

ACTION ANTIBIOTIQUE
DE QUELQUES ESPÈCES
PHYTOPLANCTONIQUES MARINES
VIS-A-VIS DE DIFFÉRENTES SALMONELLES

par J. AUBERT* et Cl. JOIRIS**

60808

Il est maintenant bien connu que l'eau de mer possède un pouvoir antibiotique lié à des sécrétions d'origine biologique, ainsi que l'ont montré différents auteurs : Ketchum et coll.(1), Saz et coll.(2), Aubert (3).

Dans le milieu océanique, les organismes marins susceptibles de produire de telles substances semblent relativement nombreux. Comme l'a mis en évidence M. Aubert (4), les uns prédominent au niveau du milieu benthique : bactéries marines : Rosenfeld et ZoBell (5), Krassil'nikova (6), Buck et coll.(7), Gauthier(8); grandes algues: Sieburth (9) ; coraux: Burkholder (10), mollusques: Prescott et coll.(11); éponges: Nigrelli et coll.(12), alors que les autres, comme les organismes phytoplanctoniques: Aubert et coll. (13, 14), Duff et coll. (15) qui représentent une grande part de la biomasse marine seront prédominants dans le milieu pélagique.

Les recherches que nous avons poursuivies au C.E.R.B.O.M., ont porté plus particulièrement sur les substances antibiotiques issues du phytoplancton, inhibitrices de certaines bactéries aérobies et anaérobies (16, 17).

Nous avons pu observer aussi que plus de 30 % des espèces phytoplanctoniques étaient douées d'activité antibactérienne vis-à-vis de différents germes d'origine tellurique dont certains sont issus des contaminations fécales : *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus faecalis* ...

Il nous a alors paru intéressant d'étudier les propriétés antibiotiques de certains organismes phytoplanctoniques vis-à-vis des Salmonelles, ces germes étant responsables de maladies graves.

Si les travaux de divers auteurs tels que ceux de Buttiaux et Leurs (18), Gevaudan et Tamalet (19), Beard et Meadowcroft (20), ont porté sur l'étude de l'action de l'eau de mer vis-à-vis de certaines Salmonelles, l'action du phyto-

*C.E.R.B.O.M. (I.N.S.E.R.M.) Nice

**Laboratorium voor Ekologie en Systematiek, Vrije Universiteit Brussel.
B-1050 Bruxelles - Belgique

plancton lui-même a rarement été abordé. Signalons cependant, dans ce domaine, les travaux de M. Gauthier relatés dans sa thèse (8), sur l'activité d'une espèce phytoplantonique particulière : *Asterionella notata*.

Le méthode utilisée pour notre étude a été la suivante :

a) preparation de l'extrait phytoplantonique

A partir de souches axéniques ou non axéniques provenant de la salle de cultures du C.E.R.B.O.M., l'extrait phytoplantonique est préparé de la manière suivante : les cellules sont recueillies sur filtre Millipore (environ 1 gramme en poids humide, puis broyées au mortier et introduites dans 10 ml d'eau distillée. Après broyage, cette préparation est ensuite filtrée sur membrane Millipore 0,45 micron et constitue le liquide planctonique proprement dit tel qu'il sera utilisé.

b) Germes-tests :

Les souches bactériennes utilisées (Collection de l'Institut Pasteur) ont été les suivantes :

Salmonella cholerae suis
Salmonella typhi murium LT2
Salmonella bovis morbificans
Salmonella gallinarum pullorum
Salmonella maleagris

c) Technique bacteriologique :

La détermination de l'activité antibiotique a été étudiée selon la technique de l'antibiogramme en milieu gélosé : les antibiogrammes ont été réalisés en boîte de Pétri en milieu gélosé à pH 6 et dans les conditions standard préconisées par Chabbert : l'inoculum de 0,9 ml d'une dilution au 1/100e d'une culture de 24 heures en bouillon nutritif gélosé. L'ensemencement a été effectué en masse dans la gélose fondue et ramenée à 45° C. Les liquides à tester sont déposés dans des cupules découpées à l'emporte pièce dans la gélose. La lecture est effectuée après 18 heures d'incubation à 37° C.

Dans le but de déterminer la Concentration Minimale Inhibitrice et la Concentration Inhibitrice Partielle on a utilisé la méthode des stries sur gélose.

Celle-ci consiste à préparer une série de boîtes de Pétri dont la gelose contient une gamme de dilutions du liquide à tester : 1/10 - 1/25 - 1/50 - 1/100 - 1/250 - 1/500 - 1/1000 - 1/2500 - 1/5000 - 1/10000.

A la surface de ces géloses, on pratique une strie avec une suspension de chaque germe à étudier, titrant approximativement 100 000 germes/ml.

Après incubation à 37° C pendant 18 heures pour chaque germe, et par rapport à un témoin sans extrait, on peut déterminer la C.M.I. du liquide testé (première concentration inhibant totalement le germe) et la C.I.P. (première concentration déterminant une inhibition visible de la croissance des colonies par rapport au témoin, sans inhibition complète).

