

SCIENCE ET PÊCHE

BULLETIN D'INFORMATION ET DE DOCUMENTATION
DE

L'INSTITUT SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DES PÊCHES MARITIMES
59, Avenue Raymond - Poincaré, PARIS (16^e)

N° 51

- PUBLICATION MENSUELLE -

OCTOBRE 1957

SÉRIE CONCHYLICULTURE.

METHODES D'EXAMEN BACTERIOLOGIQUE DE L'EAU DE MER ET DES COQUILLAGES ESSAIS COMPARATIFS.

- Nous nous proposons de donner des indications concises sur les résultats des recherches de bactériologie conchylicole poursuivies depuis trois ans dans les laboratoires de l'Institut des Pêches. -

I. EXAMEN DES EAUX ET DES COQUILLAGES PAR LE PROCÉDE DE VINCENT AU BOUILLON PHÉNIQUE

Des perfectionnements ont été récemment apportés à la méthode utilisée depuis de nombreuses années pour contrôler la qualité bactériologique des eaux conchylicoles et des coquillages (*). Ces perfectionnements portent principalement sur deux points :

- composition du milieu de culture;
- technique d'examen des coquillages.

1A - Composition du bouillon phéniqué.

Le milieu de culture, tel qu'il est mis en incubation après ensemencement, doit avoir la composition suivante, pour un litre de solution :

Peptone bactériologique	20 g
Sel marin	5 g
Phénol	0,85 g
pH	6,9 à 7,2

(*) L'ancienne méthode est décrite dans le rapport intitulé "Evaluation de la salubrité des eaux et des coquillages en France" présenté en 1954 par R. LADOUCE au Comité des Coquillages du Conseil International pour l'exploration de la Mer

Il importe d'utiliser une peptone d'excellente qualité, exempte d'indol mais capable d'en produire rapidement sous l'action d'*Escherichia coli*; elle doit donc être assez riche en tryptophane.

La teneur en chlorure de sodium peut varier légèrement selon les volumes des liquides mis en ensemencement et leur plus ou moins grande salinité (eau de mer ou liquide de trituration des coquillages). En revanche, l'addition de solution phéniquée doit être faite de telle façon que la proportion de phénol dans le milieu de culture ne s'écarte pas sensiblement de 0,85 g par litre. Cette condition est indispensable pour inhiber la plupart des germes autres qu'*E. coli* sans gêner le développement de celui-ci.

B - Examen des coquillages.

Les ensemencements sont effectués de façon à pouvoir dénombrer les *E. coli* contenus dans un volume déterminé de chair de mollusque.

En raison de sa présence en plus ou moins grande proportion, le liquide intervalvaire est susceptible d'apporter des perturbations dans le dénombrement microbien.

D'autre part, il a été constaté que les contaminations sont généralement mieux décelées par l'examen du corps du mollusque que par celui du liquide intervalvaire.

Il a été observé aussi que la libération des *E. coli* inclus dans le corps du mollusque exige une assez fine division; celle-ci est susceptible de donner un résultat plus élevé que lorsque la dilacération est sommaire.

Voici le mode opératoire; il est entendu que les diverses manipulations sont faites avec les précautions habituelles d'aseptie.

a) Lavage et brossage (sans antiseptique) des coquillages constituant l'échantillon. On réunit un nombre d'individus tel que le volume total de la chair soit compris entre 20 et 40 ml environ:

b) Ouverture des coquilles. Rejet du liquide intervalvaire.

c) Mesure du volume des corps dans une éprouvette graduée contenant de l'eau salée à 1 % et stérilisée.

d) Découpage aux ciseaux, puis broyage au mortier avec du sable.

e) Addition d'eau salée stérile pour que le volume total de l'eau ajoutée aux corps de mollusques soit égal à deux fois le volume de ceux-ci.

f) Après agitation suivie d'un repos de quelques secondes, prélèvement à la pipette de volumes convenables de liquide pour ensemencement en bouillon peptoné et phéniqué.

