languette de film (Sanofi Diagnostic Pasteur ref. 53861) dans une suspension épaisse de bactéries en eau de mer tamponnée (pH 7,4 - 7,6). Laisser incuber 5 à 6 jours.

Lecture : dépôt noir, la languette de film transparente +, inchangé -

Croissance sur NaCl :

Peptone..... 5 g
E. D. 1000 ml
NaCl qsp

Préparer des solutions à 0 %, 3 %, 6 %, 8 % et 10 % de NaCl

pH : 7,4 - 7,6

Lecture (24h) : trouble +, pas de changement -

A.D.H., L.D.C., O.D.C. :

Tubes Pasteur (Sanofi - Diagnostic Pasteur, ref : 53725)

Témoin :

Extrait de levure..... 3 g
NaCl 5 g
Glucose 1 g
Bromocrésol pourpre (1,6 g / 100 ml alcool 95°)..... 1 ml
E.D. 1000 ml

Lecture (1 à 4 jours) : violet +, jaune - . Le tube témoin doit impérativement être jaune (témoin de croissance)

Indole :

Peptone exempte d'indole 10 g
Eau de mer artificielle..... 1000 ml

pH : 7,4 - 7,6

Lecture (24h) : ajouter une goutte de réactif indole (Kit réactifs pour galerie classique - Sanofi Diagnostic Pasteur, ref. 53911) rouge +, jaune -

ANNEXE 4

SPECIFICITE DU MILIEU ZMSB. RESULTATS DES MELANGES, COMPTAGES ET INTERPRETATIONS DES REPLIQUES

RESULTATS DE LA RECHERCHE DE *V. penaeicida* EN MELANGES ET REPLIQUES

Date : 14/05/97

Les concentrations sont exprimées en UFC / ml

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Confirmation (portoir)
Mélange (e2)	456	210		200	
<i>V. penaeicida</i> AM101	66		vertes	50	+
Flore hétérotrophe (EDM)	390		jaunes ou autre	150	
Mélange (e3)	1050	617		920	
<i>V. penaeicida</i> AM101	660		vertes	590	+
Flore hétérotrophe (EDM)	390		jaunes ou autre	330	
Mélange (e4)	6990	2950		2600	
<i>V. penaeicida</i> AM101	6600		vertes	2600	+
Flore hétérotrophe (EDM)	390		jaunes ou autre	0	

Date : 23/05/97

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Repliques	Confirmation (portoir)
Mélange (e4)	1610	460		295	460	+
<i>V. penaeicida</i> AM101*	1400		vertes	130	180	+
Flore hétérotrophe (EDM)	210		jaunes ou autre	165	210	

Date :27/05/97

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Repliques	Confirmation (portoir)
Mélange (e4)	7033	3997		4400	3997	
<i>V. penaeicida</i> AM101*	1633		vertes	1300	1200	+
Flore hétérotrophe (EDM)	5400		jaunes ou autre	3100	2600	

Date :04/06/97

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Repliques	Confirmation (portoir)
Mélange (e4)	5305	1500		2100	1500	
<i>V. penaeicida</i> AM101**	1105		vertes	500	illisible	+
Flore hétérotrophe (EDM)	4200		jaunes ou autre	1600	illisible	

Date : 10/06/97

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Répliques	Confirmation (portoir)
Mélange (e4)	32700	30000		25000	30000	
<i>V. penaeicida</i> AM101	13800		vertes	11000	11000	+
<i>V. tubiashii</i>	18900		jaunes	14000	19000	+

Date : 30/05/97

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Répliques	Confirmation (portoir)
Mélange (e4)	588050	92000		98000	92000	
<i>V. penaeicida</i> AM101	18900		vertes	15000	illisible	+
<i>V. nigipulchritudo</i>	59150		vertes + / - foncées	29000	illisible	+
<i>V. campbellii</i>	510000		vertes claires	54000	illisible	+

Date : 12/06/97

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Répliques	Confirmation (portoir)
Mélange (e4)	68500	28000		46000	28000	
<i>V. penaeicida</i> AM101	17400		vertes	14000	14000	+
<i>V. damsela</i>	51100		vertes claires	31000	14000	+

Date : 12/06/97

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Répliques	Confirmation (portoir)
Mélange (e4)	29200	19000		25000	19000	
<i>V. penaeicida</i> AM101	17400		vertes	14000	12000	+
<i>V. hollisae</i>	11800		vertes poussant à 35 °C	10000	5000	+

