

ÉCOLE NATIONALE SUPÉRIEURE VÉTÉRINAIRE

Projet de fin d'études

En vue de l'obtention du
Diplôme de Docteur Vétérinaire

THÈME :

**SUIVI BIO-SANITAIRE D'UNE ZONE D'ELEVAGE
CONCHYLICOLE AU NIVEAU DE BEJAIA : cas des
moules *Mytilus galloprovincialis*. (Lamarch, 1819).**

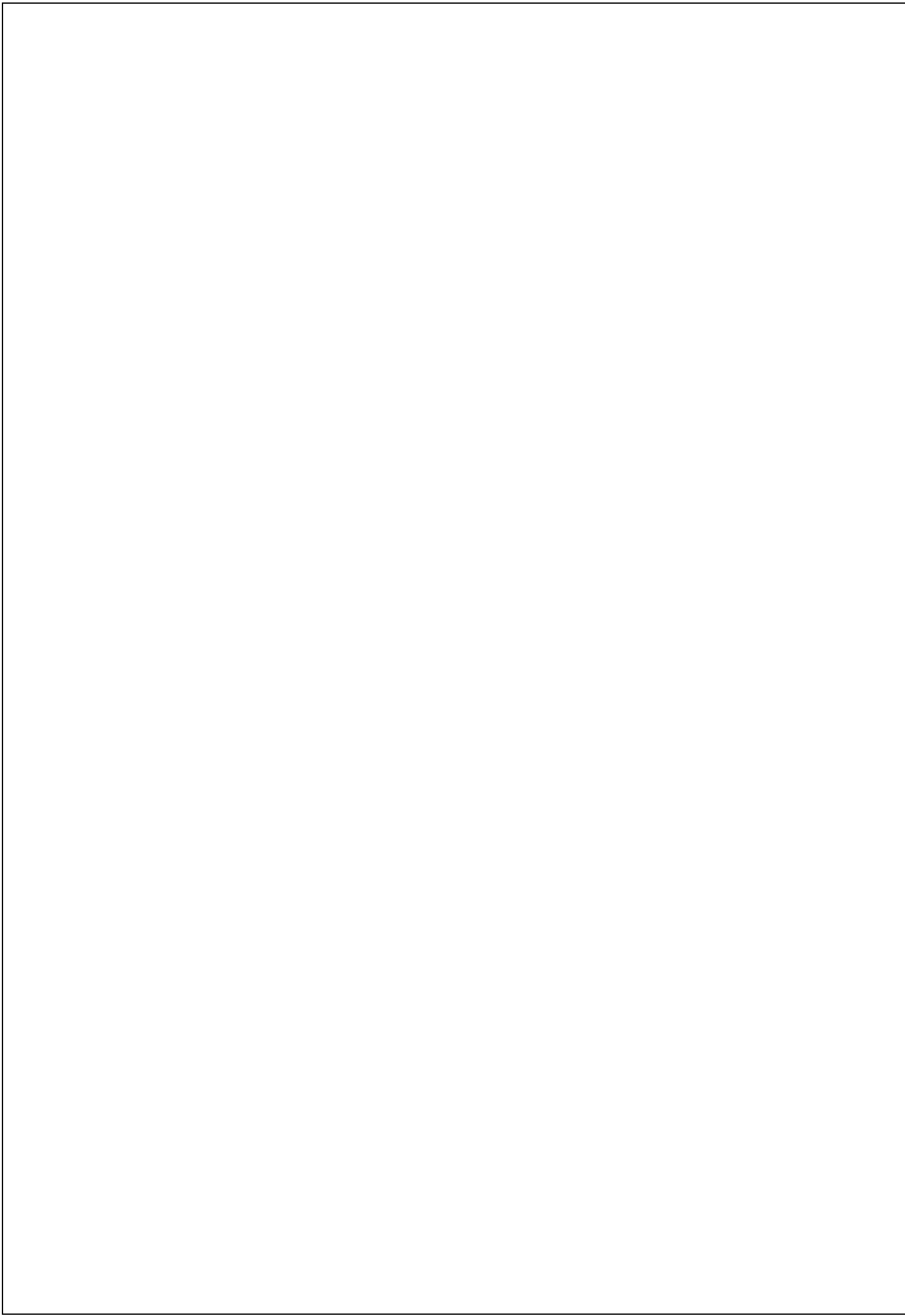
Présenté par : BENDOUMA Youcef.

Soutenu le: 28 /07/2019.

Devant le jury composé de:

- Président : MARNICHE Faiza
- Promoteur : BOUDJNAH Mustafa
- Examineur 1: BAAZIZI Ratiba
- Examineur 2 : DJELOUT Baya

- MCA (Maitre de conférences classe A).
- MCB (Maitre de conférences classe B).
- MCB (Maitre de conférences classe B).
- MAA (Maitre assistante classe A).



Remerciements

Avant tout je remercie ALLAH notre créateur de m'avoir donné le courage la force et la résistance pour terminer mes études

Je remercie mon père et ma mère mes frères, ma chère famille pour les précieux conseils et soutienne

Je tiens à adresser mes vifs remerciements à mon encadreur Monsieur BOUDJNAH Mustafa d'avoir accepté de diriger ce travail

Je tiens à remercier tous les employés de la station expérimentale conchylicole

Je tiens à remercier Mr le directeur et tous les employés du centre national de la recherche et le développement de la pêche et l'aquaculture

Mes vifs remerciements aux membres de jury d'avoir accepté d'honorer par leur jugement notre travail

Finalement, je tiens à exprimer mon gratitude et reconnaissance à toute personne qui a contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail.

Dédicaces

*Je dédie ce petit travail à mon cher Papa et à ma chère
Maman ma Sœur et mes Frères*

*Je dédie ce travail à mon oncle FERHAT Khaled et
toute sa famille*

*A mon oncle MERJOUHA Salah et toute sa
famille*

A toute ma Famille BENDOUMA.

Youssef

RESUME :

Une des activités aquaculture peu étendue en Algérie est la conchyliculture qui est l'élevage des mollusques, l'élevage de moules ou la mytiliculture est en cours de se développer progressivement pour la commercialisation et la consommation.

Les moules sont des filtreurs naturels de l'eau de mer, qui sont des meilleurs indicateurs de la pollution d'environnement marin soit chimique ou microbiologique, et dans le cadre de préserver la santé des consommateurs, un suivi bio sanitaire est très nécessaire qui contrôle la qualité chimique et microbiologique des zones d'élevage conchylicole, les analyses s'effectuent sur l'eau de mer et le produit destiné à la consommation.

Dans notre travail on a fait la partie microbiologique pour déterminer la qualité des moules et le classement de la zone d'élevage au niveau de la wilaya du Bejaia.

Listes des figures

Figure	Titre	Page
01	Les sources de contamination microbiologique	02
02	Les sources de contamination chimique	03
03	Air de répartition géographique de <i>Mytilus galloprovincialis</i> selon (Hosmi, 1978).	04
04	exigences réglementaires microbiologique du classement de zone (Règlement (CE) n° 854/2004, arrêté du 06/11/2013)	06
05	situation géographique du village SAKET	07
06	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarch, 1819).	08
07	Morphologie de <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarch, 1819).	09
08	Anatomie de <i>Mytilus galloprovincialis</i> (Lamarch, 1819).	09
09	coupe de la coquille	11
10	face interne des valves (de W. Deconinck, 1971)	11
11	La conchyliculture .	15
12	la mytiliculture sur bouchots	16
13	la Mytiliculture en suspension(FAO.2009 Valerio Crespi and Michael New)	17
14	la conchyliculture à plat (French shellfish culture.1979)	17
15	la conchyliculture en surélevé (Daney Charles 1995)	18
16	Préparation des dilutions	21
17	Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (Test présumptif)	22
18	Identification des coliformes thermotolérants et E. coli présumptif dans l'eau (test confirmatif).	23
19	Préparation des dilutions des échantillons à analyser	24
20	Recherche et dénombrement des coliformes totaux chez les bivalves (test présumptif).	25
21	Recherche des coliformes thermotolérants et d'Escherichia coli présumptif chez les bivalves, (test confirmatif).	26
22	Recherche des Salmonelles	29
23	isolement de colonie suspecte et réalisation de suspension bactérienne (Biomérieux, 2006)	30
24	Inoculation de la galerie API 20 E (Biomérieux, 2006).	31
25	Variations spatio-temporelles des teneurs en Coliformes fécaux relevées dans l'eau de mer.	33
26	Variations spatio-temporelles des teneurs en Streptocoques relevées dans l'eau de mer.	34
27	Variations spatio-temporelles des teneurs en Escherichia coli relevées dans l'eau de mer.	35

Listes des figures

28	Variations spatio-temporelles des teneurs en Les Coliformes fécaux relevées dans les bivalves.	36
29	Variations spatio-temporelles des teneurs en les Salmonelles relevées dans les bivalves.	37
30	Variations spatio-temporelles des teneurs en Escherichia coli relevées dans les bivalves.	38

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	Le calcul du nombre probable de germes (exemple d'échantillon d'eau).	26
02	Le calcul du nombre probable de germes (exemple de la moule)	27
03	résultats pour le site d'élevage sarl-point de moule(Eaux de mer)	32
04	résultats pour le site d'élevage sarl-point de moule	32
05	résultats pour le site d'élevage EURL MOUALEK(Eaux de mer)	32
06	résultats pour le site d'élevage EURL MOUALEK(Moules)	32
07	résultats pour le site d'élevage SARL- SAMSAK(Eaux de mer)	32
08	résultats pour le site d'élevage SARL- SAMSAK(Moule)	32
09	Table de Mac Grady pour 3 séries de 3 tubes (Eau)	47
10	Table de Mac Grady pour 3 séries de 3 tubes (bivalves).	48
11	Normes de la qualité requise des eaux de baignades (directive européenne du 8 décembre 1975, reprise par le décret exécutif n° 91-980 du 20 septembre 1991. J.Off.Comm.Europ et par le décret exécutif N° :93-164 du 10 juillet 1993. JORA N° 46.	48
12	Normes de la qualité des eaux conchyliques (Communauté Européenne, 1991).	49
13	Critères microbiologiques pour les coquillages bivalves (arrêté européen du 23 mars 1993).	50

Liste des symboles

Symboles	Définitions
T°C	Température (en degré Celsius) h Heure mn Minute
O2	Oxygène dissous
G	Gramme
Mg	Milligramme
ml	Millimètre
Cm	Centimètre
BLBVB	Bouillon Lactosé bilié au vert brillant
Fig	Figure
Tab	Tableau
CNEDPA	centre national de la recherche et le développement de la pêche et l'aquaculture

Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des symboles	
Introduction	1

Partie Bibliographique

Chapitre I- Généralités

I-1- suivi bio-sanitaire des zones d'élevage conchylicoles	2
I-1-1- Objectif	3
I-2- Zones d'élevages conchylicoles	4
I-2-1 Ecologie des moules	4
I-2-1-1 Répartition géographique.....	4
I-2-1-2 Répartition bathymétrique.....	5
I 2-2 Classements sanitaires des zones conchylicoles	5
I-2-3 Présentation de la zone d'étude Wilaya de BIJAIA Village SAKET	6
I-3-Présentation de l'espèce Moule de Méditerranée <i>Mytilus galloprovincialis</i>	8
I-3-1-Morphologie et Anatomie	8
I-3-2 Position systématique	12
I-3-3-Pathologie	12
I-3-3-1- Virus	12
I-3-3-2 Procaryotes	13
I-3-3-3 Champignons	13
I-3-3-4 Protozoaires	13
I-3-3-5 Métazoaires	14
I-3-3-5-1Trématodes	14
I -3-3-5-2Annélides ou les Nématodes	14

I-4- généralité sur la conchyliculture	14
I-4-1 Conchyliculture	14
I-4-2- Mytiliculture	15
I-4-2-1 Modes d'élevage	15
I-4-2-1-1 Elevage sur bouchots	15
I-4-2-1-2 Elevage en suspension	16
I-4-2-1-3 Elevage plat	17
I-4-2-1-4 Elevage en surélevé	18

Partie expérimentale

Chapitre II- Matériel et méthodes

II-1-Analyse microbiologique de l'eau et des moules	19
II-1-1- Stratégie d'échantillonnage	19
II-1-1-1- Prélèvement de l'eau	19
II-1-1-2- Récolte des bivalves	19
II-1-2- Analyse bactériologique des échantillons	20
II-1-2-1- Préparation des échantillons	20
II-1-2-2 Analyse bactériologique de l'eau :.....	20
II-1-2-2-1 Préparation des dilutions décimales	20
II-1-2-2-2 Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et recherche d'Escherichia col	21
II-1-2-3 Analyse bactériologique des bivalves	24
II-1-2-3-1 Préparation des dilutions décimales	24
II-1-2-3-2 Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et recherche d'Escherichia coli	25
II-1-2-3-3 Recherche de Salmonella (eau et bivalves).....	27

Chapitre III: Résultats et discussion

III-1-Résultats :.....	32
III-1-1- Résultats pour le site d'élevage SARL-POINT DE MOULE.....	32
III-1-2- Résultats pour le site d'élevage EURL MOUALEK.....	32
III-1-3- Résultats pour le site d'élevage SARL- SAMSAK.....	32
III-2-Discussions.....	33
III-2-1- Distributions des germes indicateurs de pollution fécale dans l'eau et les bivalves.	33
III-2-1-1 Distribution des germes dans l'eau de mer.	33
III-2-1-1-1 Coliformes fécaux	33
III-2-1-1-2 Streptocoques Totaux	34
III-2-1-1-3 Escherichia coli	35
III-2-1-2- Distribution des germes chez les moules.....	36
III-2-1-2- 1 Les Coliformes fécaux	36
III-2-1-2- 2 Les Salmonelles	37
III-2-1-2- 3 Escherichia coli	38
III-3-Décision et classement de la zone d'élevage conchylicole SAKET.	39
Conclusion	40
Références bibliographiques.....	41
Annexes.....	45

Introduction :

La conchyliculture est une activité d'aquaculture peu étendue en Algérie, mais qui semble actuellement se développer progressivement, en particulier l'élevage des moules (mytiliculture).