En général, il est fait 2 séries d'ensemencements de 5 tubes chacune : l'une des séries est ensemencée à raison d'un ml par tube et l'autre avec 0,1 ml par tube.

Selon l'ordre de grandeur de la pollution, on peut faire varier les volumes d'ensemencement. A défaut d'élément d'information sur l'importance possible de la contamination, on ensemence 3 séries ou davantage. Dans ce cas, on ne trouve le plus souvent que 2 séries significatives; l'autre ou les autres sont entièrement positives ou nulles.

g) Incubation dans l'étuve à $41^{\circ}5 \pm 0^{\circ}5$ durant 40 à 48 h.

h) Repiquage en tubes de bouillon phéniqué et incubation à $41/42^{\circ}$ durant 24 h.

i) Recherche de l'indol par la réaction de Salkowsky (réactif nitreux) et dénombrement des tubes positifs, c'est-à-dire donnant la réaction de l'indol d'une façon plus ou moins intense.

Remarques -

1) Il n'est pas tenu compte des cas où la subculture forme seulement un louche microbien, sans réaction de l'indol.

2) Lorsque les coquillages sont fortement contaminés, les cultures peuvent se développer rapidement et il est possible d'obtenir un résultat en 30 heures environ (incubation de 22 à 24 h. pour la culture primaire et de 6 à 8 h. pour la subculture).

3) La recherche de l'indol peut donner assez fréquemment un résultat positif en culture primaire comme dans la subculture correspondante. Il arrive même qu'une production d'indol en culture primaire ne se manifeste plus en subculture.

Cependant, le repiquage est utile pour les raisons suivantes :

a) En présence du glycogène provenant du corps des mollusques, le pouvoir indologène d'*E. coli* est susceptible de ne pas se manifester.

b) Lorsque la réaction de l'indol est positive en culture primaire et négative en subculture, il y a lieu de suspecter la présence de germes indologènes autres qu'*E. coli*. Ces germes ont été affaiblis puis complètement inhibés par les deux passages en bouillon phéniqué : ils ne sont pas démonstratifs d'une pollution.

Détermination du nombre d'*E. coli*

Tous les tubes de la subculture donnant la réaction de l'indol, quelle que soit l'intensité de celle-ci, sont comptés comme contenant *E. coli*. Une forte réaction est assez souvent susceptible de correspondre à une contamination particulièrement récente; cependant, il a été constaté que des *E. coli* bien identifiés pouvaient n'être que faiblement indologènes. C'est donc essentiellement le nombre de tubes positifs pour un volume d'ensemencement donné qui est utilisé pour apprécier l'importance de la contamination éventuelle.

L'un de nous a établi des tables qui donnent immédiatement le nombre d'*E. coli* par litre de liquide d'ensemencement d'après le nombre de tubes positifs. La formule algébrique ayant servi à la construction de ces tables

repose sur les principes ordinairement admis dans les laboratoires français de bactériologie.

Le nombre d'E. coli contenu dans les coquillages est obtenu en multipliant par 3 le résultat donné par le liquide d'ensemencement, puisque les bactéries ont été dispersées dans un volume égal à 3 fois celui des corps de mollusques.

Identification des bactéries indologènes en bouillon phéniqué -

Nous avons supposé, pour faciliter l'expression des résultats, que les tubes indologènes correspondent à la présence d'E. coli. En fait, ce n'est pas parfaitement exact; mais l'hypothèse est acceptable car elle ne conduit pas à une erreur notable.

Il a été vérifié, en effet, que 95 % environ des germes indologènes en bouillon phéniqué sont des E. coli typiques.

Cette vérification a été faite de deux façons :

- Isolement des germes sur gélose E.M.B.; repiquage des colonies violettes en milieu de Kligler et de Simmons.

- Repiquage en bouillon lactosé, bilié, additionné de vert brillant et en eau peptonée pour recherche du pouvoir indologène; incubation de ces deux milieux à 44° (Test de Mackenzie).

