

CONTRIBUTIONS A L'ETUDE DES BACTERIES MARINES DU LITTORAL BELGE

III. — Milieux de culture et ensemencements

PAR

Guido PERSOONE (Gand)

INTRODUCTION.

Au cours d'investigations sur le fouling de substrats immergés en mer, nous avons tenté de suivre l'évolution de la faune pionnière sur nos substrats.

Les bactéries marines étant les premières à former un film sur tout objet plongé dans la mer, il nous fallut d'abord trouver le moyen de les en détacher.

A cet effet, nous avons mis au point une méthode : la « waterpressure-and-suction rinsing method » (PERSOONE G., 1964 et 1965) dans laquelle les microbes sont détachés par une action répétée de succion et de jet d'eau sous pression.

Restait ensuite à choisir une méthode d'ensemencement et un milieu de culture en vue de l'analyse quantitative de ces bactéries.

Dans la littérature, les milieux conseillés pour l'énumération du plus grand nombre de germes présents dans un échantillon d'eau de mer sont aussi nombreux que variés; diverses méthodes d'ensemencement sont préconisées par divers auteurs (ZOBELL Cl. E., 1946; CARLUCCI A. F. et PRAMER D., 1957; JANNASCH H. W. et JONES G. E., 1959; JONES G. E. et JANNASCH H. W., 1959; BUCK J. D. et CLEVERDON R. C., 1960, 1961).

Aucun milieu nutritif général ne convenant à tous les germes marins, comme les auteurs précités l'ont d'ailleurs souligné, nous avons comparé

plusieurs milieux ainsi que deux méthodes d'ensemencement pour découvrir

- 1°) le meilleur milieu pour les organismes présents dans le biotope,
- 2°) la meilleure méthode d'ensemencement,
- 3°) le meilleur temps d'incubation.

MATERIEL ET METHODES.

1. Milieux nutritifs.

	1	2	3	4	5
Petone	5 gr	5 gr	2 gr	5 gr	—
Glucose	—	1 gr	1 gr	1 gr	—
Extrait de levure	—	—	—	0,1 gr	—
FePO ₄	0,1 gr	0,1 gr	0,3 gr	0,1 gr	—
Nutrient Broth (Difco) ...	—	—	6 gr	—	8 gr
Agar	15 gr				
Eau distillée	250 ml	250 ml	250 ml	250 ml	1000 ml
Eau de mer vieillie	750 ml	750 ml	750 ml	750 ml	—

Milieu 1 = Milieu 2216 de ZOBELL Cl. E. (1946), couramment utilisé en bactériologie marine.

Milieu 2 = Selon REUSZER H. W. (1933), le glucose aurait une influence favorable sur le développement des germes marins. Nous avons modifié le milieu 1, en y incorporant 1 gr de glucose par litre.

Milieu 3 = En utilisant ce milieu, CVIIC V. (1955) affirme avoir obtenu de 15 à 20 % plus de colonies que sur le milieu 2216 de ZOBELL, ou le milieu de REUSZER.

Milieu 4 = En 1952, OPPENHEIMER C. H. et ZOBELL Cl. E., pour étudier l'influence de la pression sur les germes marins, ont utilisé un milieu contenant de l'extrait de levure (milieu 2216 E).

En 1957, JONES G. E. constate l'action favorable de cet extrait de levure sur le développement des bactéries mari-

nes. Depuis, de nombreux investigateurs ont confirmé le bien-fondé de cette affirmation.

Nous avons modifié notre milieu 2 en y introduisant 0,1 gr d'extrait de levure par litre.

Milieu 5 = « Nutrient Agar » classique, généralement préconisé pour les analyses d'eau (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater).

Le pH de tous les milieux à l'eau de mer a été ajusté à 7,6 au moyen de NaOH 1 N avant la stérilisation, de façon à obtenir un pH final de $7,6 \pm 0,1$.

2. Les liquides

servant à faire les dilutions (dilution blanks).

ont été préparés avec de l'eau de mer stabilisée (« aged seawater » ZOBELL Cl. E., 1946) pour ensemercer les milieux 1, 2, 3 et 4 (à base d'eau de mer), et avec la solution physiologique pour les milieu 5 (à base d'eau distillée).