Cette activité dépend, du choix des sites aptes pour l'installation des projets conchylicoles est qui est un facteur primordial. Ces sites doivent réunir une richesse adéquate en matière de plancton (qualité et concentration), un bon état de salubrité (microbiologique, physico-chimiques, absence de pollution, absence de plancton producteur de bio-toxines) et des caractéristiques physiques précises (profondeur, courants, etc.).

Actuellement, les ventes de moules sont réalisées par les aquaculteurs sans aucun contrôle sanitaire (un autocontrôle est parfois opéré pour la microbiologie). Cette situation est dangereuse pour le consommateur, il apparaît nécessaire de mettre en place un contrôle vétérinaire permettant de vérifier la qualité des produits et de fournir aux conchyliculteurs un agrément sanitaire pour la commercialisation.

considérant les ventes actuelles et les prévisions probables (environ 2000 tonnes à fin 2018) il apparaît absolument nécessaire d'implanter un contrôle provisoire permettant de juger de la qualité des produits pour les consommateurs et autoriser officiellement les aquaculteurs à vendre leurs produits. Dans ce cadre le CNRDPA a collaboré à La mise en place d'un suivi pour un classement des zones de production.

Notre travail s'inscrit dans cette dynamique, et concerne le suivi bio-sanitaire des élevages de la wilaya de Bejaia.

Le but est de déterminer la qualité du milieu de production au niveau de la wilaya de Bejaia.

I-1- Suivi bio-sanitaire des zones d'élevage conchylicoles

Le suivi bio-sanitaire est la surveillance continue et le contrôle de contamination bactériologique (fig 1) ou chimique (fig 2) des zones d'élevages conchylicoles, il est généralement fondée sur des tests bactériologiques d'échantillons d'eau et de moules, des bactéries indicatrices de contamination fécale (coliformes fécaux ou E. coli) sont le but de la recherche.



Figure 1 : Les sources de contamination microbiologique (Ifremer Juin 2017).



Figure 2 : Les sources de contamination chimique (Ifemer Juin 2017).

I-1-1- Objectif

La qualité des eaux dans les zones conchylicoles est régulièrement contrôlée par l'administration, pour garantir la qualité des coquillages destinés à la consommation humaine.

Les contrôles portent principalement sur la teneur des eaux en bactéries *E. coli*, qui sert d'indicateur de leur contamination fécale. Sont aussi pris en compte la présence de divers contaminants chimiques, organiques et métalliques (par exemple des métaux lourds comme le plomb ou le mercure).

Les résultats obtenus suite à ces contrôles sur la qualité de l'eau sont traduits par un classement bio-sanitaire en zones de salubrité.

I-2- zones d'élevages conchylicoles

Dans cette partie ; nous allons exposer l'écologie, classements sanitaires des zones conchylicoles, Présentation de la zone d'étude Wilaya de BJAIA Village SAKET,

I-2-1 Ecologie des moules

I-2-1-1 Répartition géographique

Mytilus galloprovincialis a une large répartition dans le monde. Elle est décrite pour la première fois comme une espèce méditerranéenne (Lubet, 1973). Cependant, on la trouve aussi sur les côtes sud-ouest de la Mer Noire, sur les côtes espagnoles, portugaises et même en Amérique du nord, en Californie et sur les côtes chinoises (Mac Donald et Koehn, 1988). De plus, elle a été recensée en Australie, en Nouvelle Zélande, en Tasmanie, au Japon (Mac Donald et al, 1991) et en Afrique du sud (Beaumont et al, 1989). Là encore, selon Gosling (1984), *Mytilus galloprovincialis* est présente également dans l'océan Atlantique sur les côtes françaises, britanniques et irlandaises à des proportions variables avec *Mytilus edulis*. Sur les côtes algériennes, elle cohabite avec l'espèce *Perna perna* et forme des bancs naturels, dans des zones assez agitées (Abada-boudjema et al, 1981 ; Boukhroufa, 1987)(Fig.3).

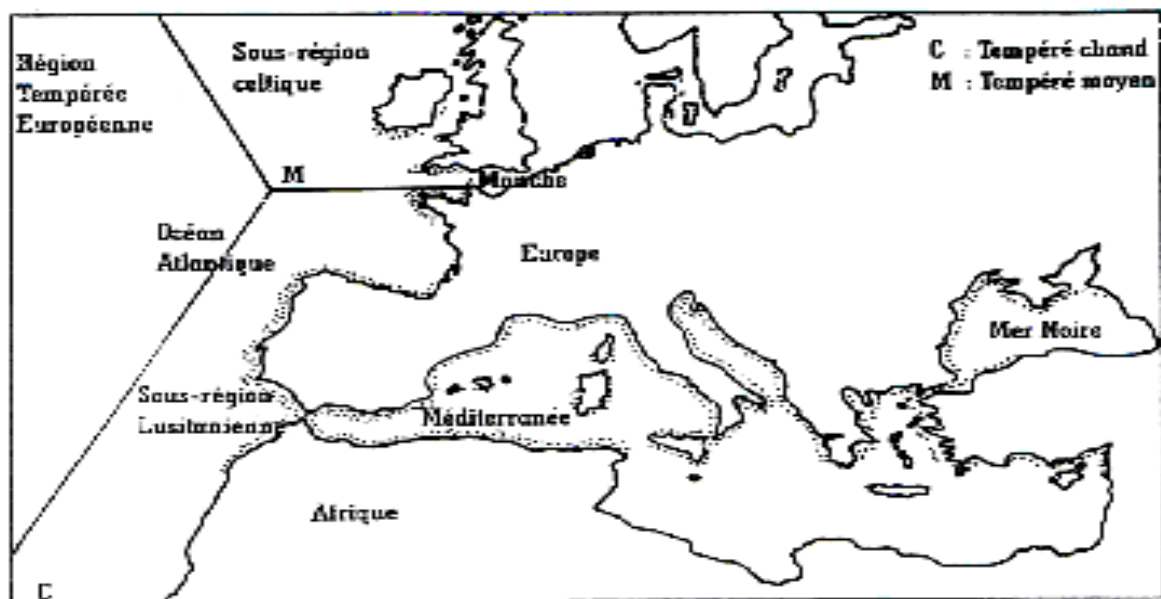


Figure 03: Aire de répartition géographique de *Mytilus galloprovincialis* selon (Hosmi, 1978).

I-2-1-2 Répartition bathymétrique

Fixée par son byssus sur des fonds très variés durs (rocheux, graveleux) ou même meubles (sableux, vaseux), dans la zone littoral et à faible profondeur. Forme souvent des communautés denses (Poutiers, 1993) ; donc elle subit les changements extrêmes des conditions environnementales (température, salinité, nourriture, exposition à l'air,...). La limite supérieure de la distribution de la moule dans la zone intertidale serait principalement déterminée par la durée d'exposition à l'air et l'importance de la dessiccation aux quelle, elle est soumise. On la retrouve exceptionnellement jusqu'à des profondeurs atteignant 20m et plus (Seed, 1976) in (Benchaira et al, 1999).et même 30 à 40m (mer baltique) (Quero et al, 1998).

I 2-2 Classements sanitaires des zones conchyloles

Le classement des zones conchyloles peut se faire selon la finalité recherchée en fonction de certains paramètres bactériologiques et chimiques du milieu et en fonction de la destination des coquillages qui y sont récoltés,

- Trois buts de classement ont cours :
 - 1- Un classement pour la protection de l'environnement.
 - 2- Un classement pour la protection de la santé des mollusques.
 - 3- Un classement pour la protection de la santé des consommateurs.

Les zones de production de coquillages, gisements naturels et zones d'élevage, sont définies par des limites géographiques précises et classées en quatre catégories (A, B, C) (fig4) , par ordre décroissant de salubrité (zone A : les coquillages peuvent être récoltés pour la consommation humaine directe, zone B : commercialisation à précéder d'une purification préalable ou d'un reparcage dans une zone de qualité A prévue à cet effet, zone C : commercialisation interdite. Ce classement initial, qui fait l'objet d'une décision des services vétérinaires et de la pêches, est déterminé à partir d'une étude de zone ayant pour objet d'estimer la qualité de la zone sur la base des paramètres microbiologiques (*Escherichia coli* dans les coquillages vivants) et chimiques (plomb, mercure, cadmium) suivant les seuils définis par les réglementations nationales.

Le dispositif de surveillance régulière vérifie que le niveau de contamination de chaque zone de production reste conforme au classement défini dans les autorités compétentes et dépistent les épisodes inhabituels de contamination (Fig.4).

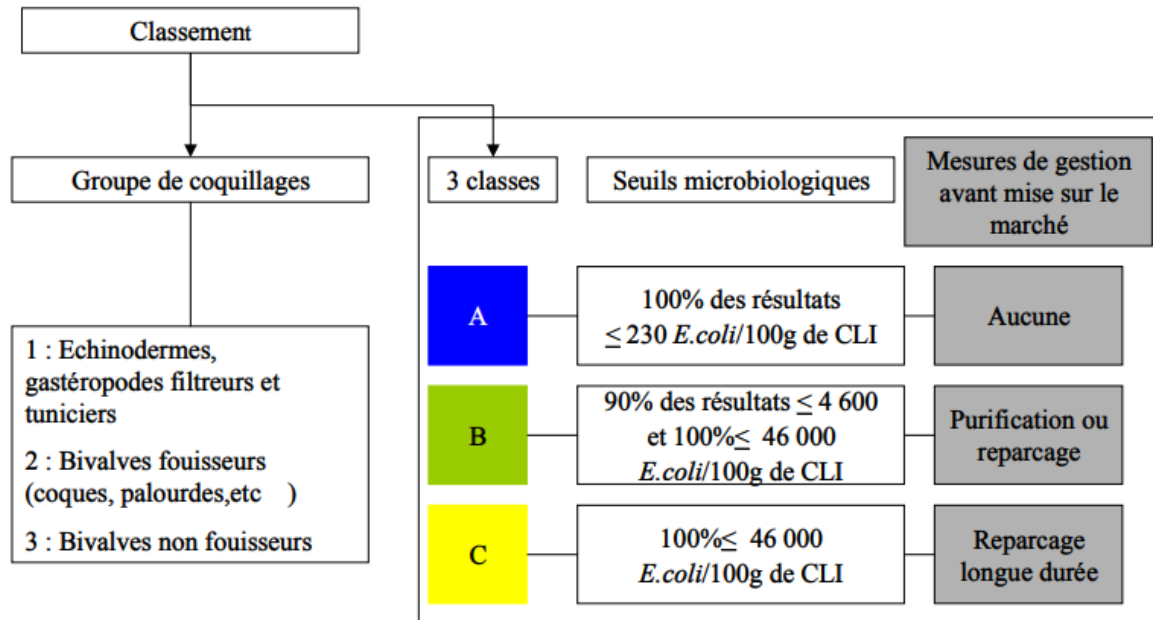


Figure 4 : exigences réglementaires microbiologique du classement de zone (Règlement (CE) n° 854/2004, arrêté du 06/11/2013)

I-2-3 Présentation de la zone d'étude Wilaya de BIJAIA Village SAKET

Bejaïa doit son existence à son site portuaire remarquable qui fait également sa prospérité. Elle est située dans une baie en faucille protégée de la houle des vents du large (orientés nord-ouest) par l'avancée du Cap Carbon (à l'ouest de la ville). La ville est adossée au mont du Gouraya situé dans une position nord-ouest. Ce site portuaire, dans l'une des plus belles baies du littoral maghrébin et méditerranéen, est dominé à l'arrière-plan par les hautes montagnes du massif des Babors. Un autre avantage est que la ville est le débouché de la vallée de la Soummam, un couloir géographique orienté sud-ouest. Cependant, depuis l'époque où la ville fut une capitale, il existe un divorce entre la ville et la région (Kabylie) lié à la difficulté de s'assurer un hinterland. À une échelle macro-régionale, la ville est dos à la région : sa position à l'extrémité de la Soummam la place à l'interface entre Grande et Petite Kabylie. Mais ces deux ensembles sont renfermés sur eux-mêmes et se cherchent des

capitales intérieures (Tizi-Ouzou, Akbou, Kherrata...) en se détournant du littoral. La ville possède en quelque sorte un faible enracinement local ; les proximités rurales de la ville se limitent à 4 ou 5 communes. À l'échelle micro-régionale, Béjaïa est le débouché d'une Algérie médiane, allant d'Alger à Skikda, déversoir des Hauts-Plateaux et port d'approvisionnement de 2 millions de personnes. Mais la liaison est complexe : au sud-est les échanges avec Sétif ne se font qu'à travers les gorges escarpées de Kherrata ; une autre voie emprunte la Soummam, puis à l'est les Portes de Fer et la remontée vers Bordj Bou-Arredj, c'est ce chemin qui est emprunté par la route nationale et la voie ferrée. Ces contraintes topographiques font que, malgré son fort dynamisme, la ville voit une partie des échanges lui échapper sur ses aires d'influences est et ouest. Le village de SAKET Ce village se situe à l'ouest dans la wilaya (département) de Bejaïa près du parc national de Gouraya, et à 3 kilomètres de la plage de Boulimat. Il compte une population d'environ 1000 habitants et près de 50 000 en saison estivale. Sa nature sauvage, sa belle plage de cailloux et ses eaux cristallines participent à son attrait. Saket est à environ 20 minutes de voiture de Bejaïa via la RN 24 (Fig.5).