2. EXPERIMENTATION DE NOUVELLES METHODES.

Deux méthodes ont été expérimentées pour l'eau de mer et les coquillages :

1) Ensemencement en bouillon de peptone lactosé, bilié et additionné de vert brillant. Incubation à 44°. Pour les tubes gazogènes, repiquage en eau peptonée et recherche de l'indol après incubation à 44°.

2) Procédé de la membrane filtrante; celle-ci, après récolte des germes, est placée sur milieu de Chapman modifié (gélose lactosée, additionnée de triphényl-tétrazolium et de Tergitol) puis incubée à 44° (*).

Voici le résumé des principales observations faites jusqu'alors :

1) Une durée d'incubation de 24 h. du bouillon à la bile et au vert brillant est généralement suffisante pour donner un résultat significatif. Les cultures gazogènes dans le bouillon sont le plus souvent indologènes après repiquage en eau peptonée (E. coli typique). Particulièrement pour les coquillages, on peut parfois constater la présence de germes gazogènes non indologènes; mais dans l'ensemble, la proportion de ces germes n'est pas élevée.

(*) Pour la description du procédé, voir : "La colimétrie de l'eau sur membranes filtrantes", par R. BUTTIAUX, G. MUCHEMBLE et Th. LEURS - *Ann. Inst. Pasteur*, juin 1953.

2) Le procédé de la membrane filtrante peut fournir un résultat en 24 h. Son application présente des difficultés lorsque l'eau est limoneuse; il en est de même avec le corps des mollusques. Dans ce dernier cas, on peut seulement dépister les fortes contaminations, car il est seulement possible de filtrer un très faible volume (0,5 ml de liquide de trituration de la chair pour une membrane de 5 cm de diamètre).

3) Avec l'eau de mer, les trois procédés (bouillon phéniqué, bouillon au vert brillant, membrane filtrante) donnent des résultats qui diffèrent fréquemment entre eux; le résultat le plus fort est souvent obtenu avec le bouillon phéniqué, tandis que la membrane donne le nombre le plus faible.

L'écart est parfois très grand, mais comme il est inégal, celui qui correspond aux valeurs moyennes est moins important.

Par exemple, un groupe de 15 analyses nous a donné, pour le bouillon phéniqué, un résultat global approximativement égal au double de celui relatif au bouillon au vert brillant. Le résultat moyen fourni par la membrane était inférieur d'environ 15 % à celui du vert brillant.

4) Pour les résultats globaux concernant 43 échantillons de coquillages, il a été trouvé que le rapport entre la somme des nombres respectivement obtenus avec le bouillon phéniqué et le bouillon au vert brillant était de 1,3; l'écart est donc moins grand que pour l'eau de mer. Lorsque le procédé à la membrane est applicable, il donne des résultats qui ne sont pas nettement inférieurs à ceux des autres procédés.

3. ESSAI DE LA METHODE DE CLEGG ET SHERWOOD.

Plusieurs essais furent faits pour comparer la méthode aux tubes roulés de CLEGG et SHERWOOD avec celle du bouillon phéniqué de VINCENT. La gelose de MAC CONKEY utilisée était le milieu préparé OXOID (CM 115 A). A défaut d'appareil spécial, les tubesensemencés furent roulés à la main sur une surface froide. Incubation de 24 h. à 44°.

Les essais ont porté sur divers échantillons de coquillages susceptibles de renfermer des nombres très variables d'E. coli. Un échantillon d'eau de mer fut également examiné.

Les échantillons de coquillages ont été préparés comme il est indiqué dans la première partie de ce rapport. Pour les deux méthodes, les ensemencements ont été faits à partir des mêmes liquides contenant les produits de la trituration des corps de mollusques. Tous les résultats ont été calculés en appliquant le coefficient 3 au nombre de germes trouvé dans le liquide de trituration. De cette façon, les différences qui peuvent être constatées tiennent uniquement aux procédés de culture.

Pour chaque échantillon (sauf un), deux ou plusieurs déterminations furent faites avec chaque méthode. Les résultats sont exprimés pour un litre de chair de mollusque ou d'eau de mer (Voir Tableau I).

Le tableau II récapitule comparativement la moyenne des résultats des déterminations faites pour chaque échantillon.