Date : 15/05/97

Genre/espèce	Encsemencement (attendu)	ZoBell	Coloration des colonies sur	ZMSB (Observé)	Répliques	Confirmation (portoir)
Mélange (e4)	52300	34000		43000	34000	
<i>V. penaeicida</i> AM101	20200		vertes	20000	17000	+
<i>V. nigipulchritudo</i>	31100		vertes + / - foncées	23000	17000	+

ANNEXE 5

RESULTATS DES TESTS SUR PORTOIR DIAGNOSTIQUE

Date : 10/05/97

Genre / Espèce	Température	Salinité	VP	Indole	Gélatinase	Nitrate	Témoin	ADH	EDC	ODC
<i>V. campbelli</i> T	28	6	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>V. damsela</i> T	28	6	-	-	-	+	-	+	-	-
<i>V. hollisae</i> T	28	6	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>V. nigripulchritudo</i> T	28	6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaeicida</i> AM101 T	28	2	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaeicida</i> KH1 présumé	28	0	+	-	+	-				

Date : 17/05/97

Genre / Espèce	Température	Salinité	VP	Indole	Gélatinase	Nitrate	Témoin	ADH	EDC	ODC
<i>V. penaeicida</i> AM23(1) T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaeicida</i> AM23(2) T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaeicida</i> AM101 T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. nigripulchritudo</i> AM102 T	28	6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaeicida</i> KH1 T	28	<6	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>V. anguillarum</i> T	28	6	+	+	+	+	-	+	-	-
<i>V. splendidus</i> T	28	6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. tubiashii</i> T	28	6		+	+	+	-			

Mélange du 14/05/97

Genre / Espèce	Température	Salinité	VP	Indole	Gélatinase	Nitrate	Témoin	ADH	EDC	ODC
<i>V. penaeicida</i> AM101 T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
" <i>V. penaeicida</i> AM101" (e2)	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
" <i>V. penaeicida</i> AM101" (e3)	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
" <i>V. penaeicida</i> AM101" (e4)	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-

Mélanges du 15, 23 et du 27/05/97

Genre / Espèce	Température	Salinité	VP	Indole	Gélatinase	Nitrate	Témoin	ADH	LDC	ODC
<i>V. penaecida</i> AM101 T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaecida</i> AM101 présumé	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaecida</i> AM101 présumé	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. nigripulchritudo</i> T	28	6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. nigripulchritudo</i> présumé	28	6	-	+	+	+	-	-	-	-

Mélange du 30/05/97

Genre / Espèce	Température	Salinité	VP	Indole	Gélatinase	Nitrate	Témoin	ADH	LDC	ODC
<i>V. campbelli</i> T	28	6	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. campbelli</i> présumé	28	6	+	+	+	+	-	-	+	-
<i>V. penaecida</i> AM101 T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaecida</i> AM101 présumé	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. nigripulchritudo</i> T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. nigripulchritudo</i> présumé	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-

Mélange du 04, 10 et du 12/06/97

Genre / Espèce	Température	Salinité	VP	Indole	Gélatinase	Nitrate	Témoin	ADH	LDC	ODC
<i>V. penaecida</i> AM101 T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaecida</i> AM101 présumé	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. tubiashii</i> T	28	6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. tubiashii</i> présumé	28	6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaecida</i> AM101 T	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. penaecida</i> AM101 présumé	28	<6	-	+	+	+	-	-	-	-
<i>V. hollisae</i> T	35	6	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>V. hollisae</i> présumé	35	6	-	+	-	+	-	-	-	-

