

Contribution à l'inventaire des populations microbiennes à Gram négatif des eaux méditerranéennes des côtes françaises

par

C. TYSSET*, J. BRISOU** et C. DURAND*

* *Laboratoire régional de recherches vétérinaires Nice, (France)*

** *Faculté de Médecine, Poitiers (France)*

Peu de recherches ont été faites dans ce sens. Cependant de courtes énumérations furent données par quelques auteurs : J. BRISOU [1] [2] [3], puis Mlle CHAKROUN [9] à l'occasion de travaux sur le microbisme de certains invertébrés marins.

Matériel

Les souches recensées et étudiées ici ont toutes été isolées de violets (*Microcosmus sabatieri* Roule 1885).

Ces Tuniciers du groupe des « filtreurs » retiennent sur leurs branchies, pour leur nourriture ou passivement, les bactéries de leur environnement.

Ces microbes sont en partie sélectionnés par l'hôte comme J. BRISOU *et coll.* [6] l'ont précisé. Il y a sans doute une attirance spécifique due à des produits chimiques sécrétés par ces Ascidies ou de simples facteurs agissant comme un lien entre commensaux. Les micropopulations que ces animaux hébergent sont le reflet de la micromasse de leur biotope.

Tous les invertébrés que nous avons étudiés avaient été pêchés dans une région allant de Hyères à Sète. Nos recherches ont porté sur treize lots distincts achetés soit à des détaillants ou à la criée et parfois récoltés sur notre demande en un point précis (avant-port de Marseille).

Tous ces animaux avaient l'apparence de la fraîcheur. Chaque examen fut fait sur 4 à 6 unités suivant grosseur.

Préparation des échantillons

Ils furent préparés selon le mode que nous avons indiqué autre part [8]. Les isolements faits en partant des suspensions-dilutions au 1/10, sur gélose nutritive à l'eau de mer, additionnée de vert brillant pour un taux final de 1/500.000.

Il s'agit comme on le voit d'un procédé très sélectif, ne donnant évidemment pas une idée précise du microbisme total.

Cette étude fut volontairement limitée aux germes à Gram négatif.

Les boîtes sur lesquelles l'isolement est pratiqué sont incubées à 28-30° C pendant 24 à 48 heures. On prélève les colonies repérées au préalable. Elles sont purifiées par ensemencement sur gélose nutritive à l'eau de mer. On passe par trois colonies et on pratique un contrôle *in fine* au microscope et après coloration de Gram, de l'homogénéité de la culture ainsi que de la pureté des colonies.

Au cours de la culture fut notée une pigmentation éventuelle. Celle-ci parfois fugace, disparaît au cours des subcultures successives.

Pour caractériser les bactéries retenues nous les avons soumises à de nombreuses épreuves de laboratoire désormais classiques, mentionnées dans nos travaux antérieurs.

Catalogue des germes isolés

Le bilan porte sur 96 souches.

Leur identification est conforme à la systématique française, telle que MAGROU & A.R. PREVOT l'avaient définie en 1948, remaniée par J. BRISOU & A.R. PREVOT en 1954 et publiée en 1961 par A.R. PREVOT [12].

Ordres des Bactéries

A. Famille des *Pseudomonadaceae* - WINSLOW *et al.*, 1917.

Tribu I *Pseudomonadeae* (Kluyver & Van Niel, Magrou & Prevot (1948). Brisou (1958).