Dans le cas de la méthode de VINCENT, afin d'obtenir le nombre le plus valable, la moyenne est calculée d'après les résultats donnés par une répartition équilibrée des tubes positifs dans les séries semblables.

TABLEAU I

Echantillons	Essais	E. coli par litre	
		VINCENT	CLEGG et SH.
1. Huitres	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
	4		0
	5		0
2. Moules	1	3600	6000
	2	12000	3000
	3	18000	0
	4		9000
	5		12000
3. Moules	1	0	3000
	2	0	3000
	3	0	0
	4		3000
	5		0
4. Moules	1	3600	0
	2	2400	3000
	3	1200	0
	4		3000
	5		3000
5. Moules	1	1200	0
	2	600	3000
	3	1800	0
	4		0
	5		3000
6. Coques	1	180 × 10 ⁴	237 × 10 ⁴
	2	240 × 10 ⁴	255 × 10 ⁴
	3		231 × 10 ⁴
7. Palourdes	1	24000	54000
	2		72000
	3		57000
	4		54000
8. Eau de mer	1	15000	5000
	2	10000	11000
	3		8000
	4		8000
	5		7000

TABLEAU III

Echantillons	E. coli par litre	
	VINCENT	CLEGG et SH.
1. Huîtres	0	0
2. Moules	10000	6000
3. Moules	0	1800
4. Moules	2300	1800
5. Moules	1200	1200
6. Coques	210×10^4	241×10^4
7. Palourdes	24000	60000
8. Eau de mer	13000	8000

Remarques

1) Pour 2 échantillons de coquillages sur 7 (les n^{os} 3 et 7), les résultats sont nettement plus élevés avec la méthode anglaise qu'avec celle au bouillon phéniqué; mais les écarts ne sont pas toujours dans le même sens. Il n'est donc pas possible de dire que les résultats de l'une des méthodes sont systématiquement plus élevés que ceux de l'autre.

2) Pour l'une et l'autre méthodes considérées séparément, la constance des résultats dépend de l'uniformité de répartition des germes dans le liquide d'ensemencement. A cet égard, l'une des méthodes ne semble pas nettement supérieure à l'autre.

3) Par rapport à la méthode de VINCENT, la méthode anglaise présente un avantage marqué en ce qui concerne le délai nécessaire pour l'obtention du résultat. En revanche, elle nécessite certaines précautions particulières et un matériel spécial pour être aisément applicable.

Sur les tubes roulés contenant la gélose de MAC CONKEY, le dénombrement des colonies est parfois malaisé ou douteux. La difficulté, surtout pour un observateur qui n'a pas une longue expérience de la méthode, réside principalement dans la petitesse de certaines colonies; en outre, la coloration des colonies n'est pas toujours parfaitement franche. Par exemple, pour l'échantillon de palourdes, sur les 79 colonies comptées sur 4 tubes roulés, 50 étaient très petites et leur identification incertaine.

La caractérisation d'E. coli est moins sûre avec cette méthode qu'avec la méthode de la membrane filtrante précédemment indiquée.

CONCLUSIONS PROVISOIRES.

L'étude des méthodes bactériologiques en vue d'une normalisation exige de multiples expériences, aussi serait-il actuellement prématuré de formuler des conclusions définitives.

Des avantages et des inconvénients peuvent être attribués à chaque méthode, compte tenu des conditions pratiques de l'exercice des contrôles bactériologiques.

Pour un même échantillon, les essais comparatifs donnent, selon les cas, des résultats plus ou moins concordants ou discordants. Les discordances tiennent non seulement à ce que les germes dénombrés n'appartiennent pas toujours à la même espèce et au même type, mais aussi et surtout à l'affaiblissement assez rapide d'E. coli dans le milieu marin. Selon les conditions de culture, les germes affaiblis reprennent leur vitalité ou demeurent inhibés.