Figure 5 : situation géographique du village SAKET

Deux projets existants et en production, dont un plutôt orienté pour la production d'huîtres, et un projet en cours de montage.

- 1- L'établissement Samsac comporte deux filières avec une production moyenne de moules escomptée de 10 tonnes, Ce dernier projet semble être développé par un

investisseur (M. Boudeza) et possédant une capacité importante. Croissance des huîtres plutôt intéressante : T6 mis en place en Avril – En septembre 15 à 20% d’huîtres ayant atteint la taille de 8-9cm et 40% à 5-6cm.

- 2- L’entreprise de Monsieur Moualek comporte une filière de 200 m et une production est prête à être commercialiser (environ 10 t).

I-3-Présentation de l’espèce : Moule de Méditerranée *Mytilus galloprovincialis*

L’aire de répartition de la moule de Méditerranée s’étend de la Norvège à la mer Méditerranée. Son habitat est identique à celui de la moule commune, toutefois elle affectionne les zones rocheuses (Fig.6).



Figure 6 : *Mytilus galloprovincialis* (Lamarch, 1819).

I-3-1-Morphologie et Anatomie :

➤ Aspect extérieur :

La coquille est plus ou moins renflée, et possède une extrémité pointue et une arrondie, elle comprend aussi deux valves droite et gauche égales. La couleur est généralement bleue noir, peut toute fois être brune voir jaune (Quero et al, 1998).

Les deux valves sont unies par un ligament situé le long de la charnière dorsale. La partie antérieure du mollusque correspond à l’extrémité rétrécie (le crochet) de la coquille. On peut observer à partir du crochet des fines stries concentriques qui sont des stries d’accroissement représentant les étapes de croissance de l’animal (Marteil, 1976), (fig 07). La taille commune de la moule varie entre 5 et 8 cm; avec un maximum de 15cm.

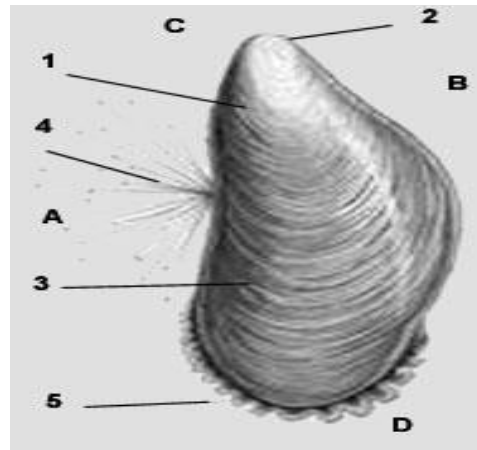


Figure 07: Morphologie de *Mytilus galloprovincialis* (Lamarch, 1819).

A = face ventrale.
B = face dorsale.
C = côté antérieur.
D = côté postérieur.

1 = valve gauche
2 = crochet
3 = strie d'accroissement.
4 = byssus.
5 = bord manteau.

➤ Aspect intérieur :

La coloration de l'intérieur de la valve est bleu ardoisé très foncé ; presque noir vers les bords postérieurs, et presque blanc sous les crochets (Djediati, 1993).

On peut y distinguer les points d'insertions des différents muscles : muscles adducteurs qui relient le corps de l'animal à sa coquille, muscles réacteurs du pied,...etc. L'insertion des fibres musculaires qui relèvent les bords libres du manteau se traduit par une ligne ou impression palléale qui joint les impressions des adducteurs (Marteil, 1976).

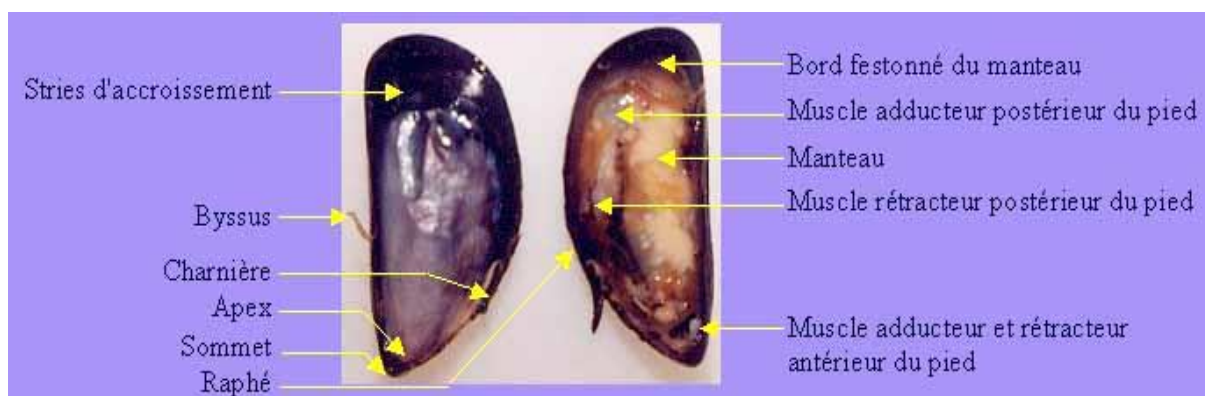


Figure 08 : Anatomie de *Mytilus galloprovincialis* (Lamarch, 1819).

➤ **Structure et composition de la coquille :**

La coquille (fig09) est formée de deux valves ovales et convexes reliées par une charnière. Celles-ci présentent des stries concentriques, témoins de leur croissance. Le côté postérieur est la partie la plus ancienne de la coquille.

La coquille est constituée de trois couches: Une couche extérieure sombre et fine (péριοstracum) protège la coquille contre les acides dissous dans l'eau. Elle est formée d'une protéine, la conchyoline, proche de la chitine présente dans la cuticule des insectes, c'est la même substance qui constitue la charnière.

-Une couche plus épaisse (ostracum), sous la couche extérieure, faite de cristaux prismatiques de carbonate de calcium (calcite) imbriqués dans un réseau protéinique.

-Une couche intérieure de nacre est également constituée de cristaux de carbonate de calcium superposés en plusieurs couches fines et imbriqués dans une trame de conchyoline (aragonite).

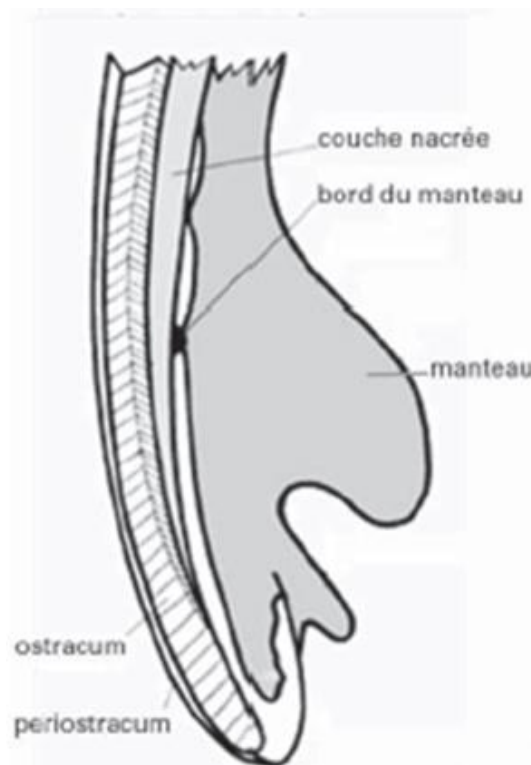


Figure 09: coupe de la coquille (Moules Nature D.CAHEN)

Le bord du manteau sécrète les deux premières couches et assure la croissance en largeur de la coquille, tandis que l'ensemble du manteau produit la couche de nacre et assure la croissance en épaisseur.

Les valves de la coquille sont maintenues fermées par la contraction de muscles : le muscle adducteur antérieur et le muscle adducteur postérieur. Le muscle postérieur est le plus développé. Là où les muscles du manteau se fixent sur la coquille apparaissent des empreintes. L'ensemble de celles-ci est appelé « impression palléale » (Fig.10).

Quand un corps étranger (grain de sable, parasite...) se niche entre la coquille et le manteau, celui-ci recouvre l'impureté de couches de nacre, ce qui provoque un grossissement local de la coquille et éventuellement la formation d'une perle. La perle proprement dite apparaît quand le corps étranger est entièrement entouré de nacre.

La face externe de la coquille est recouverte d'une mince pellicule brune foncée, de nature protéique que l'on peut aisément gratter avec un couteau : le periostracum. (Marteil, 1976). La nature de la coquille est calcaire, composée de 95% de carbonates de potassium.

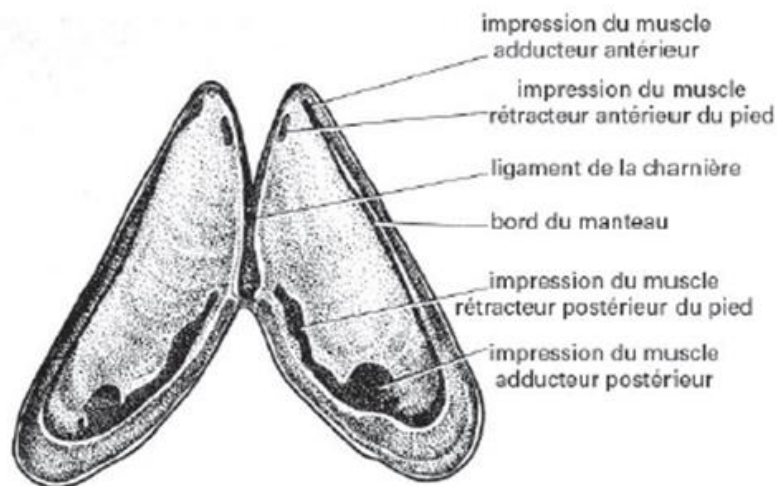


Figure 10: face interne des valves (de W. Deconinck, 1971)

I-3-2 Position systématique :

On se base sur les caractères définis par (Lubet, 1959).

Embranchement : *Mollusques*.

Classe : *Lamellibranches*.

Ordre : *Filibranches*.

Sous ordre : *Anisomyaria*.

Super famille : *Mytiloidea*.

Famille : *Mytilidea*.

Sous famille : *Mytilinae*.

Genre : *Mytilus*.

Espèce : *Mytilus galloprovincialis*. (Lamarch, 1819).

I-3-3-Pathologie :

Es principaux agents pathogènes des coquillages, ce qui ont été les cause d'épizooties anciennes ou récents mais aussi ceux qui, bien qu'identifiés dernièrement représentent un risque majeur pour les bassins conchylicoles, selon les donnes épidémiologiques.

I-3-3-1- Virus :

Les infections virales des mollusques bivalves restent mal connues.

C'est en 1966 que **Vago** a découvert le premier virus d'invertébré marin, chez *Macropipus depurator* et la première infection viral chez les huitres a été signalée par **Farley et al** en 1972 d'après leur caractéristiques, ces virus ont été rattachés aux *Herpesviridae* (**Farley,1978**).

- les principales familles de virus decrites chez les coquillages :

1-*Herpetoviridae* .

2-*Iridoviridae*.

3- *Papovaviridae*.

4-*Tagoviridae*.

5- *Retroviridae*.

6- *Reoviridae*.

7- *Picornaviridae*.

I-3-3-2 Procaryotes

La majorité des procaryotes associés aux bivalves sont des bactéries, divers groupes de bactéries marines ont été isolés chez les mollusques en raison de la capacité de ces animaux à filtrer et à concentrer les micro-organismes, il s'agit d'une flore très riche, surtout en germes Gram négatif comme les *Achromobacters*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, et *Vibrio* (Laukner, 1983).

Plus récemment, des *Rickettsies*, des *Chlamydies* et des *Mycoplasmes* ont été observés chez les mollusques (cf encadres).