3. Méthodes d'ensemencement.

a) La méthode classique d'après KOCH (« Pour plates »).

1 ml de la dilution contenant les germes est pipeté dans une boîte de PETRI stérile.

Avant d'y couler la gélose refroidie à 42 °C, à raison de ± 20 ml par boîte, les boîtes sont placées sur une plaque de verre refroidie à - 12 °C pour éviter l'effet, souvent léthal, d'une température trop élevée sur les germes marins (GUNKEL W., JONES G. E. et ZOBELL Cl. E., 1961).

b) La méthode « en surface » (« Spread plates ») :

Nous avons trouvé dans la littérature deux méthodes d'ensemencement en surface pour les bactéries marines : celle utilisée par CARLUCCI A. F. et PRAMER D. (1957), l'autre préconisée par BUCK J. D. et CLEVERDON R. C. (1960).

Les premiers auteurs pipettent 0,1 ml d'une dilution donnée sur la surface de la gélose; puis en inclinant la plaque successivement dans tous les sens, ils tentent de répartir le liquide uniformément sur toute la surface (ce qui n'est pas toujours aisé, la tension superficielle s'y opposant).

BUCK C. D. et CLEVERDON R. C. par contre, étendent le liquide à l'aide d'une baguette de verre pliée et stérile. L'inconvénient de cette méthode est qu'un certain nombre de germes reste toujours collé à la baguette.

Afin de remédier tant bien que mal à ces deux inconvénients, nous avons essayé la modification suivante (qui nous fut inspirée par une troisième

méthode d'ensemencement en surface, tout récemment mise au point par VAN DER HEYDE H. (1963) dans sa méthode des plaques à anneaux) : En ajoutant 10 ppm de Tween 80 à notre milieu, nous abaissons la tension superficielle et la répartition uniforme du liquide pipeté est facilitée, ce qui évite d'employer une baguette de verre.

Le Tween 80, du moins dans la concentration utilisée, ne semble pas affecter le développement des bactéries marines comme l'ont constaté JONES G. E. et JANNASCH H. W. (1959).

Les boîtes ensemencées sont alors placées, avec le couvercle au-dessus, en atmosphère desséchante (CaCl_2), jusqu'à ce que la surface de la gélose soit devenue sèche de nouveau (environ 15 minutes), ensuite, elles sont retournées et incubées comme des boîtes de PETRI ordinaires.

4. Température d'incubation.

18-20 °C pour les milieux à base d'eau de mer, 37 °C pour le milieu à l'eau distillée. Cette dernière température, léthale pour la plupart des germes marins (ZOBELL Cl. E. et CONN J. E., 1940), n'empêche pas la croissance des germes telluriques (Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater).

5. Procédure.

a) Le 7 février 1964, un échantillon d'eau de mer fut prélevé dans la rade du port d'Ostende et ramené à l'Institut de Biogéographie et Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Gand, dans un sac calorifugé. Durée du transport : 1 heure.

On dilua de 10^{-1} à 10^{-4} et on en ensemença par la méthode classique et par la méthode en surface, les milieux de culture 1, 2, 3 et 5, à raison de 4 boîtes de PETRI par dilution, au total 160 géloses. Dénombrement après 2, 4, 6, 9, 12, 16 et 20 jours d'incubation.

b) Le 25 février 1964 puis le 5 mars 1964, le milieu 3 qui avait donné les meilleurs résultats fut comparé au milieu 4, dans une même série d'expériences. L'ensemencement eut lieu par la méthode classique.

Dénombrement également après 2, 4, 6, 9, 12, 16 et 20 jours d'incubation.

6. Résultats et discussion.

Pour l'interprétation mathématique des résultats, nous avons toujours choisi la dilution présentant la plus belle colonisation sur les boîtes de PETRI à la fin de la période d'incubation (entre 50 et 400 colonies).

La moyenne arithmétique, la déviation moyenne et la déviation moyenne exprimée en pour cent, des 4 géloses de la dilution considérée, ont été réunies dans le tableau I.

