

BULLETIN FRANÇAIS DE PISCICULTURE

QUARANTE NEUVIEME ANNEE

N° 265

2^e trimestre 1977

EPIDEMIOLOGIE DE LA FURONCULOSE DES SALMONIDES

II. ETUDE EXPERIMENTALE DE DIVERS FACTEURS MICROBIOTIQUES DE L'ENVIRONNEMENT*

Annie DUBOIS-DARNAUDPEYS

LABORATOIRE CENTRAL DE RECHERCHES VETERINAIRES D'ALFORT
22, rue Pierre-Curie
94700 MAISONS-ALFORT

Ministère de l'Agriculture - Direction de la Qualité - Services Vétérinaires

avec la collaboration technique de
Marie-Hélène ARGENCE, Monique CAPARROS et de Geneviève DEHAND

RESUME

L'antagonisme bactérien dû à la flore d'accompagnement est le seul facteur jouant un rôle dans la dynamique des populations de *A. salmonicida*. L'action lytique des bactériophages ou de *Bdellovibrio bacteriovorus* est inactive sur cette bactérie.

I. - INTRODUCTION

On peut schématiquement diviser la flore bactérienne des eaux douces de surface en deux grandes catégories d'espèces bactériennes le groupe des *Pseudomonas-Achromobacter* et celui des *Flavobacterium*. Mais les *Aeromonas* auxquels appartient *Aeromonas salmonicida* et les Enterobacteries sont faiblement représentés. Leur nombre est nettement inférieur à celui des *Pseudomonas* (de 100 à 1 000 fois).

Les *Pseudomonas* possédant des propriétés antagonistes vis-à-vis d'autres

* Ces travaux ont été présentés dans le cadre d'une thèse de doctorat de l'Université Pierre et Marie Curie, Paris (1976).

germes, il est intéressant d'étudier l'effet de la flore bactérienne sur la survie et la croissance de *Aeromonas salmonicida* (CHINN S.M.F., 1954 - HAMON Y., 1965). D'autre part, les eaux douces renfermant des microprédateurs comme les bactériophages, les *Bdellovibrio bacteriovorus* (STOLP H., STARR M.P., 1963 - STOLP H., 1973) ainsi que les algues et les protozoaires.

Le *Bdellovibrio* est un vibron d'environ 0,3 μm , de long, très mobile, qui parasite d'autres bactéries.

Le comportement de *Aeromonas salmonicida* en présence des autres bactéries, du *Bdellovibrio*, ou du bactériophage est intéressant à suivre du fait du rôle de concurrents potentiels joué par ces 3 éléments pris indépendamment ou collectivement.

II. - MATERIEL ET TECHNIQUES

1. Antagonisme bactérien

Mise en évidence de l'antagonisme au niveau de la culture :

La flore bactérienne d'accompagnement est cultivée sur une membrane de cellophane plaquée sur de la gélose en boîte de Pétri selon la technique de Liu (A. DUBOIS-DARNAUDPEYS, 1977). Après retrait de cette membrane, support du tapis bactérien, une suspension de *Aeromonas salmonicida* est ensemencée sur ce milieu. La culture se développe ou non. Son absence signe la présence de substances antagonistes diffusant dans la gélose et exerçant leur action inhibitrice vis-à-vis de *A. Salmonicida*.

Les résultats sont lus après 4 jours d'incubation à + 22°C ou + 14°C et après 7 jours d'incubation à + 4°C.

Mise en évidence de l'antagonisme au niveau des sédiments :

Des membranes de porosité 0,45 μm (Millipore) sont appliquées sur une couche de vase étalée au fond de boîtes de Pétri. Lorsque les membranes sont imbibées, on place en leur centre 2 gouttes de suspension de *A. salmonicida* en eau physiologique.

Les boîtes sont incubées à 4 températures (+ 22°C, + 14°C, + 10°C, + 4°C). Au bout de 6, 9, 16, 22 jours d'incubation, on réalise des calques sur gélose, les mêmes opérations sont effectuées sur des boîtes témoins préparées avec de la vase stérilisée ; l'absence de culture par rapport aux boîtes témoins signe l'effet inhibiteur.