Genre I *Pseudomonas* Migula 1894 *emend*

PS <i>viscosa</i>	10
PS <i>setariae</i>	10
PS <i>syncyanea</i>	7
PS <i>martyntiae</i>	4
PS <i>ovalis</i>	4
PS <i>fairmountensis</i>	2
PS <i>wieringae</i>	2
PS <i>chlorina</i>	2
PS <i>neofermentans</i>	1
PS <i>fluorescens</i>	1
PS <i>sesami</i>	1
PS <i>xanthochlorum</i>	1
PS <i>boreopolis</i>	1
PS <i>mori</i>	1

Genre II - *Phytobacterium* (Magrou & Prevot, 1948), Brisou *et coll.*, 1965

<i>Phyto minuscula</i>	2
<i>Phyto astragali</i>	1
<i>Phyto harveyi</i>	1
<i>Phyto stereotropis</i>	1

Tribu II - *Achromobacterae* Magrou & Prevot 1948, Brisou & Prevot 1954

Genre I *Achromobacter* (Bergey *et al.*, 1923) *emend* Magrou & Prevot, 1948.

Achr <i>iophagum</i>	18
Achr <i>hyperopticum</i>	5
Achr <i>ichthyodermis</i>	1

Genre II *Acinetobacter* J. Brisou & Prevot, 1954, BORMANET *coll.*

<i>Acin.equiralis</i>	2
<i>Acin.stationis</i>	3
<i>Acin.stenohalis</i>	1
<i>Acin.viscosum</i>	2
<i>Acin.douglasi</i>	1
<i>Acin.eurydice</i>	1
<i>Acin.metalcaligenes</i>	1

Tribu III - *Chromobactereae* Prevot, 1948

Genre II *Flavobacterium* Bergey *et al.* 1923, *emend* Brisou J. 1969 (7).

<i>Flav.mangiferae</i>	2
<i>Flav.suaveolens</i>	2

Genre IX - *Xanthomonas* Dowson, 1939, *emend* Brisou J. 1969 (7)

X. *tardicrescens* 1

Famille des *Vibrionaceae* Prevot 1948

Genre *vibrio* Muller 1773

V. <i>anguillarum</i> A	2
V. <i>percolans</i>	1
V. <i>hyphalus</i>	1

Observations

L'examen de cette liste permet de constater la prédominance des *Pseudomonas*, 48,8 p. 100, des *Achromobacter* 26 p. 100 et des *Acinetobacter* 11, 3 p. 100.

Dans le genre *Pseudomonas*, 3 espèces dominent : *viscosa*, *setariae* et *syncyanea*.

Ps.viscosa (10 représentants) avait déjà été rencontré chez les huîtres mises en stabulation dans les bassins de retrempage de Sidi Ferruch (Algérie).

Ps.setariae n'avait jamais été signalé dans le milieu marin. C'est un agent pathogène de certaines plantes (*millet-Seteria italica*). Décrit pour la première fois en 1934 par OKABE. Ecotype halophile il ne cultive que sur les substrats où la teneur en NaCl est de 3 p. 100.

Ps.syncyanea est connu depuis 1840, où il fut isolé d'un lait altéré par EHRENBURG. C'est un germe cosmopolite et les « variétés marines » ne sont pas rares. Nous en avons rencontré d'autres spécimens provenant de poissons pêchés dans le bassin d'Arcachon et de vases du port d'Alger. Toutes nos souches étaient aussi halophiles « préférentielles ».

Les *Phytobacterium* sont peu nombreux : 4,1 p. 100. Agents phytopathogènes ou saprophytes banaux, ils se trouvent dans le milieu océanique par hasard, en transit, charriés par les eaux des fleuves ou véhiculés par les vents et les oiseaux de mer. Leur survie dans un milieu exotique n'est pas un cas particulier. Leur plasticité et leur euryhalisme permettent à ces microbes de s'adapter à des biotopes variés.

L'espèce *minuscula* n'était pas jusqu'à ce jour, un écotype méditerranéen. On ne connaissait que la variété terrestre que McBETH isola d'un sol et décrivit en 1916.

La tribu des *Achromobacterae* avec trente six représentants vient en deuxième position. Sa fréquence dans le milieu marin est reconnue par l'ensemble des chercheurs qui se sont occupés de la classification de ces bactéries.