ANNEXE 6

**PHOTOGRAPHIES :
PRESENTATION DE L'ASPECT DES
COLONIES SUR ZMSB, ZOBELL ET
LORS DE L'UTILISATION DES
REPLIQUES**

COMPARAISON DES DIFFERENTS ASPECTS DES COLONIES DE *VIBRIO* SUR MILIEU ZMSB

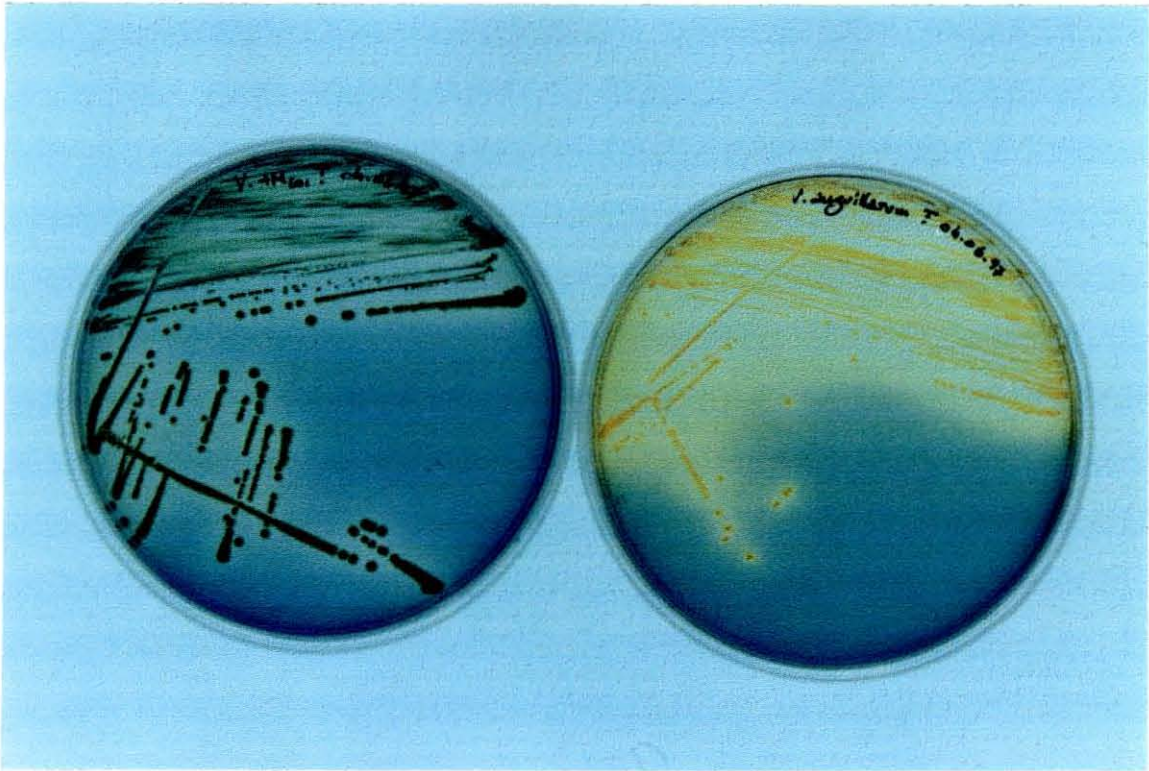


Photo 1 : Comparaison *V. penaeicida* / *V. anguillarum* (souches types)