Mise en évidence de l'antagonisme au niveau des eaux sans concentration de la flore bactérienne :

Des eaux de rivière stérilisées ou non, sont additionnées d'une suspension bactérienne de *A. Salmonicida* seul ou associé à un *Pseudomonas* et incubées à + 26°C pendant 48 heures avant de procéder au réisolement de la bactérie.

L'antagonisme bactérien n'a pas été recherché au niveau de la végétation.

2. Bactériophagie

Il faut signaler que les bactériophages de *A. salmonicida* sont sans action sur les *Pseudomonas* et *Vibrio*. A l'intérieur du genre *Aeromonas*, l'activité lytique se traduit par des lyses de certains *A. hydrophila*. Par contre, aucun bactério-

phage ne s'est montré actif vis-à-vis de 6 souches de *A. shigelloïdes* (POPOFF et VIEU, 1970, 1971).

La recherche semi-quantitative est effectuée à partir de prélèvements d'eau, de végétation, de sédiment (24 fois 2 g) que l'onensemence en *A. Salmonicida* (DUBOIS-DARNAUDPEYS, 1977) puis que l'on inactive par le chloroforme après 48 h à 26°C.

Une boîte de Pétri renfermant une culture confluyente de bactérie indicatrice est ensemencée par 1 ôse du surnageant précédent (en triple exemplaire) puis incubée 48 h à + 26°C. On notera les zones de lyse.

A + 22°C, + 10°C + 4°C, on étudie la multiplication bactériophagique en eau peptonée et en eau distillée. Des résultats semi-quantitatifs sont obtenus en employant la technique ci-dessus.

3. Mise en évidence de l'action lytique du *Bdellovibrio*

La présence de *Bdellovibrio* est recherchée dans l'eau, les dilutions au 1/10 de sédiment et de broyat végétal provenant de la rivière. Chacun de ces échantillons est divisé en 2 lots : l'un est enrichi en *E. coli* (environ 10⁸ bactéries/ml d'échantillon) qui est un stimulant de la bactériolyse mais dont un excès inhibe cette dernière (GUELIN, 1973), l'autre lot est laissé tel quel.

Après une incubation de 6 jours à + 22°C, les échantillons positifs, c'est-à-dire devenus limpides, et pour la végétation ceux qui ne présentent pas de voile de *Pseudomonas*, sont divisés en 2 fractions dont l'une est traitée par le chloroforme. Celui-ci détruit les bactéries mais non les bactériophages. Puis, l'onensemence de nouveau avec *E. coli*. Les échantillons positifs doivent rester troubles ; les *Bdellovibrio* ayant été tués par le chloroforme. Si l'on note un éclaircissement, il s'agit d'une lyse bactériophagique.

III. - RESULTATS

1. Antagonisme bactérien

Au niveau de la culture, quelle que soit la température, *A. salmonicida* est inhibé totalement.

Dans les sédiments, les résultats varient selon la température. A + 4°C, ce germe pousse très bien, en moins de 4 jours sur les échantillons de vases stérilisées, sur les autres la culture débute lentement et après 9 et 11 jours elle semble moins bonne bien qu'on ne note pas d'antagonisme. L'essai étant semi-quantitatif, on ne peut mesurer exactement la différence des croissances bactériennes. Un contact sédiment-milieu de culture d'une durée minimum de 48 h est nécessaire à la manifestation de l'antagonisme.

A + 10°C, *A. Salmonicida* croît très faiblement par rapport aux témoins. L'activité antagoniste de la flore des sédiments débute au voisinage de cette température.

Enfin, à + 14°C et + 22°C, des proliférations bactériennes viennent parfois masquer la culture de *Aeromonas*. Son absence peut être due à l'effet antagoniste des *Pseudomonas* se multipliant sur le contour du disque et de ce fait présents sur la gélose de contrôle ou bien être due à l'antagonisme direct sédiment-*A. salmonicida*. Les résultats expriment seulement la présence du

germe de façon qualitative. On la retrouve respectivement 13 fois sur 18 et 4 fois sur 13 au bout de 9 et 16 jours à + 14°C. De même à + 22°C la bactérie est présente 11 fois sur 11 après 4 jours, 4 fois sur 13 après 9 jours et 2 fois sur 13 le 16^e jour.