Arch. iophagum est un germe omniprésent dans toutes les mers du globe. Mlle CHAKROUN l'a signalé dans les eaux côtières du Roussillon; ZOBELL dans l'Océan Pacifique; PELOUX chez divers fruits de mer : poissons, crabes et algues vivant dans les eaux littorales de la Nouvelle-Calédonie; nous-mêmes l'avons rencontré dans les boues du port d'Alger.

Les écotypes que nous avons signalés sont halophiles préférentiels. Leur culture est plus facile en eau salée qu'en eau douce.

Achr. hyperopicum. Ici aussi, on ne connaît que des espèces pélagiques. COMPELL & WILLIAMS isolèrent le premier spécimen en 1957. CASTELVÌ le rencontra par deux fois chez des Lamellibranches pêchés dans les parages de Barcelone et nous-mêmes chez des poissons du bassin d'Arcachon.

Les *Acinetobacter* forment un ensemble relativement important avec 11 représentants. Tous, sauf les espèces *equirulis* et *eurydice* sont des espèces banales du milieu océanique, bien que le second ait été déjà rencontré par l'un de nous dans la rade de Toulon et par Mlle CHAKROUN chez des Moules pêchées au large de Banyuls.

La tribu des *Chromobacterae* forme un ensemble restreint avec trois espèces dont *suaveolens* que nous avons déjà rencontrée chez des moules de la région algéroise.

Dans la famille des *Vibrionaceae* avec le genre *vibrio* est surtout présent *anguillarum* A, bactérie ubiquiste, déjà signalée par LAGARDE E. *et coll.* dans la région de Banyuls [11] et par nous-mêmes dans les eaux algéroises. Nous avons exposé autre part [4] [5] ce qu'il fallait penser de ce vibriion défini par A. NEY-BELIN [1937]. Il présente en outre, une agressivité marquée pour de nombreux poissons : Saumons, Truites, Morues, Anguilles. SMITH en 1961 a fait une excellente étude de ce genre.

La plupart de ces microbes ont une action métabolique marquée sur diverses matières organiques en suspension ou sous forme colloïdale ou dissoute, si elles sont présentes dans le milieu marin, notamment sur les sédiments, le plancton, les algues.

L'étude enzymatique a permis de les classer dans des groupes distincts, bien que, un même microbe puisse posséder à la fois plusieurs fonctions enzymatiques effectives qui agissent en synergie.

C'est ainsi que nous avons pu souligner :

- l'importance des germes protéolytiques : 78,1 p. 100;
- le nombre élevé de bacilles glucidolytiques : 73,9 p. 100;
- la fréquence des microbes réducteurs de nitrates : 64,5 p. 100.

En outre, nous avons enregistré :

- germes lipolytiques : 71,8 p. 100
- germes indologènes : 44,7 p. 100
- germes sulfhydrogènes : 43,7 p. 100

Ces microbes que l'on peut qualifier de « saprophytes écologiques » sont capables d'utiliser comme substrats, des éléments organisés morts ou en voie de décomposition, puis de se maintenir en survie lors des carences nutritionnelles.

Commentaires et conclusion

Cette publication est une contribution à l'étude des bactéries à Gram négatif contenues dans les violets, sélectionnées par eux et par la méthode de culture. Les germes habituels du milieu marin sont présents (10) : *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Acinatobacter*, *Flavobacterium*, *vibrios*.

Les groupes physiologiques sont les mêmes que ceux que les autres chercheurs ont mis en évidence ailleurs, mais il faut souligner ici l'importance des *indologènes* (47,7 p. 100). Cette proportion ne correspond pas aux résultats obtenus portant sur les analyses d'eau de mer (ZOBELL, RAUTLIN DE LA ROY et l'un de nous). CHAKROUN chez les Moules du Roussillon n'en rencontre qu'un faible pourcentage.