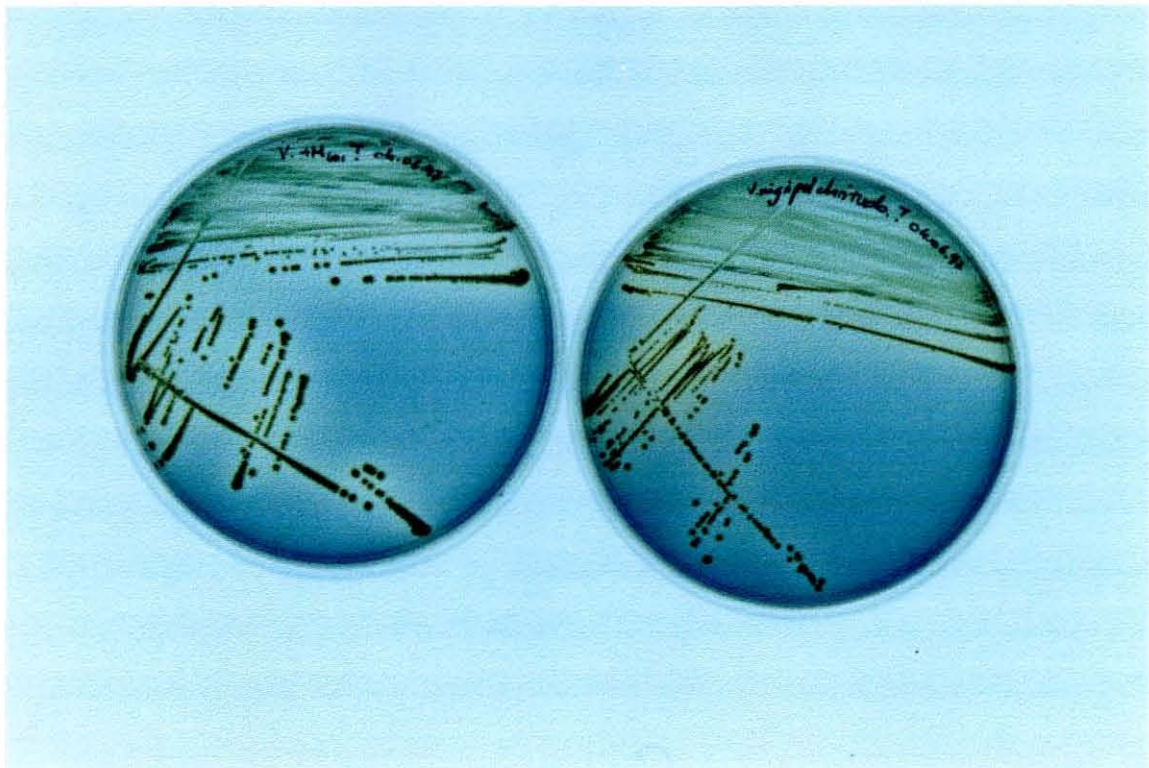


Photo 2 : Comparaison *V. penaeicida* / *V. nigripulchritudo* (souches types)

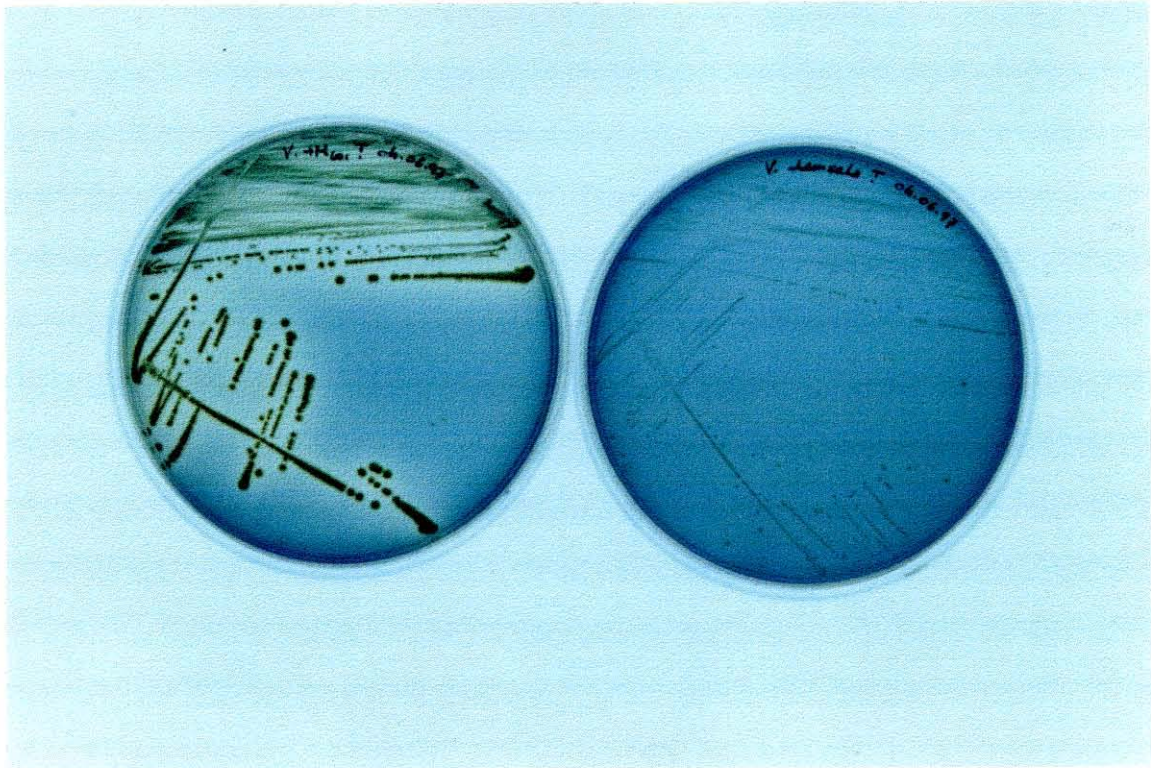


Photo 3 : Comparaison *V. penaecida* / *V. damsela* (souches types)