RESULTATS :

Notre étude a porté sur quinze espèces phytoplanctoniques vis-à-vis de cinq souches de Salmonelles. Afin de vérifier l'activité du liquide un test sur *Staphylococcus aureus* était réalisé en même temps.

Les résultats qui sont donnés sur les tableaux I et II mettent en évidence les faits suivants :

Parmi les germes testés, deux ont présenté une activité marquée vis-à-vis des Salmonelles testées : *Chaetoceros teres* et *Skeletonema costatum*.

L'extrait de *Chaetoceros teres* empêche le développement des cinq Salmonelles testées : *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhi murium* LT2, *Salmonella bovis morbificans*, *Salmonella gallinarum pullorum*, *Salmonella macleodensis*, alors que l'extrait de *Skeletonema costatum* agit seulement sur quatre des Salmonelles : *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella bovis morbificans*, *Salmonella gallinarum pullorum*, *Salmonella macleodensis*.

Dans le cas de *Skeletonema costatum* la Concentration Minimale Inhibitrice et la Concentration Inhibitrice Partielle (voir le tableau II) confirment l'insensibilité de *Salmonella typhi murium* mise en évidence par le simple antibiogramme.

Rappelons que dans sa thèse, M. Gauthier avait montré qu'*Asterionella notata* présentait une action inhibitrice vis-à-vis de *Salmonella typhi murium* et *Salmonella cholerae suis* et avait précisé les Concentrations Minimales Inhibitrices (respectivement 1/400 et 1/500) et les Concentrations Inhibitrices

Tableau n° I - Effet antibactérien de quelques espèces phytoplanctoniques marines vis-à-vis de cinq espèces de Salmonelles.
(antibiogrammes : taille de l'aurole d'inhibition en mm)

Espèces phytoplanctoniques		Espèces bactériennes (1)				
		1	2	3	4	5
<i>Asterionella japonica</i>	CA 17	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros teres</i>	CA 20	5	9	8	9	7
<i>Skeletonema costatum</i>	(2)	3	0	8	5	5
<i>Nitzschia asciularis</i>	CA 5	0	0	0	0	0
<i>Prymnesium parvum</i>	CA 6	0	0	0	0	0
<i>Tetraselmis striata</i>	CA 9	0	0	0	0	0
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CA 18	0	0	0	0	0
<i>Lithodesmium undulatum</i>	CA 19	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros affinis</i>	C 1	0	0	0	0	0
<i>Prorocentrum micans</i>	C 16	0	0	0	0	0
<i>Chaetoceros socialis</i>	C 19	0	0	0	0	0
<i>Rhizosolenia alata</i>	C 41	0	0	0	0	0
<i>Thalassiosira decipiens</i>	C 56	0	0	0	0	0
<i>Bacillaria paradoxa</i>	C 60	0	0	0	0	0
<i>Gyrodinium spenceri</i>	C 75	0	0	0	0	0
<i>Asterionella notata</i>	(2)	0	0	0	0	0

- (1) Bactéries : 1 *Salmonella cholerae suis*
2 *Salmonella typhi* murium LT2
3 *Salmonella bovis* morbificans
4 *Salmonella gallinarum* pullorum
5 *Salmonella maleagris*

(2) Nouvel isolement : non axénique

Tableau n° II - Détermination des valeurs de Concentration Minimale Inhibitrice (C.M.I.) et de Concentration Inhibitrice Partielle (C.I.P.) ; méthode des stries ;

Extrait de *Skeletonema costatum*

Bactéries	C.I.P.	C.M.I.
<i>Salmonella cholerae suis</i>	1/250	(+ de 1/10)
<i>Salmonella typhi</i> murium LT2	(+ de 1/10)	(+ de 1/10)
<i>Salmonella bovis</i> morbificans	1/50	1/10
<i>Salmonella gallinarum</i> pullorum	1/50	1/10
<i>Salmonella maleagris</i>	1/100	1/10
<i>Staphylococcus aureus</i> 809 P	1/10.000	1/5.000

Partielles obtenues (1/1000) et 1/800).

Signalons cependant que la souche récemment isolée d'*Asterionella notata* que nous avons testée lors de cette expérimentation, n'a pas révélé de propriétés antibiotiques.

Cette expérimentation montre que les Salmonelles peuvent être sensibles aux substances antibactériennes synthétisées par les Diatomées marines. Notons cependant que cette sensibilité des Salmonelles est plus faible que celle des *Staphylococcus aureus* vis-à-vis des mêmes extraits phytoplanctoniques.

RESUME

Parmi quinze espèces phytoplanctoniques testées pour leurs propriétés antibactériennes vis-à-vis de différentes souches de Salmonelles, deux espèces (*Chaetoceros teres* et *Skeletonema costatum*) ont montré une activité antibiotique importante.