M. BOURY et J. BORDE

Science & Pêche

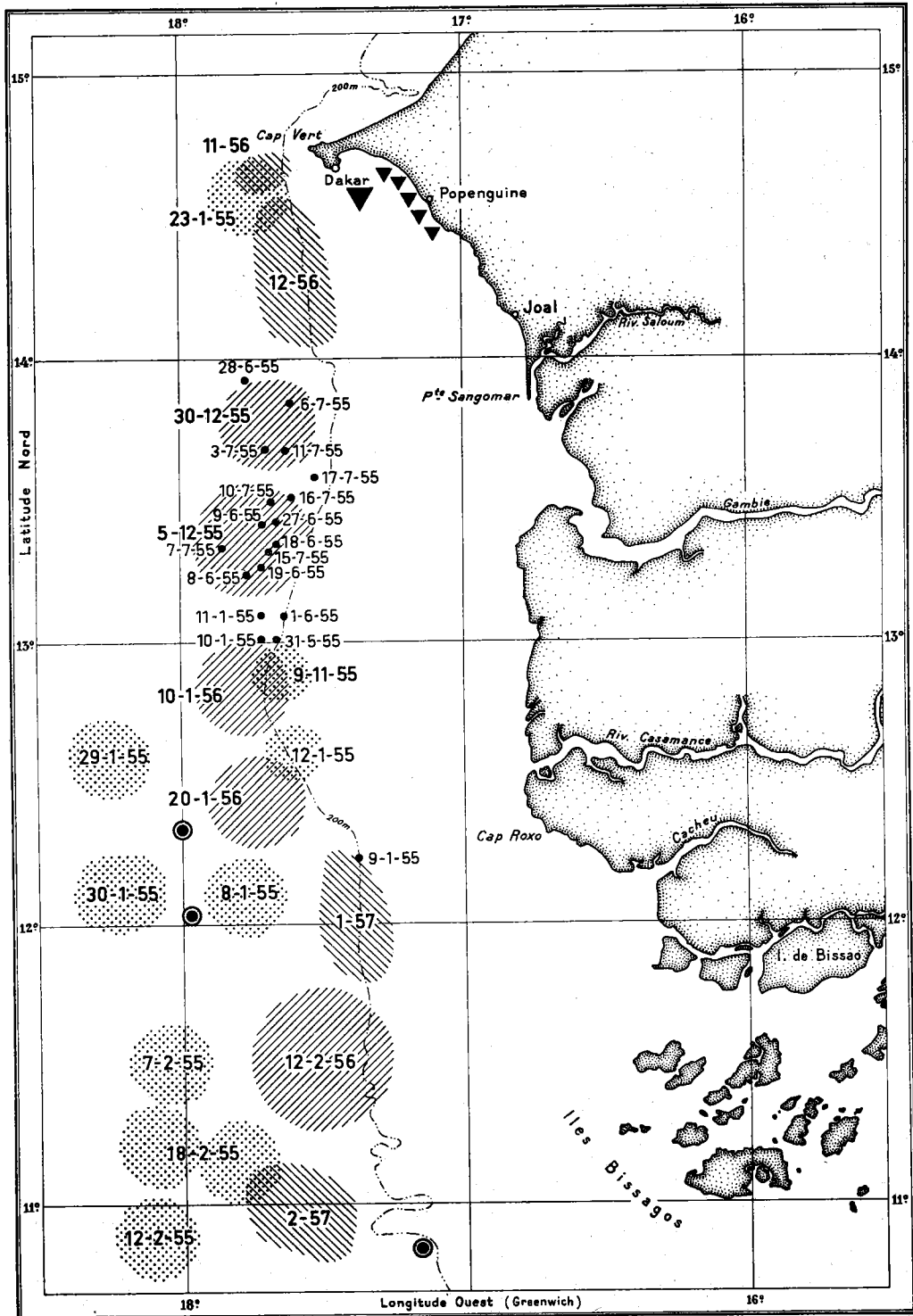
N° 51 - 1957

Le Directeur
FURNESTIN.

La reproduction, totale ou partielle du *Bulletin d'Information* (Science et Pêche) est autorisée sous la réserve expresse d'en indiquer l'origine.

Imp. VARITYPIE

Prix. 40 F.



Carte II (2)

r. monet