Dans les eaux, on retrouve *A. salmonicida* excepté dans le cas où un *Pseudomonas* a été ajouté à de l'eau non stérilisée.

Dans l'eau la flore bactérienne d'accompagnement ne possède pas d'action antagoniste vis-à-vis de la bactérie après 48 h de contact à + 26°C.

2. Bactériophagie

La mise en évidence des bactériophages dans les eaux, la végétation et les sédiments de la Juine, a été observée pendant 2 ans à raison d'un contrôle bimensuel, le pourcentage de positivité de ces examens est compris entre 0-20 % excepté pendant les rares périodes d'épizootie où il peut atteindre 80-100 %.

L'intensité de la multiplication bactériophagique est liée à celle du germe indicateur. L'optimum se situe à + 26°C puis décroît de part et d'autre de cette température.

On n'observe aucune différence entre les résultats obtenus en eau peptonée ou en eau distillée.

A + 4°C, après 5 jours et 12 jours, on constate d'abord une lyse confluyente puis une lyse totale. A + 10°C, après 3, 5, et 9 jours, cette dernière est totale puis on dénombre 80 UFP et 40 UFP (unité formant plaque). A + 22°C après 6 h., 48 h. et 3 jours, on note une lyse confluyente, puis totale.

3. Mise en évidence de l'action lytique du *Bdellovibrio bacteriovorus*

Le *Bdellovibrio* est présent dans tous les échantillons d'eau, de végétation et de sédiment, mais il n'est capable d'exercer son action lytique que lorsqu'on enrichit en *E. coli*.

Sur le terrain, il faut des eaux fortement polluées par des bactéries telluriques pour que la bactériolyse ait lieu (GUELIN, A. ; CABIOCH, L. - 1970-1972). Le *Bdellovibrio* actif expérimentalement sur *A. salmonicida* est sans effet notable dans les conditions naturelles observées sur la rivière.

IV - DISCUSSION

A la fin du siècle dernier l'école pastorienne avait signalé l'élaboration de substances antagonistes par *Pseudomonas aeruginosa*. Depuis, on a mis en évidence l'élaboration de substances agissant sur les protistes par *Pseudomonas fluorescens* (OLITSKY, 1781 ; FROST, 1904 ; LEWIS, 1929 ; KLINGE, 1959, dans DUMAS, 1951). Un certain nombre de souches isolées des eaux et du sol se sont révélées, elles aussi, productrices de substances antibiotiques.

C'est pourquoi la position de VIALIER et CHASSIGNOL (1970), qui n'ont pas isolé dans les eaux naturelles de substances bactéricides, à une concentration suffisante pour amener une destruction rapide des bactéries, demandait à être vérifiée.

L'antagonisme flore bactérienne totale-*Aeromonas salmonicida* n'a pas été mis en évidence dans l'eau lors des diverses expérimentations relatées dans cet article. Quant aux bactériophages, les résultats exposés rejoignent la thèse de divers auteurs (LEPINE, 1971 ; GUELIN, 1950-1952). A savoir que pendant de nombreuses années, on a pensé que les bactériophages jouaient un rôle actif, voire prépondérant dans l'épuration des eaux et surtout dans la régression puis la disparition des bactéries. A la lumière des données récentes, il semble que leur importance soit minime, sinon négligeable : les bactériophages apparaissent en même temps que les bactéries et disparaissent avec elles lorsque celles-ci sont capturées par les protozoaires prédateurs (LEPINE, 1971). Par contre le rôle du bactériophage comme facteur indirect d'épuration des eaux n'est pas négligeable. Dans des conditions favorables le bactériophage fixé sur la bactérie peut se développer à ses dépens (GUELIN, 1950, 1952).

Les phages ne jouent pas de rôle significatif dans la dynamique des populations de *A. Salmonicida*. Ils témoignent simplement de la présence du germe et des fluctuations des effectifs traduits par leurs propres fluctuations. Au niveau des sédiments, on ne note pas de différence quantitative par rapport à la présence de bactériophages dans l'eau.