I-3-3-3 Champignons

Consistent en générale à identifier l'agent, à observer et à décrire les conséquences de l'infection.

Ils semblent être plutôt des parasites opportunistes et des pathogènes facultatifs. Les infections fongiques s'avèrent souvent mortelles (Noga, 1990). Ainsi, plusieurs micro-organismes d'origine fongique ont été identifiés chez les mollusques bivalves et parmi eux un grand nombre a concerné « *Ostreoblaste implexa* » agent de la maladie **de la coquille** ou **du pied** ou **de la charnière** de l'huître plate *O. edulis* (Korringa, 1948 ; Alderman et Jones 1971) . « *Sirolopidium Zoophthorum* » a été décrit comme la cause des mortalités chez les larves bivalves d'élevage, mais aussi dans les populations naturelles de clams et d'huîtres (Davis et al, 1954). On citera aussi la présence d'hyphes d'origine fongique, parasitant et détériorant le byssus des moules « *Mytilus galloprovincialis* » (Vitellaro-Zuc-Carillo, 1973) .

I-3-3-4 Protozoaires

Le nombre des protozoaires décrits chez les mollusques est beaucoup plus important que les autres micro-organismes, ainsi sont observés simultanément avec des mortalités.

En réalité les relations entre les protozoaires parasites et leurs hôtes peuvent prendre différentes formes (Vivares, 1990). Les protozoaires constituent toujours une menace potentielle pour la mariculture s'ils n'entraînent pas toujours la mort de leur hôte, ils peuvent être la cause du retardement de sa croissance ou perturber sa reproduction.

Les principaux prozoaires sont :

-*Hexamita*

-*Labyrinthula* et *Labyrinthuloides* responsable de la maladie de malpeque Bay.

-*Perkinsus* nommé *Dermocystidium marinum*.

-*Haplosporidium*.

-*Marteilia* agent pathogene *Marteilia refringens* cause de la maladie des abers ou maladie des glandes digestives chez l'huitre.

-*Bonamia* cause de la amaldie hemocytaire ou Bonamiose .

-*Mikrocytos* (microcelles, microcytoses).

I-3-3-5 Métazoaires :

I-3-3-5-1)-Trématodes : les mollusques sont souvent l'hôte intermédiaire, fréquent observe dans le milieu marin, les trématodes les plus fréquent rencontres chez les bivalves appartiennent au genre *Bucephalu* .

I-3-3-5-2)-Annélides ou les Nématodes : n'ont pas d'incidence majeure sur les élevages conchylicoles ni sur les populations naturelles de coquillages, Ainsi leur étude relève plutôt de la parasitologie comparée que de la pathologie aquacole (**Lauckner, 1983**).

I-4- Généralité sur la conchyliculture :

I-4-1 Conchyliculture :

La conchyliculture est la plus ancienne des activités aquacoles (Bernabé-1991). Le terme de conchyliculture est récent et date du milieu de XXème siècle , c'est un aquaculture essentiellement marine , c'est également une activité vivrière principalement développée en Asie et qui associe les *Ostréidés* (Huitres) ; les *Mytilidés* (moules) , les *Pectinides* (pétoncles) , les *Vénéridés* (palourdes) (IFREMER – 2006) .

Depuis quelques années , une conchyliculture d'eau douce apparait en chine avec la culture d'escargot d'eau douce (*Cipangopaludina chinensis*) , de cygne (*Anondonta cygnea*) et de clam d'Asie (*Corbicula Fluminea*) (IFREMER – 2006) .



Figure 11 : La conchyliculture (

I-4-2- Mytiliculture :

La mytiliculture est l'une des branches de la conchyliculture qui désigne l'élevage des moules , elle se fait dans les eaux côtières , soit en surface , ou les jeunes moules sont réparties sur terrains océaniques situés dans la zone de balancement de la marée (la culture à plat ou la culture sur bouchots) , ou dans des eaux peu profondes (culture en suspension : tables mytilicoles , soucoupe balastable et filières) , la légende attribue le premier élevage de moule à un naufrage irlandais Patrick Walton , réfugié dans la baie de l'Aiguillon , cherchant à attraper des oiseaux , il posa des filets tendus sur des perches (Marteil-1979).

I-4-2-1 Modes d'élevage

I-4-2-1-1 Elevage sur bouchots :

Un bouchot est une ligne de pieux plantés dans le sol les moules sont captées sur ceux qui sont situés le plus au large (bouchots à naissain) puis transportées, au fur et à mesure de leur croissance , sur les pieux plantés plus près de la côte (bouchots d'élevage) Fig 12.



Figure 12 : la mytiliculture sur bouchots (Terroir Evasion Divines Moules) .

I-4-2-1-2 Elevage en suspension :

Principe de la culture en suspension.

Le naissain est récolté sur des cordes de captage ou pêche sur des gisements naturels.

il est installé sur des cordes d'élevage qui pendent dans l'eau et sont constamment immergées.

Il existé deux sortes d'installation : les installations fixes et les installations flottantes ou radeaux. les installations fixes exigent des eaux peu profondes, ne dépassant pas 10 m, et une amplitude de marée faible. aussi ne les trouve -t-on qu'en méditerranée . Les installations flottantes, en revanche, ont l'avantage de pouvoir être employées indifféremment dans des zones ou l'ampli-tude des marées est faible ou importante, mais, dans ce dernier cas, la profondeur doit être suffisamment grande pour que les cordes ne touchent jamais le fond, même aux basses mers de vives-eaux Fig 13

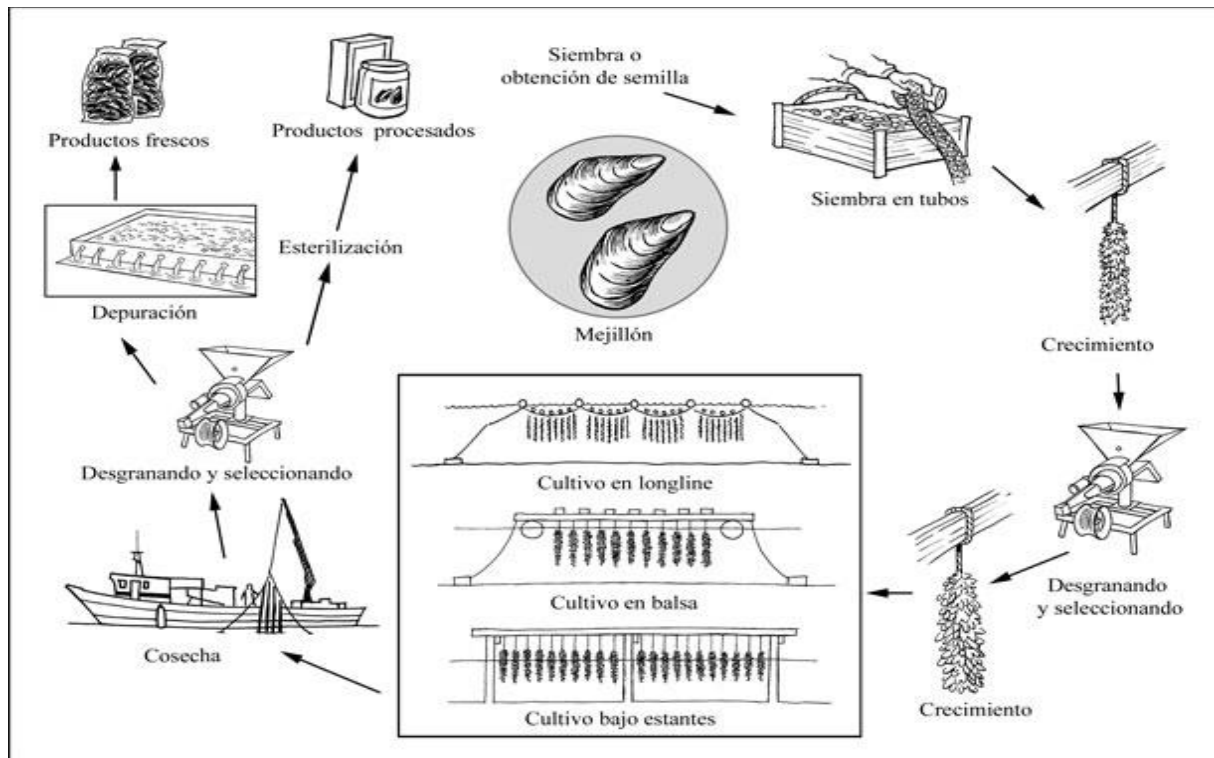


Figure 13 : Mytiliculture en suspension.(FAO.2009 Valerio Crespi and Michael New)

I-4-2-1-3 Elevage à plat :

Principe de la culture à plat.

Le naissain se fixe souvent en abondance dans des zones où la survie, la croissance et l'engraissement sont faibles. Les jeunes moules sont pêchées sur ces gisements naturels et transférées dans des endroits où les conditions du milieu sont plus favorables. Pour améliorer encore le rendement, on veille à ce que la densité des mollusques sur le terrain ne soit pas excessive, et les prédateurs sont contrôlés Fig 14.



Figure 14 : la conchyliculture à plat. (French shellfish culture.1979)

I-4-2-1-4 Elevage en surélevé

On peut considérer que ce mode de culture est actuellement au stade expérimental. Il est apparu récemment sur la cote est du cotentin et prendra sans doute un peu d'extension, mais il reste encore pour le moment. Peu important.

L'élevage en surélevé consiste à mettre les jeunes moules dans des poches en plastique qui sont elles-mêmes installées sur des tables métalliques. Cette technique, très utilisée en ostréiculture, présente des avantages mais aussi des inconvénients. L'avantage le plus important est qu'une fois mises en poches, les moules sont à l'abri de prédateurs comme les oiseaux qui causent des ravages importants dans certains secteurs. En outre, si les mollusques n'ont pas été trop tassés au départ ils peuvent, apparemment, effectuer toute leur croissance sans entretien important. En revanche, dans certains endroits, les tables favorisent l'envasement. Enfin, le cout du matériel est assez élevé : en 1977 (Fig.15).



Figure 15: la conchyliculture en surélevé (Daney Charles 1995)

II-1-Analyse microbiologique de l'eau et des moules

II-1-1- Stratégie d'échantillonnage

II-1-1-1 Prélèvement de l'eau

Les prélèvements d'eau destinée aux analyses bactériologiques sont effectués, Les flacons stériles en verre d'une capacité de 250ml sont plongés à une profondeur d'environ-50cm de la surface de l'eau puis ouverte à contre courant ; une fois remplis, ils sont refermés sous l'eau pour éviter la formation de bulles d'air et tout risque de contamination lors du transport. Pour la surveillance des eaux côtières, l'analyse au laboratoire débute dans un délai maximum de 8 heures après le prélèvement de l'échantillon selon les recommandations de (Rodier, 1984).

Les prélèvements d'eau destinés à l'analyse de la chlorophylle a et à la matière en suspension seront effectués durant la même période d'étude des moules, à l'aide d'une bouteille d'échantillonnage de 1,5 litres, conservées à l'abri de la lumière à basse température dans une glacière.

Tout prélèvement doit être accompagné d'une fiche de renseignement sur laquelle on note :

- o Lieu de prélèvement
- o Date et heure de prélèvement
- o L'état de la mer
- o Le vent (la direction).

II-1-1-2 Récolte des bivalves :

L'espèce de bivalves utilisée dans la présente étude est la moule *Mytilus galloprovincialis* ; Un échantillonnage est réalisé dans les 2 sites. La récolte de la moule est effectuée à la main.

Les moules sont immédiatement transportées dans des glacières à T°C de $\pm 4^{\circ}\text{C}$ jusqu'au laboratoire pour être triées, nettoyées et débarrassées de leurs épibiontes ; elles sont ensuite pesées et mesurées.

L'étude bactériologique a nécessité l'utilisation de 4 à 7 individus (selon la taille); les moules destinées à cette étude sont recueillies dans des sacs de congélations propres et étiquetés (date, site, espèce) puis entreposés dans une glacière maintenue à une température comprise entre 4°C à 10°C (A.C.I.A, 2004) jusqu'à leur traitement (le jour même).

II-1-2 Analyse bactériologique des échantillons :

Dans cette étude, nous avons recherché les bactéries indicatrices de pollution fécale (coliformes), puis les bactéries pathogènes strictes (Salmonelles). En ce qui concerne les bactéries indicatrices de pollution fécale, nous avons procédé à un dénombrement en utilisant une méthode simple, qui est la colimétrie (Annexe). Celle-ci désigne « la technique de numération en tubes multiples » (TNTM) avec détermination du nombre de germes le plus probable (NPP) à partir de la table de Mac Grady extraite de la norme NF T90-413, préconisée par l'unité de coordination de PAM (Plan d'Action pour la Méditerranée) (Anonyme, 1987). C'est l'examen le plus pratiqué dans les analyses de l'eau ou de fruit de mer, répondant à des préoccupations sanitaires (Rodier, 1978). Quant aux bactéries pathogènes (Salmonelles) la recherche a été faite par la méthode présence /absence conformément à la norme AFNOR V 08 013. (Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Polytech Département STIA.)