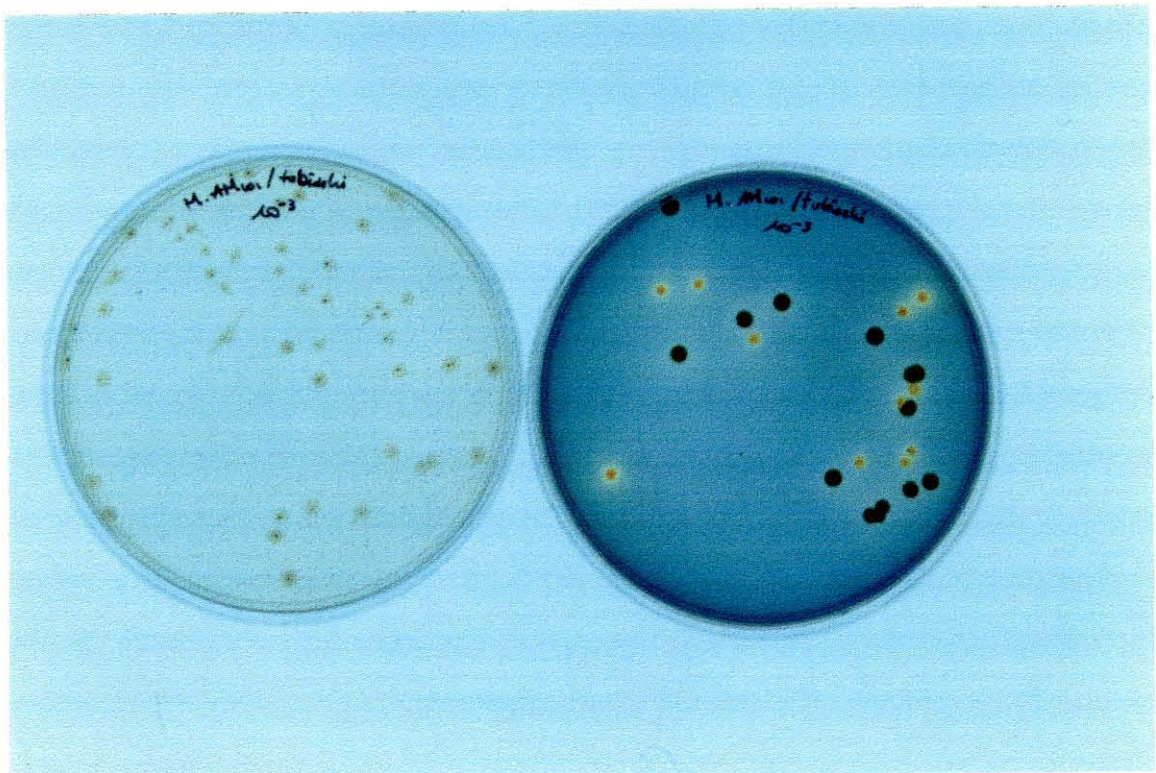


Photo 4 : Aspect d'un mélange *V. penaecida* et *V. tubiaslii* (souches types), comparaison entre ZoBell et ZMSB

ASPECTS DES REPLIQUES EFFECTUES SUR DES PRELEVEMENTS EN EAU DE MER
(APRES 24 HEURES)