A. Expérience du 7 février 1964,
ensemencement par la méthode classique
(Pour plates) (Graphique 1).

1°) Le milieu 3 est de loin le meilleur puisqu'il totalise 35 % de colonies de plus que les milieux 1 ou 2. Ce résultat confirme donc ceux de CVIC V. (1955).

2°) Bien que les germes d'origine tellurique devraient normalement abonder suite aux apports fluviaux et au déversement des égouts, le nombre de colonies sur le milieu 5 (à l'eau distillée, incubé à 37 °C) est très faible comparé à celui des 3 milieux à l'eau de mer et incubés à 20 °C.

Ceci en accord avec la règle généralement admise que

- a) l'eau de mer exerce une influence inhibitrice sur les bactéries d'origine tellurique (ZOBELL Cl. E., 1946; BRISOU., 1955; AUBERT M., LEBOUT H. et AUBERT J., 1963).
- b) les milieux à l'eau non salée (ZOBELL Cl. E. et FELTHAM C. B., 1933; Mc LEOD E. A. et ONOFREY E., 1956) et la température d'incubation élevée (ZOBELL Cl. E. et CONN J. E., 1940) ne conviennent pas pour le développement des germes marins.

3°) Le nombre maximum de colonies est atteint après 9-12 jours d'incubation à 20 °C. Par contre, sur le milieu à l'eau distillée incubé à 37 °C, il est déjà atteint au bout de 6 jours et 80 % des colonies se manifestent endéans les 2 premiers jours.

Signalons que ZOBELL Cl. E. (1946) obtint le maximum de colonies au 18^e jour d'incubation à 20 °C et que GUNKEL W. (1963) a attendu 21 jours avant de compter les colonies sur les géloses.

B. Expérience du 7 février 1964,
ensemencement en surface
(Spread plates) (Graphique 2).

1°) Le milieu 2 a donné le meilleur résultat sans toutefois surclasser nettement les 2 autres milieux à l'eau salée (comme ce fut le cas avec les « Pour plates » cf. graphique n° 1).

2°) Comme avec les « Pour plates », beaucoup moins de colonies sur le milieu 5 à l'eau distillée que sur les milieux à l'eau de mer.

3°) Le nombre maximum de colonies est atteint après 9 jours d'incubation (6 jours pour le milieu à l'eau distillée).

C. En superposant les graphiques 1 et 2,
il ressort que :

1°) pour les milieux à l'eau salée, les maxima obtenus avec les « Pour plates » sont nettement supérieurs à ceux obtenus avec les « Spread plates ».