II-1-2-1 Préparation des échantillons :

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera "homogénéisé" (liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (solide) ce qui constitue en fait la première dilution.

Les dénombrements sur l'eau ont été réalisés sans aucune préparation. Les moules ont été débarrassées des byssus et des épizoaires présents sur leurs coquilles, puis brossées sous l'eau du robinet, et enfin désinfectées superficiellement par un jet d'alcool et flambage rapide. Après ouverture aseptique, le contenu entier : chair et liquide intervalvaire est recueilli stérilement, puis dilué, et soumis au broyage par un broyeur homogénéisateur, Ultra-Turrax, préalablement nettoyé (15000 tr/mn pendant 30secondes), afin d'obtenir un broyat homogène considéré comme la dilution mère de l'échantillon à tester (OMS, 1983). L'analyse porte donc sur la chair et le liquide intervalvaire. (Plus quellec et al., 1986 ; Guiraud, 2003).

II-1-2-2 Analyse bactériologique de l'eau :

II-1-2-2-1 Préparation des dilutions décimales :

Conformément aux normes AFNOR NF VO8-010 et ISO 6887-1, on effectue des dilutions décimales pour chaque échantillon à l'aide d'eau distillée stérile; ou tampon

phosphate. Elles doivent être effectuées dans des conditions aseptiques et minutieuses. Les dilutions suivent des séries logarithmiques dont les termes sont en progression géométriques : 0.1 ; 0.01 ; 0.001 ; ...etc.

*** Les dilutions :**

- Dilution 10^0 : consiste à la prise directe de la solution mère.
- Dilution 10^{-1} : dans un tube à essai contenant 9 ml d'eau distillée stérile, on ajoute 1 ml d'eau à analyser (10^0).
- Dilution 10^{-2} : dans un deuxième tube à essai, on ajoute 1 ml de la dilution 10^{-1} à 9 ml d'eau distillée stérile. Fig 16.

NB : l'agitation du contenu est nécessaire avant de préparer chaque dilution.

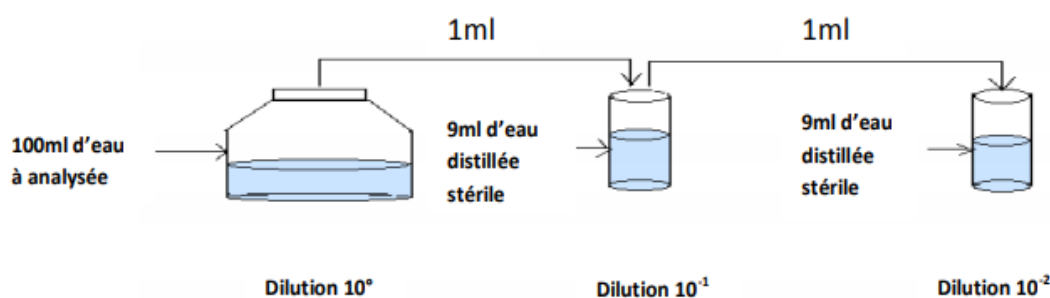


Figure 16 : Préparation des dilutions

II-1-2-2-2 Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et recherche d'Escherichia col :

Conformément à la norme NF T90- 413, La numération des coliformes est réalisée par ensemencement de 1 ml de l'aliment (ou de sa suspension mère) et de ses dilutions dans un bouillon lactose bilié au vert brillant simple concentration S/C (BLBVB), dans des tubes munis de cloches de Durham. La présence des germes recherchés se traduit par :

- o Un virage de couleur dans toute la masse liquide.
- o Un dégagement de gaz dans les cloches.

Mode opératoire :

La colimétrie comporte deux tests : - Un test présomptif. et un test confirmatif.

Le dénombrement est effectué suivant la méthode du nombre le plus probable (NPP) de la table de Mac Grady.

***Test présomptif : dénombrement des coliformes totaux**

>> On prépare 3 séries de 3 tubes chacun contenant 9 ml de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB) simple concentration S/C munis de cloches de Durham.

>> Chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1 ml de la dilution 10^0 (solution mère). Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1 ml de la dilution 10^{-1} et 1 ml de la dilution 10^{-2} .

>> Nous agitons pour homogénéiser, sans faire pénétrer l'air dans la cloche de Durham

>> L'ensemble des tubes ainsi préparés est incubé à 37°C pendant 24 à 48 heures.

Fig17.

Remarque :

Cette phase de la colimétrie se base sur la propriété commune des coliformes pour fermenter le lactose tout en produisant du gaz ; elle ne permet que de présumer de la présence des coliformes dans l'eau à analyser. De ce fait, l'application du test confirmatif s'impose.

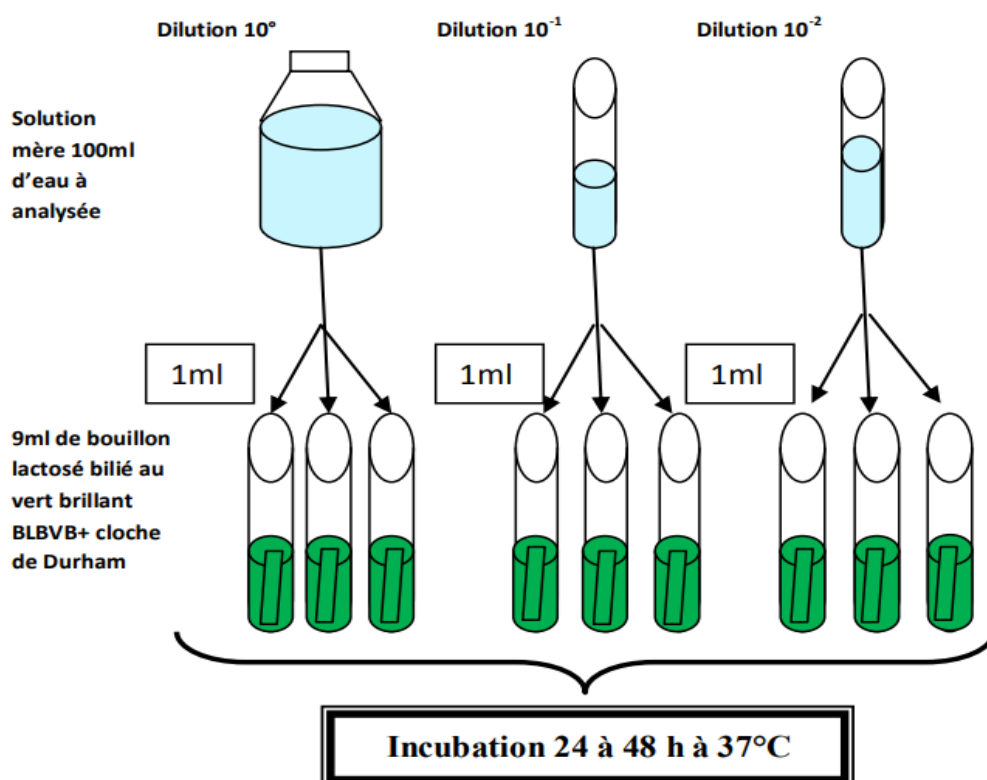


Figure 17: Recherche et dénombrement des coliformes fécaux (Test présomptif)

***Test confirmatif (Test de Mac KENZIE) Identification des Coliformes thermotolérants (*Escherichia coli* présomptifs) :**

Une öse d'un tube positif est inoculée dans un tube de BLBVB avec cloche, et une autre dans un tube d'eau peptonée puis les deux tubes incubés à 44.5°C pendant 48h. Fig18.

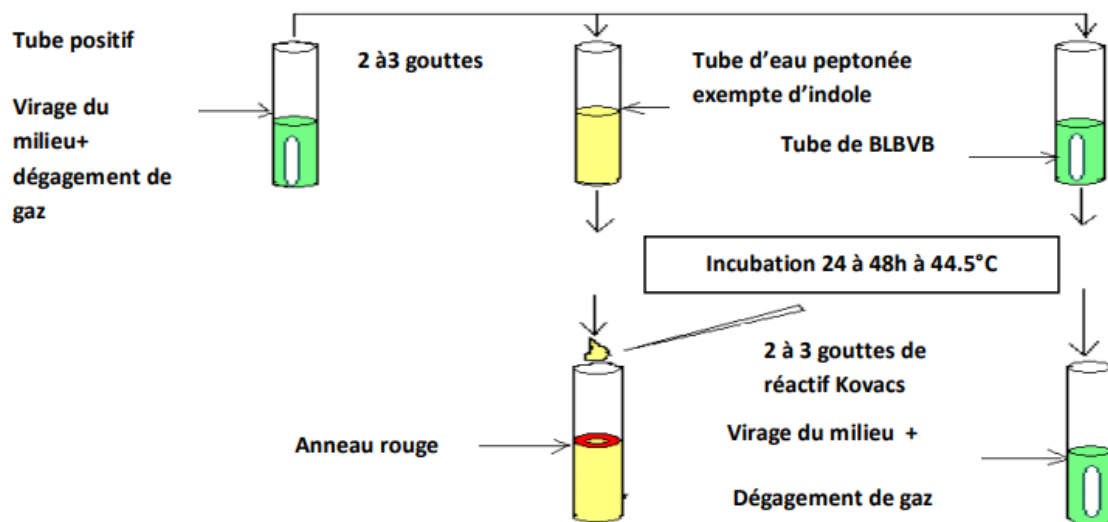


Figure 18 : Identification des coliformes thermotolérants et *E. coli* présomptif dans l'eau (test confirmatif).

***Lecture :**

Si après incubation à 44.5°C pendant 48h il y a production de gaz (BLBVB) et d'indole (mis en évidence par addition de réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée) on peut soupçonner la présence d'Ecoli. Ces recherches peuvent être confirmées par l'isolement et l'identification des bactéries productrices de gaz (isolement sur EMB par exemple).

La formation d'anneau rouge à la surface des tubes d'eau peptonée après addition de 2 à 3 gouttes du réactif de kovacs témoignant de la production d'indole par *E. coli*, suite à la dégradation de la Tryptophane grâce à la Tryptophanase.

Nous notons le nombre de tubes positifs et nous exprimons le nombre le plus probable de germes dans 100 ml d'échantillon d'eau, selon la table de Mac Grady (Annexe).

II-1-2-3 Analyse bactériologique des bivalves :

L'analyse des échantillons de bivalves doit se faire dans les heures qui suivent afin d'éviter une prolifération et une modification de la communauté bactérienne. Aucun échantillon ne doit être conservé pendant plus de 24h (ACIA, 2004).

II-1-2-3-1 Préparation des dilutions décimales :

Conformément à la norme NF VO8-010

- Dilution 10^0 : dilution mère (25 g de chair et de liquide intervalvaire+ 225ml d'eau distillée stérile+ broyage et homogénéisation).

- Dilution 10^{-1} : dans un deuxième tube à essai contenant 9ml d'eau distillée stérile, on ajoute 1ml du broyat (10^0).

- Dilution 10^{-2} : dans un troisième tube à essai, on ajoute 1ml de la dilution précédente (10^{-1}) à 9ml d'eau distillée stérile. Fig 19.

NB : l'agitation du contenu est nécessaire avant de préparer chaque dilution.

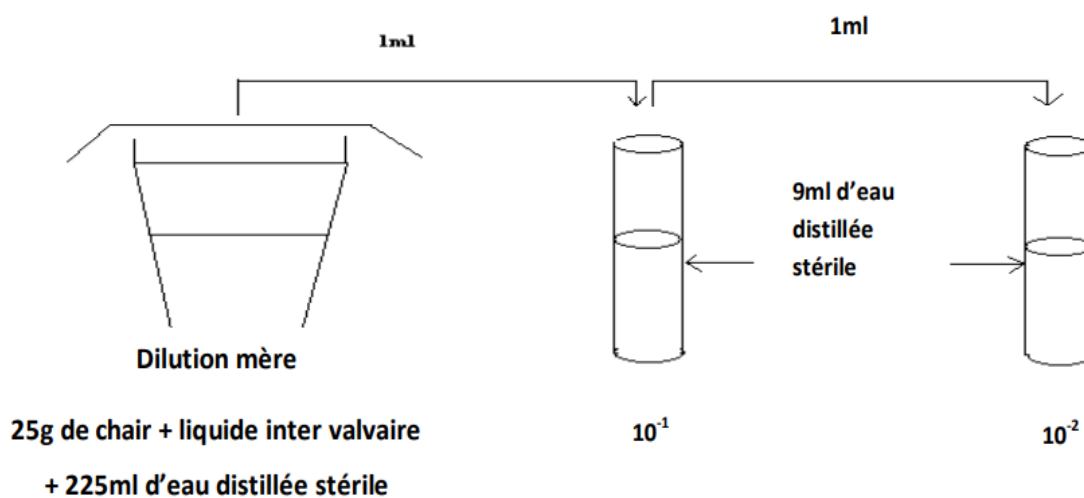


Figure 19: Préparation des dilutions des échantillons à analyser

II-1-2-3-2 Recherche et dénombrement des Coliformes totaux et recherche d'*Escherichia coli* :

*Principe :

Conformément à la norme NF T90- 413 et comme pour l'eau la recherche consiste à utiliser des milieux liquides de bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB), dans des tubes munis de cloches de Durham. La présence des germes recherchés se traduit par le virage de la couleur avec dégagement de gaz.