SUMMARY

Fifteen phytoplankton species are tested to know antibacterial properties against different stock cultures of Salmonella, two species (*Chaetoceros teres* and *Skeletonema costatum*) showed an important antibiotic activity.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) KETCHUM B.H., CAREY C.L. and BRIGGS M., 1949 - Preliminary studies on the viability and dispersal of Coliforms bacteria in the sea. *American Assoc. for the Advancement of Science*, pp. 64-73
- (2) SAZ A.K., WATSON S., BROWN S.R. and LOWERY D.L., 1963 - Antimicrobial activities in marine waters. I. Macromoleculars nature of antistaphylococcal factor. *Limnol. and Oceanogr.* 8, pp. 63-67
- (3) AUBERT M., 1966 - Le comportement des bactéries terrigènes en mer. Relations avec le phytoplancton. *Thèse*. Marseille, 285 p.
- (4) AUBERT M., 1970 - Théorie générale de l'auto-épuration de la mer. *Scientia*, vol. 105, n° 693-694, série VII, pp. 7-57
- (5) ROSENFELD D.W. and ZOBELL C.E., 1947 - Antibiotic production by marine microorganisms. *Journal of Bact.*, 54, pp. 393-398
- (6) KRASSIL'NIKOVA E.N., 1961 - Propriétés antibiotiques des micro-organismes marins isolés à différentes profondeurs. *Mikrobiologia*, 30 - pp. 635-791
- (7) BUCK J.D. and MEYERS S.P., 1965 - Antiyeast activity in marine environment- I. Ecological considerations. *Limn. and Oceanogr.*, 10(3) pp.
- (8) GAUTHIER M., 1970 - Propriétés antibactériennes des micro-organismes marins. *Thèse*. Sciences, Nice. 116 p.
- (9) SIEBURTH J. Mc N., 1964 - Antibacterial substances produced by marine algae. Developments in industrial microbiology. *Ann. Ins. of Biol. Sci. Wash. D.C.* pp. 124-134
- (10) BURKHOLDER P.R. and BURKHOLDER L.M., 1958 - Antimicrobial activity of horny corals. *Science*, 127, pp. 1174-1175
- (11) PRESCOTT C., LI B., JAHNES W.G. and MARTINO E.C., 1966 - Antimicrobial agents from Mollusks. *N.Y. Acad. of Sci.*, ser. II 24(5) pp. 504-509
- (12) NIGRELLI R.F., JAKOWSKA S. and CALVENTI I. - Ectyonin, an antimicrobial agent from the sponge *Microciona prolifera*. *Zoologica*, 44(4), pp. 173-176
- (13) AUBERT M., AUBERT J. et GAUTHIER M., 1968 - Pouvoir auto-épurateur de l'eau de mer et substances antibiotiques produites par les organismes marins. *Rapp. Gén. IIIe Coll. Intern. Oceanogr. Méd.* in : *Rev. Intern. Océanogr. Méd.*, Tome X, pp. 137-208
- (14) AUBERT M., VAISSIERE R., AUBERT J., LE PECHON J.C., VELLARD M.P., 1964 - Antibiotogrammes obtenus par des extraits planctoniques sur des germes d'origine entérique. *Bull. Acad. Nat. de Méd.*, Tome 140, n° 25-26, pp. 507-513
- (15) DUFF D.C.B., BRUCE D.L. and ANTIA N.D., 1966 - The antibacterial activity of marine planktonic algae. *Canad. Journ. of Bact.*, Vol. 12, pp. 877-884
- (16) AUBERT M. et GAUTHIER M., 1967 - Origine et Nature des substances antibiotiques présentes dans le milieu marin. 8e Partie : Etude systématique de l'action antibactérienne d'espèces phytoplanctoniques vis-à-vis de certains germes telluriques aérobies. *Rev. Intern. Oceanogr. Méd.*, Tomes VI-VII, pp. 43-52

- (17) AUBERT J., PESANDO D. et THOUVENOT H., 1968 - Action antibiotique d'extraits planctoniques vis-à-vis de germes anaérobies. *Rev. Intern. Oceanogr. Méd.*, Tome X, pp. 259-265
- (18) BUTTLAUX R. et LEURS T., 1953 - Survie des Salmonelles dans l'eau de mer. *Bull. Acad. Nat. Med.*, 137, pp. 127-136
- (19) GEVAUDAN P., TAMALET J. et GAY R., 1957 - Etude de la survie comparée d'*Escherichia coli* et de *Salmonella typhi* dans l'eau de mer du littoral méditerranéen. *Annales de l'Institut Pasteur de Lille*, vol. IX, pp. 128-137
- (20) BEARD P.J. and MEADOWCROFT N.F., 1939 - Survival and rate of death of Intestinal bacteria in sea water. *Amer. Journ. Publi. Health*, 25, pp. 1023
-