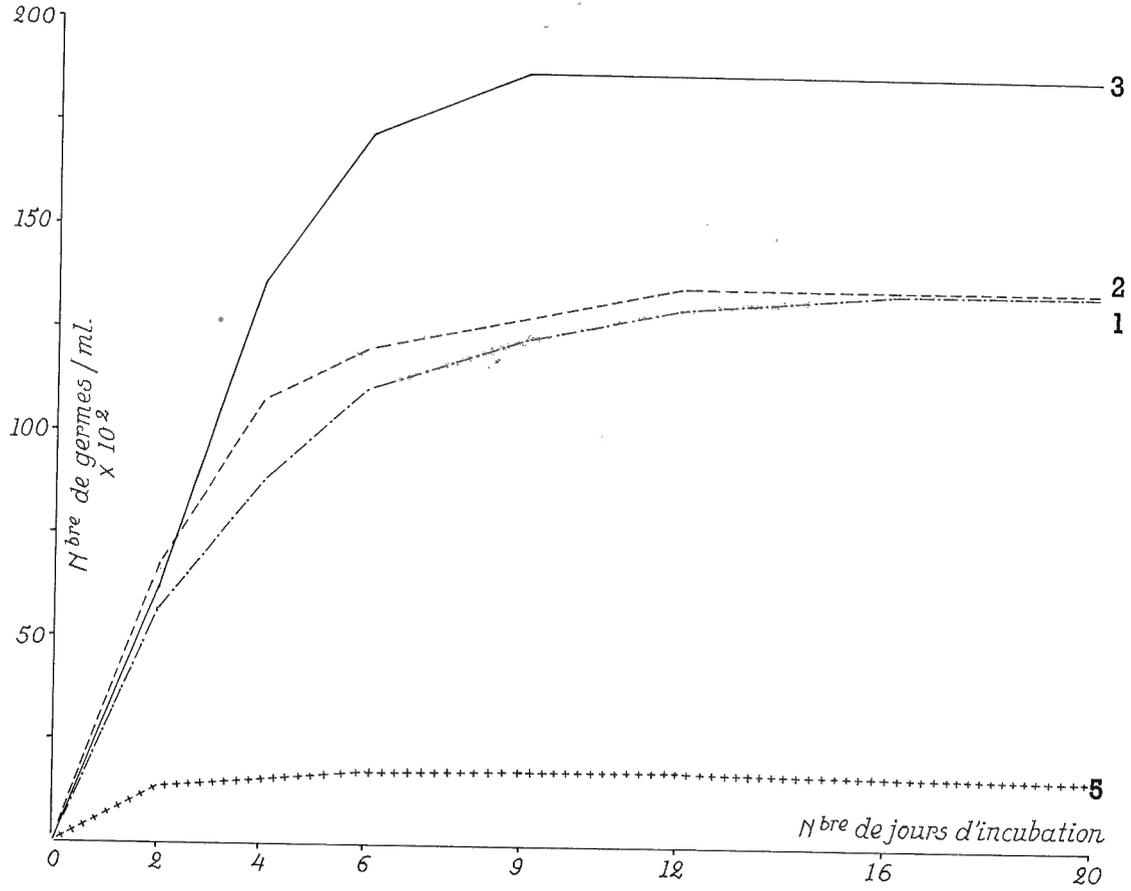


Fig. 1.