*Test présomptif : Dénombrement des coliformes totaux

On prépare 3 séries de 3 tubes chacun contenant 9ml de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB) S/C, munis de cloches de Durham. Chacun des 3 tubes de la première série reçoit 1ml de la dilution 10^0 (dilution mère). Les tubes de la deuxième et troisième série reçoivent respectivement 1ml de la dilution 10^{-1} et 1ml de la dilution 10^{-2} .

Nous agitons pour homogénéiser, sans faire pénétrer l'air dans la cloche de Durham. Le tout est incubé à 37°C pendant 24 à 48h. Fig 20.

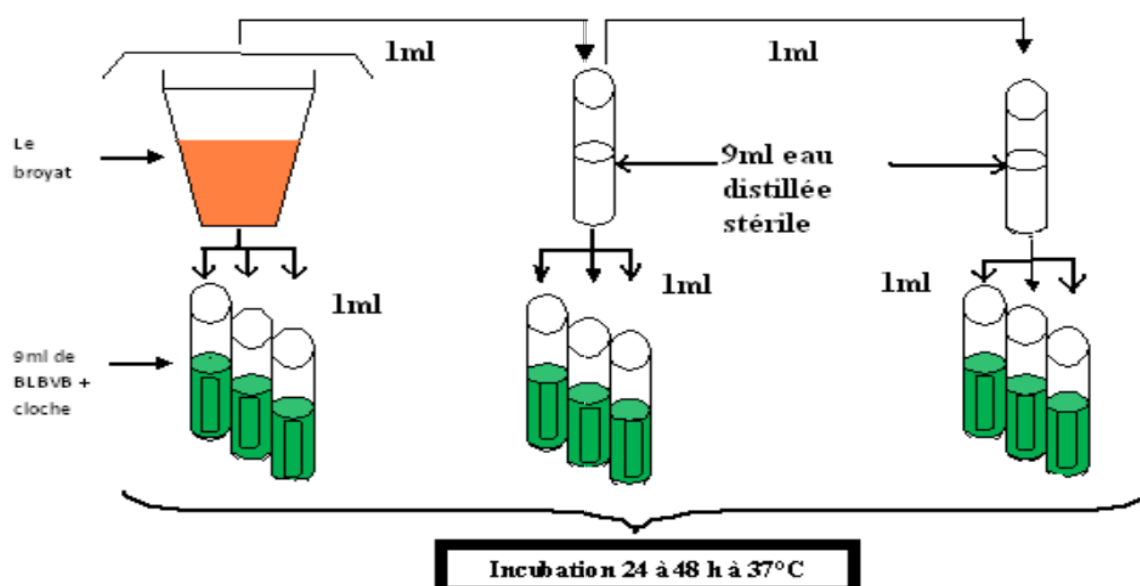


Figure 20 : Recherche et dénombrement des coliformes totaux chez les bivalves (test présomptif).

*Test confirmatif : Identification des coliformes thermotolérants et *E coli* présomptif (test de Mac KENZIE)

Nous prélevons 2 à 3 gouttes des tubes positifs présentant un virage de couleur, ainsi qu'un dégagement de gaz dans la cloche de Durham que nous rajoutons à un tube

contenant 9ml de bouillon lactose bilié au vert brillant (BLBVB) et 2 à 3 gouttes que nous additionnons à un tube contenant 9ml d'eau peptonée exempte d'indole. Les tubes ainsi préparés sont incubés à 44.5°C pendant 24 à 48h. Fig21.

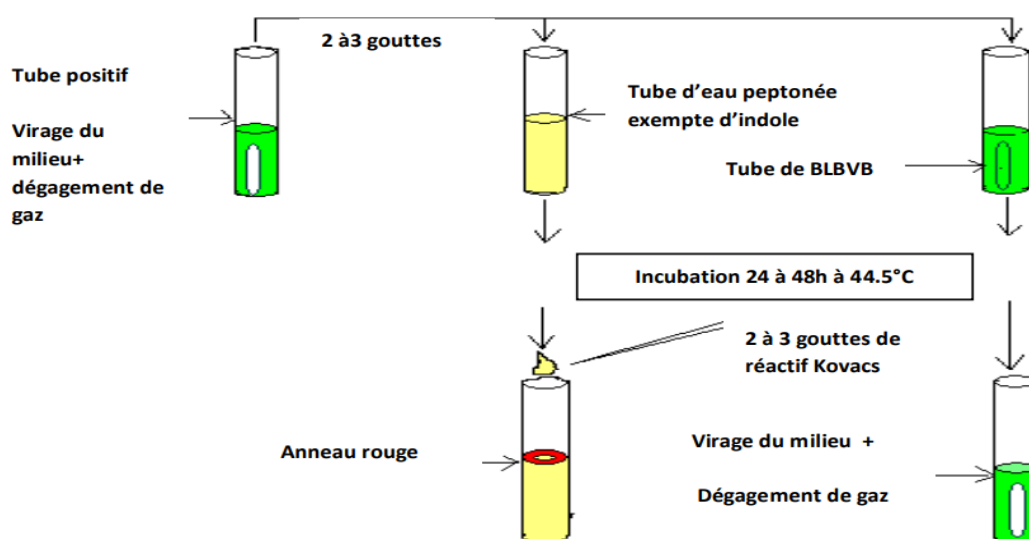


Figure 21 : Recherche des coliformes thermotolérants et d'*Escherichia coli* présumptif chez les bivalves, (test confirmatif).

-Expression des résultats :

Les résultats des quatre étapes d'identification des germes sont exprimés sous forme de nombre le plus probable des coliformes totaux, *E coli*, streptocoques totaux, streptocoques fécaux présumé par 100ml d'échantillon. La lecture, qui se fait à partir du tableau de Mac Grady, consiste à relever le nombre des tubes positifs et de se référer à la table.

- 1- Cas de l'inoculation de chaque dilution d'eau dans 3 séries de 3 tubes de milieu de culture :

Tableau 1 : Le calcul du nombre probable de germes (exemple d'échantillon d'eau).

	Dilutions		
Tubes	1/10	1/100	1/1000
Tube 1	+	+	-
Tube 2	+	+	-
Tube 3	+	+	-
Résultat	3	3	0

(+) : Tube positif, (-) : Tube négatif.

- Si nous avons 3 tubes positifs dans la première série 1/10 et 3 tubes positifs dans la deuxième série 1/100, et aucun tube positif dans la troisième 1/1000, alors nous lisons "3.3.0".

- D'après la table de Mac Grady (annexe), "330" correspond à 240 germes /100ml d'eau (tab.1).

2- Cas de l'inoculation de chaque dilution de bivalves dans 3 séries de 3 tubes de milieu de culture :

Tableau 2 : Le calcul du nombre probable de germes (exemple de la moule).

Tubes	Dilutions		
	1/10	1/100	1/1000
Tube 1	+	-	-
Tube 2	-	-	-
Tube 3	-	-	-
Résultat	1	0	0

- D'après la table de Mac Grady (Annexe), le nombre caractéristique 100 correspond à 0.4 germes dans la dilution 10-1.-Multipliant 0.4 par le facteur de dilution (10), donc on aura comme résultat 4 germes/g de broyat.

- Donc 400 germes/100ml de broyat dans la dilution 10-1 (Brissou et Denis ; 1978).

II-1-2-3-3 Recherche de Salmonella (eau et bivalves) :

Cette étude qui porte sur la recherche et le dénombrement des Coliformes et des Streptocoques fécaux, a été complétée par la recherche des germes pathogènes chez les bivalves présents dans le site 3 présumé le plus pollué (Sidi Salem) (Dahel, 2009).

La mise en évidence des Salmonella par la méthode "traditionnelle" nécessite plusieurs phases:

- un pré-enrichissement (revivification) qui est facultatif pour les produits non soumis à certains types de traitements technologiques susceptibles de "stresser" les bactéries
- un enrichissement sélectif (obligatoire)
- un isolement sélectif - une identification biochimique
- un sérotypage

- **Pré-enrichissement (AFNOR 1973) :**

Conformément à la norme NF EN ISO 6579 et à la norme AFNOR V 08 013 :

Pour les moules : X g de la masse molle et du liquide inter-valvaire de chacun des cinq moules prisent au hasard sont broyés dans 10 fois (c à d au 1/10) leur volume ((X*9) ml) d'eau peptonée tamponnée pendant 2 minutes.

Pour l'eau de mer : 25ml d'eau de mer diluée en 225ml d'eau peptonée tamponnée. L'incubation est réalisée pendant 16 h au moins et 24 h au plus à 37°C.

- **Enrichissement :**

Bouillon au sélénite et à la cystine (milieu mieux adapté au contrôle des aliments). 10 ml de milieu de pré-enrichissement sont ajoutés à 100 ml de bouillon au sélénite. Deux tubes sont réalisés, l'un étant incubé à 37°C l'autre à 43°C pendant 24 à 48 h.

- **Isolement :**

A partir d'une öse ou d'une goutte d'un des milieux d'enrichissement on réalise un isolement sur milieu SS ou milieu gélosé sulfite bismuth ou sur gélose au vert brillant et au rouge de phénol ou sur DCL selon HYNES. La gélose SS (gélose Salmonella – shigella) est un milieu utilisé pour l'isolement des salmonelles et des shigelles. Le développement de la flore secondaire est par le vert brillant, les sels biliaries, les fortes concentrations en thiosulfates et en citrates, le lactose, sucre réactif du milieu, permet de déceler la croissance éventuelle des coliformes (colonies rouges).

En outre, les bactéries capables de produire de l'H₂S par réduction du thiosulfate donnent en présence des ions de fer des colonies à centre noir.

L'ensemencement sur gélose SS se fait par stries dans des boites de Pétri. Après 24 h d'incubation à 37°C, les colonies se présentent sous les aspects suivants:

- colonies rouges lactose + (Enterobacter, Klebsiella)
- colonies incolores lactose- (Salmonella à H₂S - , Shigella, Serratia, Proteus morganii, E. hafniae)
- colonies à centre orangé (Proteus rettgeri, Providencia)
- colonies à centre noir (Salmonella à H₂S +, Citrobacter, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis).
- Des colonies rouges à centre noir : Citrobacter freundii (en réalité seul le centre noir est visible d'où la confusion avec Salmonella)

Pour plus de certitude on procède à un deuxième ensemencement sur gélose SS d'une colonie suspecte (colonie incolore ou incolore à centre noir) et après incubation de 24h à 37°C on commence une série de test pour l'identification de notre bactérie recherchée. (Fig 22)

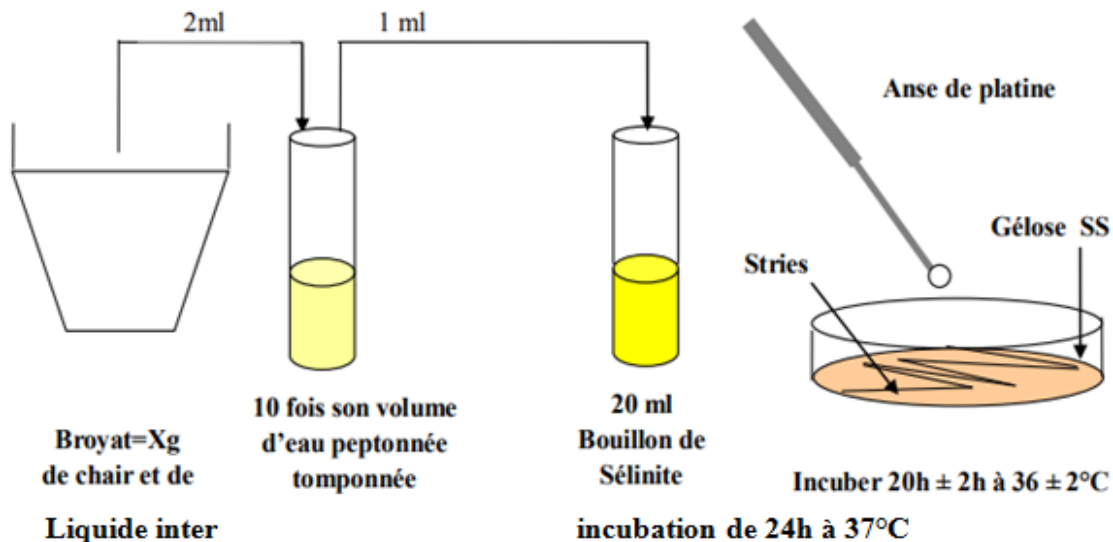


Figure 22 : Recherche des Salmonelles

***Tests d'identification :**

Coloration de Gram : On fait une coloration de Gram (annexe) à partir des colonies suspectes développées sur la gélose SS (bâtonnet Gram négatif).