Pour comprendre les résultats il faut considérer :

1. Le fait de la sélection très sévère exercée par l'emploi d'un seul milieu de culture (gélose à l'eau de mer + vert brillant);
2. Le biotope très particulier que représentent les violets dont le pH est franchement acide, autour de 4,5;
3. Le fait maintenant bien établi que le microbisme du benthos est nettement différent de celui de l'environnement en ce qui concerne les bactéries non polluantes. Il se constitue une sélection des bactéries protéolytiques et surtout indologènes qui n'appartiennent pas au groupe des *Entérobactéries*.

Cette notion sur laquelle l'un de nous a plusieurs fois insisté a une conséquence pratique. Certaines techniques de surveillance des coquillages reposent uniquement sur la recherche de l'indole, caractère classique mais non exclusif d'*E. coli* car de nombreuses autres bactéries normales du benthos sont indologènes. Cette étude en apporte une preuve supplémentaire.

Enfin les proportions énoncées ne peuvent en raison des conditions techniques utilisées, être comparées à celles qui ont été publiées par différents auteurs et nous-mêmes.

Ce qui se passe chez les animaux benthiques est fort éloigné des phénomènes qui se déroulent dans les eaux ou sur les sédiments.

Références bibliographiques

- [1] BRISOU (J.), 1954. — Étude d'espèces et de variétés nouvelles d'*Achromobacter* isolés du milieu marin. *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, **86**, 1, pp. 118-120.
- [2] BRISOU (J.), 1955. — *Microbiologie du milieu marin*. — Paris, Éditions médicales Flammarion. 271 p.
- [3] BRISOU (J.), 1958. — *Etude de quelques Pseudomonadaceae. Classification*. Bordeaux, Ed. Baillet. 214 p.
- [4] BRISOU (J.), TYSSET (C.), MAILLOUX (M.) & ESPINASSE (J.), 1962. — Recherches sur les vibrions marins. A propos de 44 souches isolées des moules (*Mytilus galloprovincialis*) du littoral algérois. *Bull. Soc. Path. exot.*, **55**, 2, pp. 260-275.
- [5] BRISOU (J.), TYSSET (C.), MAILLOUX (M.) & ESPINASSE (J.), 1963. — Sur la flore commensale bactérienne des moules (*Mytilus galloprovincialis* Lmk) de la région algéroise. *Arch. Inst. Pasteur Algér.*, **41**, 1/2, pp. 7-18.
- [6] BRISOU (J.), TYSSET (C.) & RAUTLIN DE LA ROY (Y.), 1965. — Étude sur la microbiologie du benthos, in : *Pollutions marines par les microorganismes et les produits pétroliers, Symposium de Monaco (avril 1964)*, pp. 115-122. Paris, C.I.E.S.M.

- [7] BRISOU (J.) & DENIS (F.), 1969. — Identification des bacilles Gram négatifs à pigment jaune non diffusible. Étude de 204 souches. *Commentaires de microbiologie du Laboratoire Le Dantec*, Poitiers, 8, pp. 1-98.
- [8] CHAKROUN (F.), 1964. — Contribution à l'étude des microflores bactériennes de la Moule (*Mytilus galloprovincialis* Lmk). *Thèse doctorat 3^e cycle*, Paris.
- [9] FORMISANO (M.), 1965. — La microbiologia marina e i problemi scientifico tecniche ella solloeva. *Rev. ital. Igiene*, **25**, 5/6, pp. 514-583.
- [10] LAGARDE (E.) & CHAKROUN (F.), 1965. — Une épizootie à *Vibrio anguillarum* chez les Anguilles de l'étang du Canet (Pyrénées Orientales). *Ann. Inst. Pasteur, Lille*, **108**, pp. 135-140.
- [11] PREVOT (A.R.), 1961. — *Traité de systématique bactérienne 1 et 2*. — Paris, Ed. Dunod.
- [12] TYSSET (C.), BRISOU (J.) & DURAND (C.), 1971. — Hygiène des violets (*Microcosmus sabatieri* Roule 1885) pêchés en mer Méditerranée et consommés dans le midi de la France. *Rapp. Comm. int. Mer Médit.*, **21**, 5, pp. 261-265