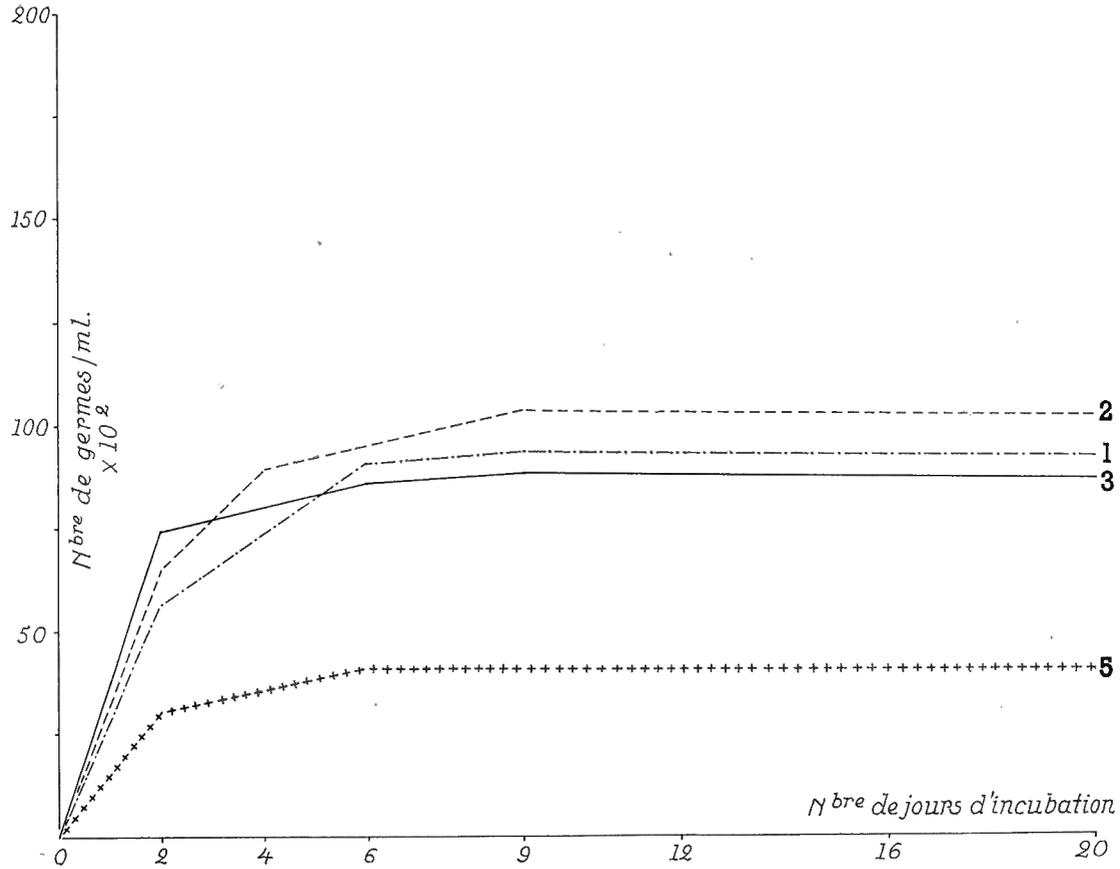


Fig. 2.

Ceci confirme les résultats de CARLUCCI A. F. et PRAMER D. (1957), mais non ceux de BUCK J. D. et CLEVERDON R. C. (1960, 1961), qui mentionnent des maxima plus élevés avec l'ensemencement en surface.

JANNASCH H. W. et JONES G. E. (1959), comparant la méthode de développement sur membranes filtrantes avec les « Pour plates », ont trouvé que les deux donnaient le même résultat, alors que KRISS A. E. (1961) déconseille vivement l'emploi de tels filtres en bactériologie marine (1).

La très grande différence dans les biotopes d'où provenaient les échantillons étudiés par les différents auteurs pourrait-elle être la cause de la contradiction manifeste dans les résultats ?

2°) pour le milieu à l'eau douce : le contraire s'est produit : l'ensemencement en surface donne des meilleurs résultats (la déviation moyenne est cependant très élevée pour ces géloses).

Les germes d'origine tellurique présents semblent donc avoir un caractère d'aérobie assez stricte.

D. Expériences du 25 février et 5 mars 1964, ensemencement par la méthode classique uniquement (Pour plates) (Graphique 3).

Nous avons ici comparé deux fois de suite le milieu 3, qui avait donné les meilleurs résultats lors des expériences précédentes, au milieu 4 (contenant un peu d'extrait de levure).

Comme JONES G. E. (1957), CARLUCCI A. F. et PRAMER D. (1957), JANNASCH H. W. et JONES G. E. (1959), BUCK J. D. et CLEVERDON R. C. (1960, 1961), nous avons pu constater l'action favorable de l'extrait de levure. En effet, le nombre de colonies sur le milieu 4 dépasse de $\pm 10\%$ celui du milieu 3.

* Le maximum est de nouveau atteint après 9 jours d'incubation à 20 °C.

Il est à noter que dans ces 2 dernières expériences, nous avons trouvé un nombre de germes dix fois plus élevé que celui trouvé le 7 février, bien que la température de l'eau, mesurée lors du prélèvement de l'échantillon, fut la même à 1 °C près (1°-0°-1 °C) pour les 3 dates.

Les raisons de cet accroissement soudain peuvent être très variées (ZOBELL Cl. E., 1946; BRISOU J., 1955).

7. Conclusions.

Pour l'analyse quantitative des germes marins dans notre biotope, il s'est avéré que :

1°) le milieu 4 (à base d'eau de mer et contenant un peu d'extrait de levure) est le meilleur des milieux examinés;

(1) Ce n'est qu'au moment de mettre sous presse que nous avons pris connaissance des travaux de J. BRISOU (1963) à ce sujet.