Identification sur milieu TSI : (gélose – glucose – saccharose – H₂S ou gélose aux trois sucres et de fer)

Ce milieu est utile pour différencier les bactéries donnant des colonies lactose négatives et apparaissent donc comme suspectes sur les milieux d'isolement pour la recherche des salmonelles et des shigelles. Ces bactéries fermentent rapidement le saccharose ; l'indication principale est la différenciation des Salmonella avec (culot jaune, pente rouge, gaz) après 24 heures d'incubation à 37°C des shigella et des Proteus mirabilis et vulgaris.

Test d'oxydase :

On effectue un isolement d'une colonie incolore à centre noir et une autre incolore à l'aide d'une anse de platine stérile, on l'étale sur une pastille d'oxydation (disque d'oxydase) et on lui ajoute une goutte d'eau physiologique.

On laisse quelques secondes puis on observe :

✓ S'il y a pas de coloration violet => la colonie est oxydase (-).

- ✓ S'il y a coloration violet => la colonie est oxydase (+).

Les derniers stades de la respiration cellulaire font intervenir une chaîne de métalloprotéines : les cytochromes dont le dernier maillon, le cytochrome oxydase qui réagit directement et instantanément avec l'oxygène. (Dr Lebres – IPA).

Test Catalase :

- ✓ On prélève une colonie suspecte sur la gélose puis on l'ensemence dans un tube de H₂O₂ ; s'il y a formation de mousse blanche, la colonie est dite catalase (+).

Tests biochimiques miniaturisés (la Galerie API 20 E) :

- ✓ Isoler une colonie suspecte (colonie incolore à centre noir et/ou colonie incolore) sur la gélose SS à l'aide d'une anse de platine stérile ou une pipette Pasteur. Utiliser préférentiellement des cultures jeunes (18 à 24h).
- ✓ Inoculer la colonie dans un tube à essai contenant 5ml d'eau physiologique, d'API NaCl Medium, ou Api Suspension Medium
- ✓ Réaliser une suspension bactérienne en homogénéisant soigneusement les bactéries dans le milieu. Cette suspension doit être utilisée extemporanément (Fig 23).

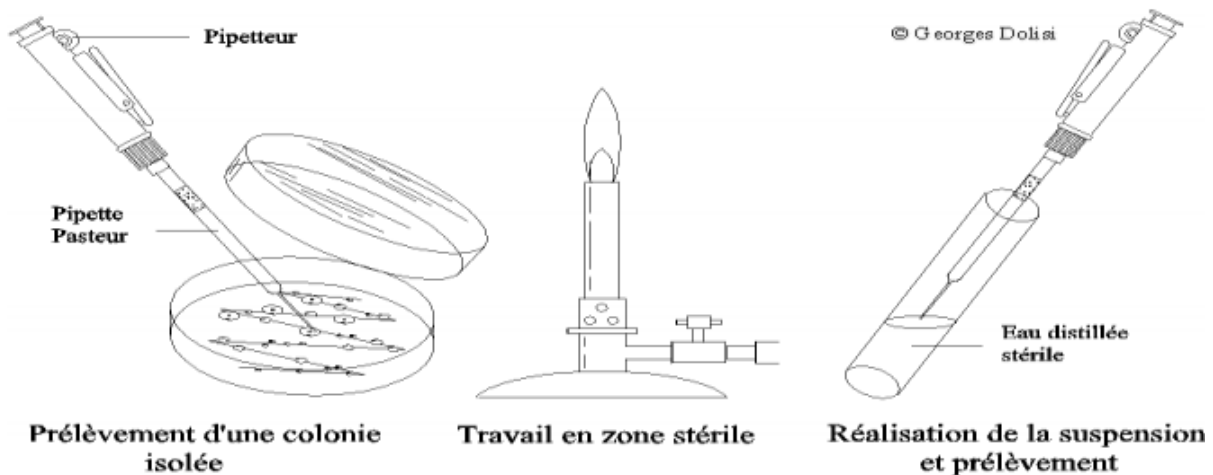


Figure 23: isolement de colonie suspecte et réalisation de suspension bactérienne (Biomérieux, 2006)

- ✓ Inoculation de la galerie :

Introduire la suspension bactérienne dans les tubes de la galerie à l'aide de la même pipette (pour éviter la formation de bulles au fond des tubes, poser la pointe de la

pipette ou de la PSI pette sur le côté de la cupule, en inclinant légèrement la boîte d'incubation vers l'avant) (Fig 24) :

- Pour les tests CIT, VP, et GEL, remplir tube et cupule.
 - Pour les autres tests, remplir uniquement les tubes (et non les cupules)
 - Pour les tests : ADH, LDC, ODC, H₂S, URE, créer une anaérobiose en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.
- ✓ Refermer la boîte d'incubation.
- ✓ Incuber à 36°C ±2°C pendant 18 à 24h.

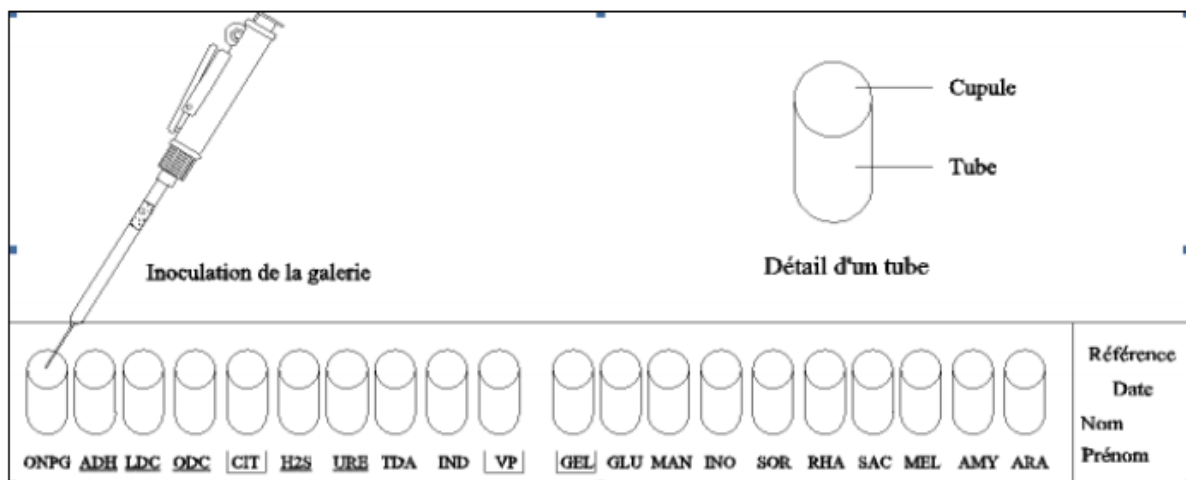


Figure 24: Inoculation de la galerie API 20 E (Biomérieux, 2006).

III-1-Résultats**III-1-1- Résultats pour le site d'élevage SARL-POINT DE MOULE.****Eaux de mer :****Tableau 3 :** résultats pour le site d'élevage sarl-point de moule(Eaux de mer)

	01/02/2018	27/02/2018	13/03/2018	03/04/2018	12/07/2018
Coliformes fécaux	11	0	240	0	0
streptocoque	0	0	0	0	0
Escherichia coli	0	0	0	0	0

Moule :**Tableau 4 :**résultats pour le site d'élevage sarl-point de moule

	01/02/2018	27/02/2018	13/03/2018	03/04/2018	12/07/2018
salmonelle	0	0	0	0	0
coliforme fécaux	0	0	0	0	0
Escherichia coli	0	8	0	0	5

III-1-2- Résultats pour le site d'élevage EURL MOUALEK.**Eaux de mer :****Tableau 5 :** résultats pour le site d'élevage EURL MOUALEK(Eaux de mer)

	01/02/2018	27/02/2018	13/03/2018	03/04/2018	12/07/2018
coliformes	11	0	0	0	0
streptocoque fécaux	0	0	0	0	0
Escherichia coli	0	0	0	0	0

Moules :**Tableau 6 :** résultats pour le site d'élevage EURL MOUALEK(Moules)

	01/02/2018	27/02/2018	13/03/2018	03/04/2018	12/07/2018
salmonelle	0	0	0	0	0
coliforme fécaux	0	0	0	0	0
Escherichia coli	0	8	2	2	3

III-1-3- Résultats pour le site d'élevage SARL- SAMSAK.**Eaux de mer :****Tableau 7 :** résultats pour le site d'élevage SARL- SAMSAK(Eaux de mer)

	01/02/2018	27/02/2018	13/03/2018	03/04/2018	12/07/2018
coliformes	3	0	0	0	0
streptocoque fécaux	0	0	0	0	0
Escherichia coli	0	0	0	0	0

Moule :**Tableau 8:** résultats pour le site d'élevage SARL- SAMSAK(Moule)

	01/02/2018	27/02/2018	13/03/2018	03/04/2018	12/07/2018
salmonelle	0	0	0	0	0
coliforme fécaux	0	0	0	0	0
Escherichia coli	0	8	0	0	0

III-2-Discussions.

III-2-1- Distributions des germes indicateurs de pollution fécale dans l'eau et les bivalves.

III-2-1-1- Distribution des germes dans l'eau de mer.

III-2-1-1-1 Coliformes fécaux :

Le dénombrement des Coliformes totaux montre que leur teneur varie d'un site à l'autre et d'un mois à l'autre. Nous notons, des teneurs en Coliformes totaux, inférieures aux valeurs guides (500 germes/100ml selon le décret exécutif n° 93-164 du 10/07/1993 JORA n° 46), au niveau des sites : Point de moules, Moualek et SAMSAK, pendant presque toute la période d'étude, à l'exception du mois de Mars au niveau du site point de moules où nous enregistrons un pic 2400germes/100ml.

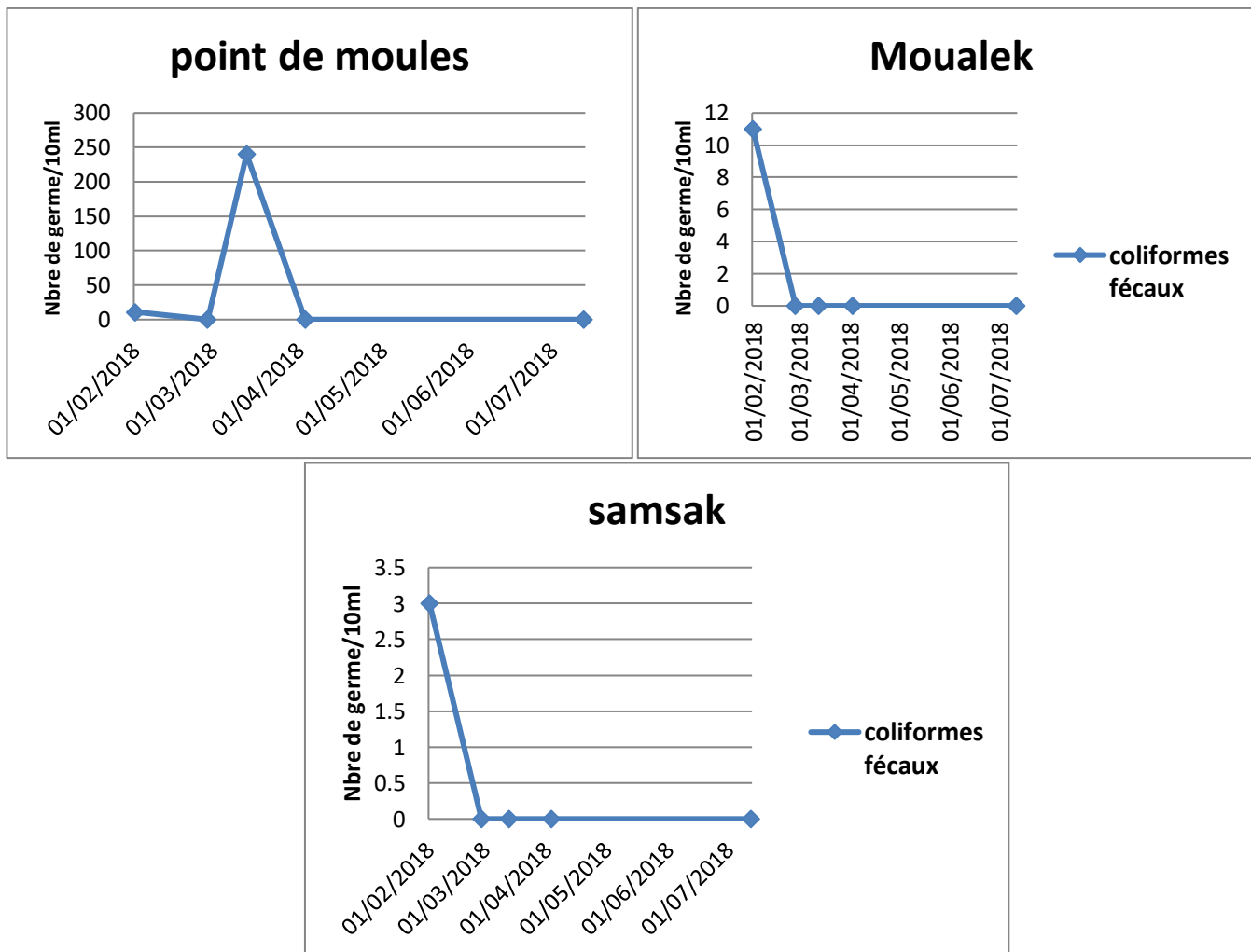


Figure 25 : Variations spatio-temporelles des teneurs en Coliformes fécaux relevées dans l'eau de mer.