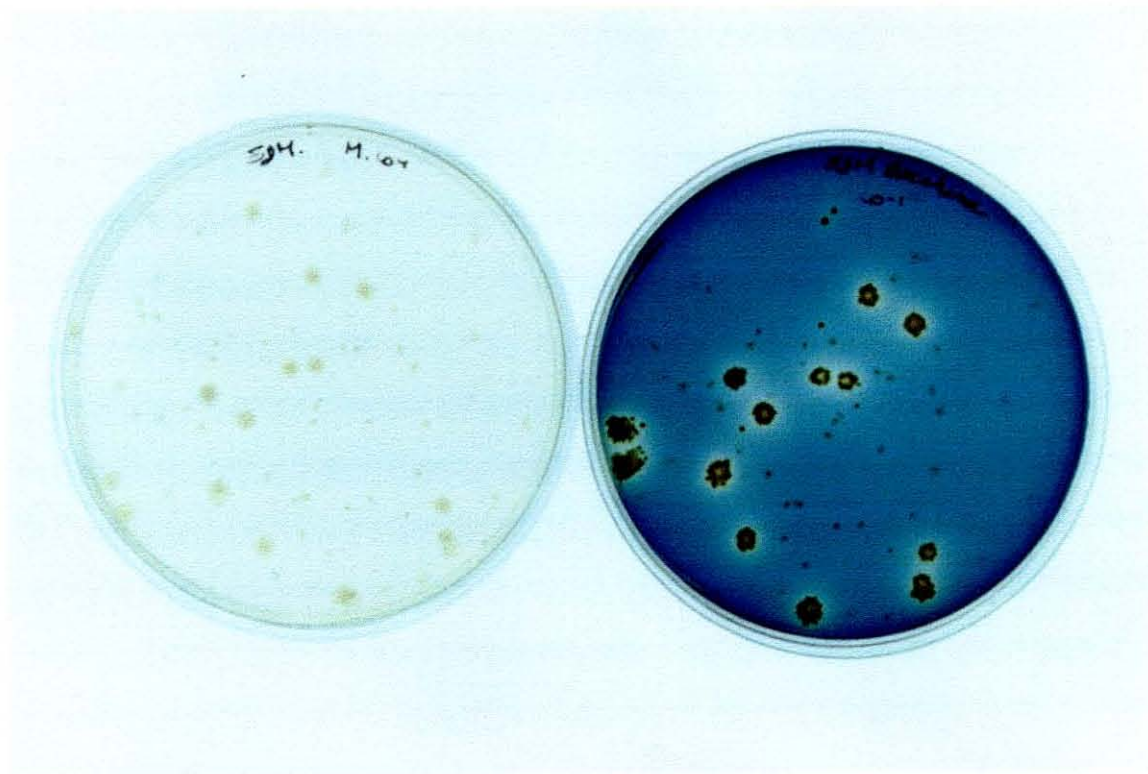


Photo 5 : Comparaison et disposition des colonies sur milieu ZoBell et ZoBell + saccharose

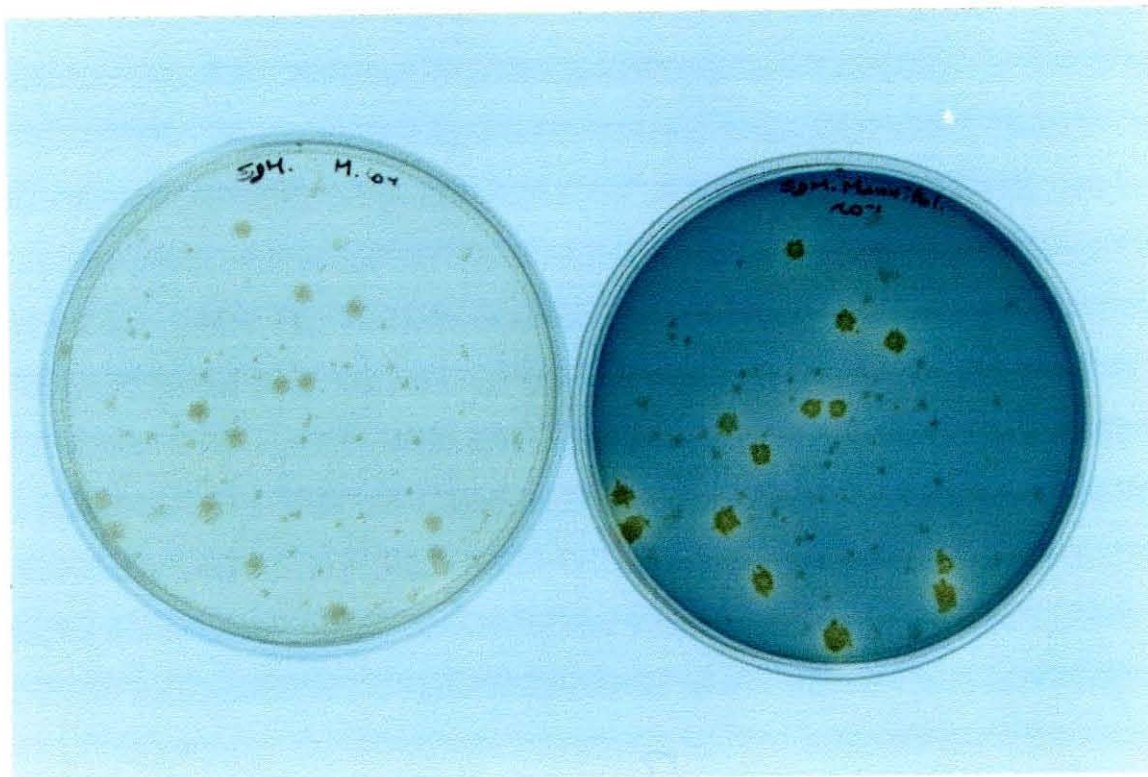


Photo 6 : Comparaison et disposition des colonies sur milieux ZoBell et ZoBell + mannitol