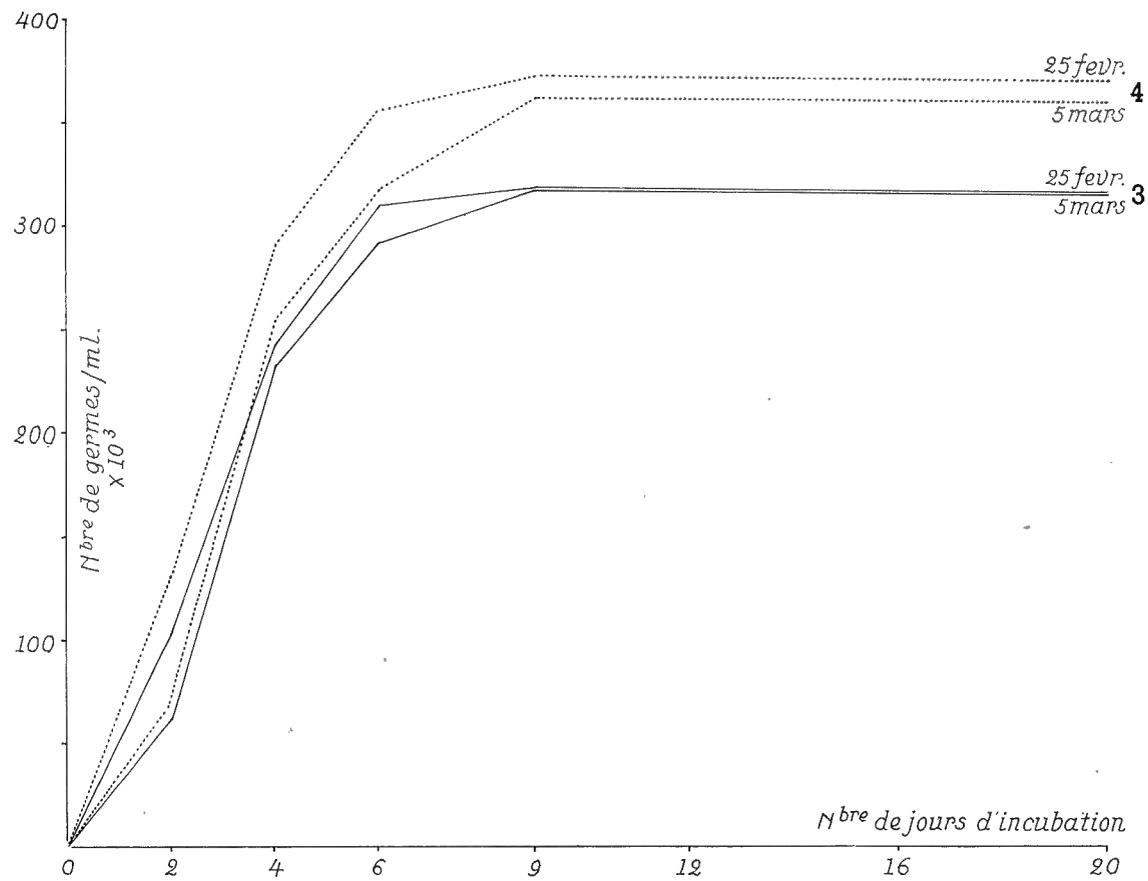


Fig. 3.

- 2°) l'ensemencement par la méthode classique (Pour plates) donne des résultats très supérieurs à ceux obtenus par l'ensemencement en surface (Spread plates);
- 3°) le nombre de germes d'origine tellurique présents dans l'eau de mer est faible par rapport aux germes marins. Pour l'analyse quantitative de ces bactéries telluriques, l'ensemencement en surface semble plus indiqué que l'ensemencement d'après KOCH;
- 4°) le nombre maximum de colonies est atteint après 9-12 jours d'incubation sur tous les milieux à l'eau de mer incubés à 20 °C, et après 6 jours pour le milieu à l'eau distillée, incubé à 37 °C.

Les expériences ont été faites sous la direction du Prof. Dr F. EVENS, Directeur de l'Institut de Biogéographie et du Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Gand, et du Dr E. LELOUP, Directeur de l'Institut d'Etudes Maritimes d'Ostende.

Qu'ils veuillent trouver ici l'expression de nos vifs remerciements.

TABLEAU I.

Moyenne arithmétique, déviation moyenne et déviation moyenne exprimée en %, du nombre de colonies.

Expérience du 7 février. «Pour plates» (Nombre de colonies $\times 10^2$).