La présence du *Bdellovibrio* a été confirmée dans ce travail, mais son action lytique est très limitée dans les conditions naturelles observées.

Des facteurs microbiotiques limitants envisagés, antagonisme dû à la flore bactérienne d'accompagnement, action bactériophagique des bactériophages, action bactériolytique de *Bdellovibrio*, seul le premier phénomène joue un rôle sur la dynamique des populations de *A. salmonicida*.

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur G. TUFFERY et Mademoiselle A.M. BAUDOY du Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires d'Alfort pour leurs suggestions et critiques dans la réalisation de ce travail.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CHINN S.M.F., 1954. An antibiotic producing bacterium of the germs *Pseudomonas*. *Canadian journal of microbiology*, 1 (2), 118-124.
- DUBOIS-DARNAUDPEYS A., 1977. Epidémiologie de la furonculose des Salmonidés. I. Etude expérimentale de divers facteurs abiotiques de l'environnement *Bull. Fr. Pisc.* 264, 121-127.
- DUMAS J., 1951. Bactériologie médicale. Editions médicales Flammarion, 470 m - 470 n.
- GUELIN A., 1950. Survie du bacille typhique Vi dans l'eau. *Ann. Inst. Pasteur.* 78 (1), 78.
- GUELIN A., 1950. Sur la présence du bactériophage *Perfringens* dans les eaux et son rôle dans l'épuration des eaux stagnantes. *Ann. Inst. Pasteur*, 79 (4), 447-453.

- GUELIN A., 1952. Application de la recherche des bactériophages à l'étude des eaux polluées. I. La survie des entérobactéries dans les eaux - II. Bactériophages des eaux à grandes et petites plages. *Ann. Inst. Pasteur*. 82 (1), 78-89.
- GUELIN A., CABIOCH L., 1970. Sur l'utilisation du phénomène de bactériolyse spontanée pour la connaissance de l'état sanitaire des eaux douces et marines. *C.R. Acad. Sc. Paris, T. 271, Série B* - 137-140.
- GUELIN A., CABIOCH L., 1972. Bactériolyse spontanée et pouvoir bactéricide des eaux douces et marines; isolement d'un nouveau microprédateur, *C.R. Acad. Sc. Paris, T. 274, Série D* - 3317-3319.
- GUELIN A., 1973. Multiplication de l'agent bactériolytique *Bdellovibrio bacteriovorus* et intensité de la bactériolyse en fonction de la densité initiale en bactéries-hôtes, *C.R. Acad. Sc. Paris, T. 276, Série D*-1075-1076.
- HAMON Y., 1965. *Bacteriovorus* et substances analogues. Pathologie. Biologie. *Institut Pasteur*, 13 (15-16 / 17-18), 806-824.
- KLINGE K., 1960. Differential techniques and methods of isolation of *Pseudomonas*. *J. Appl. Bact.* 23 (3), 442-462.
- LEPINE P., GUELIN A., LAMBLIN D., 1971. Le parasitisme bactérien dans les eaux polluées et son rôle dans l'autoépuration. *Bull. Ass. Pharm. Fr. Hydrol.* 6, 7-21.
- POPOFF M., VIEU J.F., 1970. Bactériophages et lysotypie de *Aeromonas salmonicida*. *C.R. Acad. Sc. Paris. 270 série D*, 2219-2222.
- POPOFF M., 1971. Etude sur les *Aeromonas salmonicida*. II. Caractérisation des bactériophages actifs sur les *Aeromonas salmonicida* et lysotypie. *Ann. Rech. Vétér.* 2 (1), 33-45.
- STOLP H., STARR M.P., 1963. *Bdellovibrio bacteriovorus*, a predatory, ectoparasitic and bacteriolytic microorganism. *Antonie van leuwenhock. Tome 29*, 217-218.
- STOLP H., STARR M.P., 1963. A parasite with lytic activity against *Pseudomonas*. *Bacteriol. Proc.*, 47 p. 47.
- VIALLIER J., CHASSIGNOL S., 1970. Survie des germes pathogènes pour l'homme dans les eaux douces courantes et stagnantes. Données expérimentales. Institut Pasteur de Lyon. *Revue France*, 3, 4, 381-394.