	Nombre de jours d'incubation					
	2	4	6	9	12	16
Milieu 1						
Moyenne	53	84	104	121	124	132
Dev. Moy.	7,5	16	21	15	17	23
%	14,1	19	20,1	12,3	13,7	17,4
Milieu 2						
Moyenne	65	108	119	128	133	133
Dev. Moy.	11	15	22	25	25	25
%	16,9	13,8	18,4	19,5	18,7	18,7
Milieu 3						
Moyenne	60	136	170	183	183	183
Dev. Moy.	8	15	23	27	27	27
%	13,3	11,0	13,5	14,7	14,7	14,7
Milieu 5						
Moyenne	11	15	16	16	16	16
Dev. Moy.	3,5	3	3	2,5	2,5	2,5
%	31,8	20	18,7	15,6	15,6	15,6

Expérience du 7 février. « Spread plates » (Nombre de colonies $\times 10^2$).

	Nombre de jours d'incubation					
	2	4	6	9	12	16
Milieu 1						
Moyenne	56	71	90	94	94	94
Dev. Moy.	9	19	11	12	12	12
%	16	26,7	12,2	12,7	12,7	12,7
Milieu 2						
Moyenne	64	88	94	102	102	102
Dev. Moy.	6	9	4	5	5	5
%	9,3	10,2	4,2	4,9	4,9	4,9
Milieu 3						
Moyenne	74	80	85	88	88	88
Dev. Moy.	13	10	11	10	10	10
%	17,5	12,5	12,9	11,3	11,3	11,3
Milieu 5						
Moyenne	30	35	40	40	40	40
Dev. Moy.	20	22	19	20	20	20
%	66,6	62,8	47,5	50	50	50

Expérience du 25 février. « Pour plates » (Nombre de colonies $\times 10^3$).

	Nombre de jours d'incubation			
	2	4	6	9
Milieu 3				
Moyenne	98	239	307	317
Dev. Moy.	8,5	17,5	28	31
%	8,6	7,3	9,1	9,7
Milieu 4				
Moyenne	122	285	352	370
Dev. Moy.	10,5	25,5	15	12
%	8,6	8,9	4,2	3,2

Expérience du 5 mars. « Pour plates » (Nombre de colonies $\times 10^3$).

	Nombre de jours d'incubation			
	2	4	6	9
Milieu 3				
Moyenne	61	231	290	316
Dev. Moy.	5	18	33	33
%	8,1	7,7	11,3	10,4
Milieu 4				
Moyenne	63	250	313	360
Dev. Moy.	5,5	26	40	39
%	8,7	10,4	12,7	10,8

RÉSUMÉ.

Dans le but de cultiver le plus grand nombre possible de germes marins, plusieurs milieux de culture solides ont été comparés, en ensemençant par la méthode classique d'après KOCH, et « en surface ».

La période optimum d'incubation pour le développement d'un nombre maximal de colonies sur les disques a été déterminée.

SAMENVATTING.

Verschillende vaste voedingsbodems werden vergeleken om het grootst mogelijke aantal mariene bacteriën te kweken. Twee manieren van uitplaten werden hiervoor aangewend : de klassieke gietplaten volgens KOCH, en de oppervlakteuitplating.

De optimum incubatieperiode om een maximaal aantal kolonies op de platen te tellen, werd bepaald.

SUMMARY.

In order to detect a suitable medium for the enumeration of marine bacteria, several culture media were compared by two methods of plating : « pour plates » after KOCH, and « spread plates ».

The optimum period of incubation to get a maximum number of colonies on the dishes was determined.

ZUSAMMENFASSUNG.

Verschiedene Nährmedia sind verglichen worden zur Ermittlung der grösst möglichen Keimzahl mariner Bakterien. Zwei Aussaatmethoden sind hierbei angewandt worden: die Gussplatten nach KOCH und die Oberfläche-aussaat.

Die optimum Bebrütungsperiode für die Entwicklung einer maximalen Anzahl Kolonien ist nachgegangen worden.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE.

- AUBERT, M., LEBOUT, H. et AUBERT, J.
1963. *Le pouvoir antibiotique du milieu marin*. (Cahiers du Cerbom, 4, XII.)
- BRISOU, J.
1955. *Microbiologie du milieu marin*. (Collection de l'Institut Pasteur. Ed. Médic. Flammarion.)
1963. *Numération comparative des bactéries marines par cultures et lecture directe sur membranes* (C. R. Soc. Biol., CLVII (3), 635.)
- BUCK, J. D. and CLEVERDON, R. C.
1960. *The spread plate as a method for the enumeration of marine bacteria*. (Limnol. and Ocean, 1, p. 78.)
1961. *The effect of Tween 80 on the enumeration of marine bacteria by the spread and pour plate methods*. (Limnol. and Ocean., 6, p. 42.)
- CARLUCCI, A. F. and PRAMER, D.
1957. *Factors influencing the plate method for determining the abundance of bacteria in sea water*. (Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96, p. 392.)
- CVIIC, V.
1955. *Distribution of bacteria in the waters of the Mid Adriatic Sea*. (The M. V. «Hvar» Cruises-Researches into Fisheries Biology 1948-1949; Izvjesca-Reports, IV, 1.)
- GUNKEL, W., JONES, G. E. and ZOBELL, C. E.
1961. *Influence of volume of nutrient agar medium on development of colonies of marine bacteria*. (Helgolander Wiss. Meeresunters, 8, 1, p. 87.)
- GUNKEL, W.
1963. *Daten zur Bakterienverteilung in der Nordsee*. (Veröff. Inst. Meeresf. Bremerhaven Sonderband, p. 80.)
- JANNASCH, H. W. and JONES G. E.
1959. *Bacterial populations in sea water as determined by different methods of enumeration*. (Limnol. and Ocean., 4, p. 128.)
- JONES, G. E.
1957. *Bacteriological Proceedings*. (Detroit Michigan, p. 16.)
- JONES, G. E. and JANNASCH, H. W.
1959. *Aggregates of bacteria in sea water as determined by treatment with surface active agents*. (Limnol. and Ocean., 4, p. 269.)
- KRISS, A. E.
1961. *Meetesmikrobiologie. Tiefseeforschungen*. (Veb Gustav Fischer Verlag. Jena.)
- Mc LEOD E. A. and ONOFREY, E.
1956. *Nutrition and metabolism of marine bacteria. I. Observations on the relation of sea water to the growth of marine bacteria*. (J. Bact, 71, p. 661.)

OPPENHEIMER, C. H. and ZOBELL, Cl. E.

1952. *The growth and viability of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure.* (Journ. Mar. Res., 11, p. 10.)

PERSOONE, G.

1964. *Contributions à l'étude des bactéries marines du littoral belge. I. Un appareil simple pour détacher et obtenir en suspension les bactéries contaminant des surfaces.* (Bull. Inst. roy. Sc. nat. Belg., Tome XLI, n° 5.)
1965. *Contributions à l'étude des bactéries marines du littoral belge. II. Comparaison de plusieurs méthodes pour détacher et obtenir en suspension les bactéries contaminant des surfaces.* (Bull. Inst. roy. Sc. nat. Bel., Tome XLI, n° 12.)

REUSZER, H. W.

1933. *Marine bacteria and their role in the cycle of life in the sea. III. The distribution of bacteria in the ocean waters and muds about Cape Cod* (Biol. Bull., 65, p. 480.)

VAN DER HEYDE, H.

1963. *Zur Vereinfachung der quantitativen und qualitativen Bestimmung der Bakterien unter Verwendung von « Ringplatten ».* (Zentralblatt für Bakt., Parasitenk., Infekt. ung Hygiene I Orig., 189, p. 224.)

ZOBELL, Cl. E. and FELTHAM, C. B.

1933. *Are there specific marine bacteria?* (Proc. Pacific. Sci. Congr. Pacific Sci. Assoc. 5th, Vancouver, 3, p. 2097.)

ZOBELL, Cl. E. and CONN, J. E.

1940. *Studies on the thermal sensivity of marine bacteria.* (Journ. Bact., 40, p. 223.)

ZOBELL, Cl. E.

1946. *Marine Microbiology.* (Waltham Mass. USA. Chronica Botanica Cy.)

BIOGEOGRAFISCH INSTITUUT EN LABORATORIUM VOOR OEOLOGIE
RIJKSUNIVERSITEIT GENT
EN ZEEWETENSCHAPPELIJK INSTITUUT OOSTENDE.