III-2-1-1-2 Streptocoques Totaux :

L'eau de mer dans tous les sites d'élevage durant toute la période d'étude n'a pas présentée aucune contamination par les streptocoques.

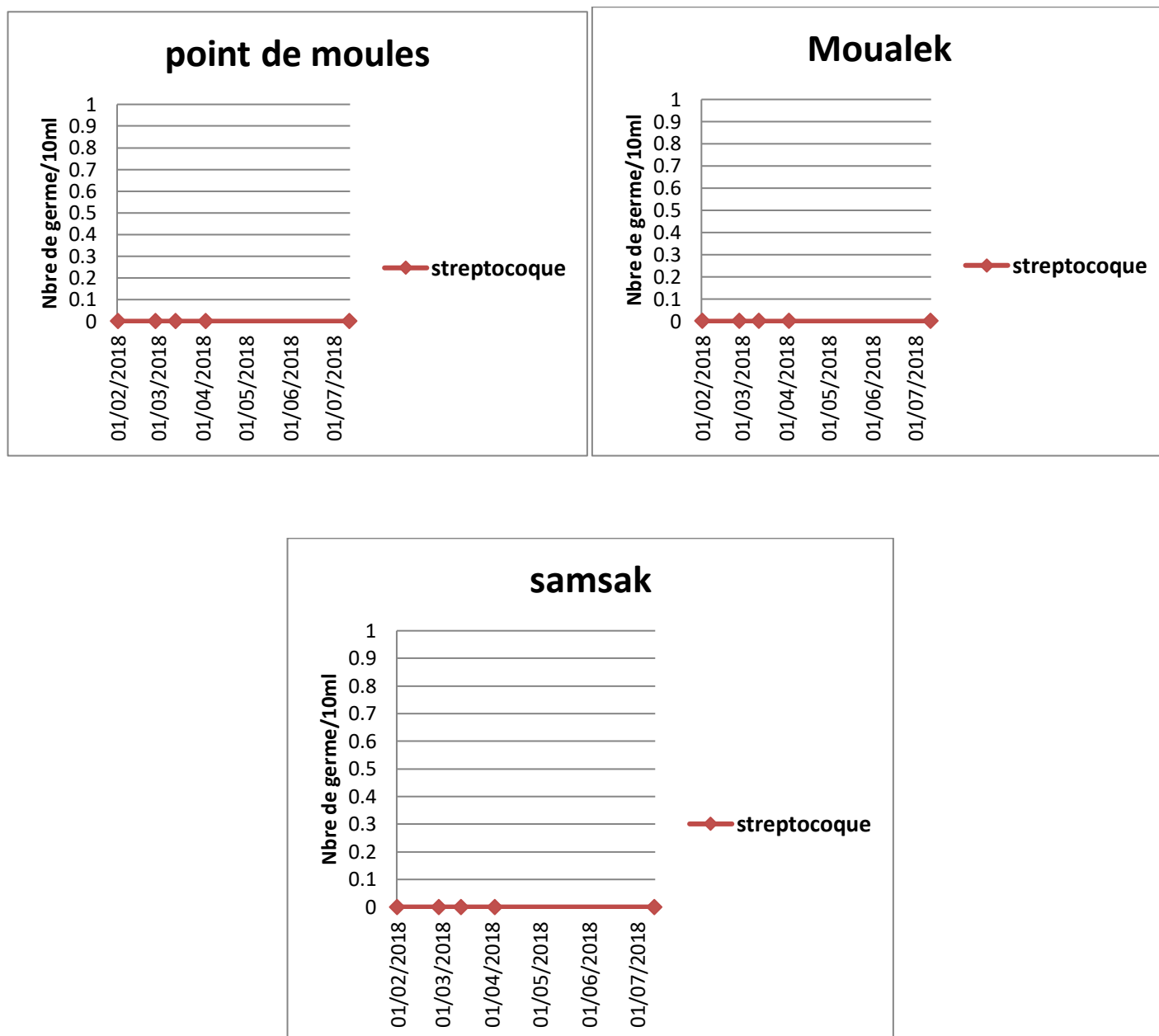


Figure 26: Variations spatio-temporelles des teneurs en Streptocoques relevées dans l'eau de mer.

III-2-1-1-3 Escherichia coli :

Les concentrations en Coliformes thermotolérants (E. coli), enregistrées dans l'eau du Point de moules et Moualek et SAMSAK, sont nul durent toute la période d'étude (0) germes /100ml.

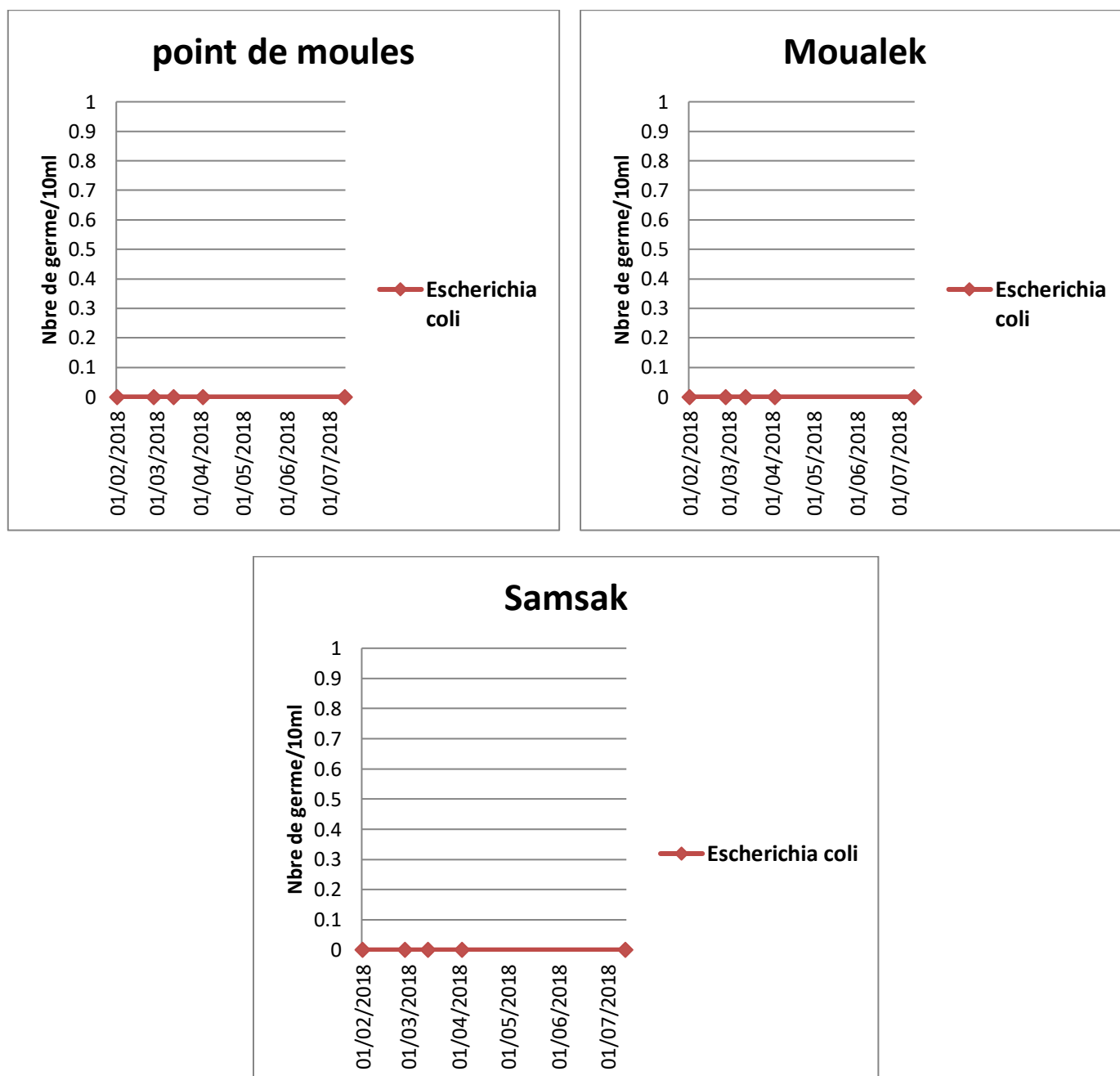


Figure 27 : Variations spatio-temporelles des teneurs en Escherichia coli relevées dans l'eau de mer.

III-2-1-2- Distribution des germes chez les moules.

III-2-1-2- 1 Les Coliformes fécaux :

Aucune contamination détectée par des coliformes dans les moules prélevées dans l'ensemble des sites hébergent, durant toute la période de l'expérience.

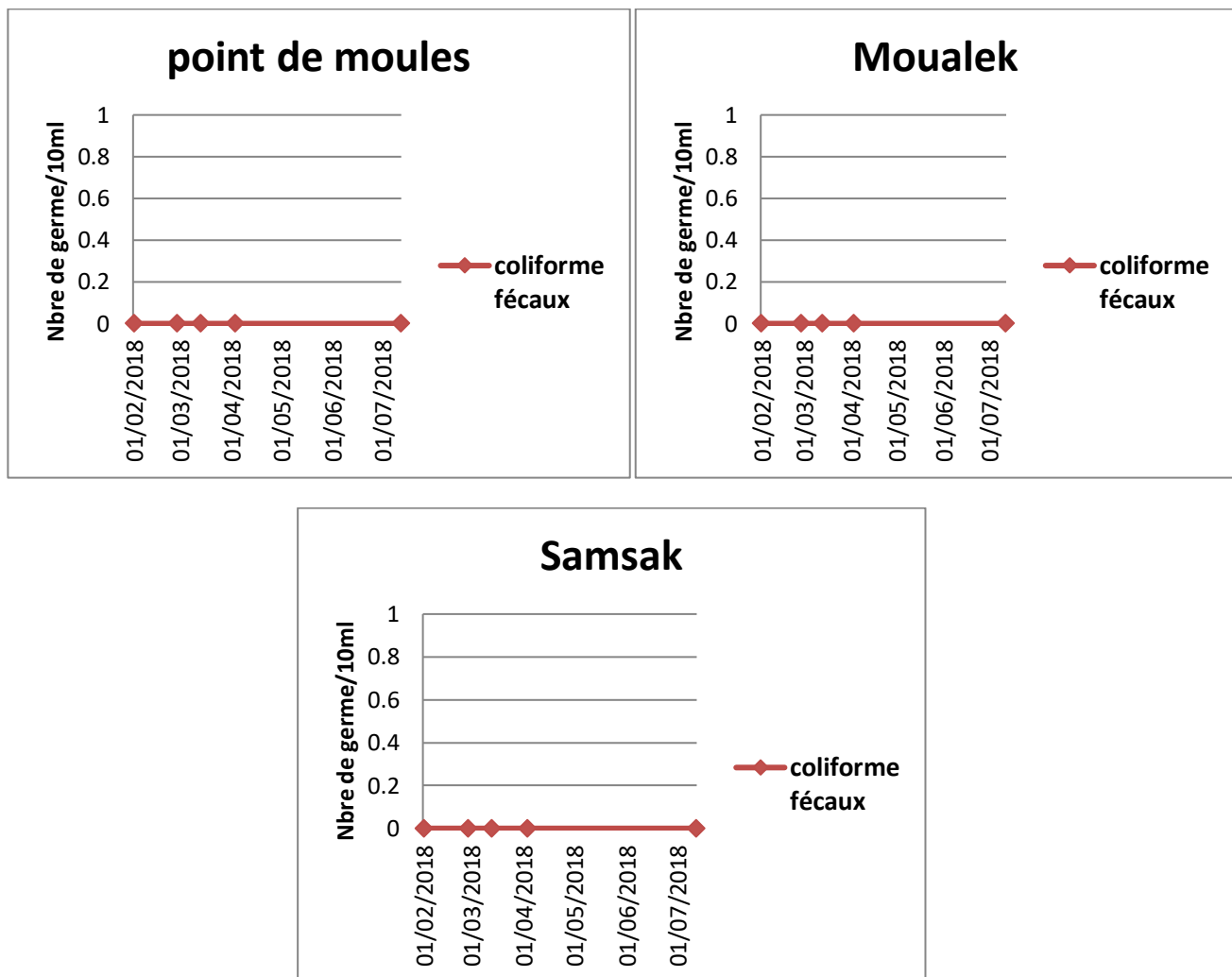


Figure 28: Variations spatio-temporelles des teneurs en Les Coliformes fécaux relevées dans les bivalves.

III-2-1-2- 2 Les Salmonelles :

L'utilisation de l'Api 20E comme test confirmatif pour la recherche et l'identification des Salmonelles dans les moules des trois sites d'élevages nous a permis de mettre en évidence l'absence de contamination par les germes pathogène.

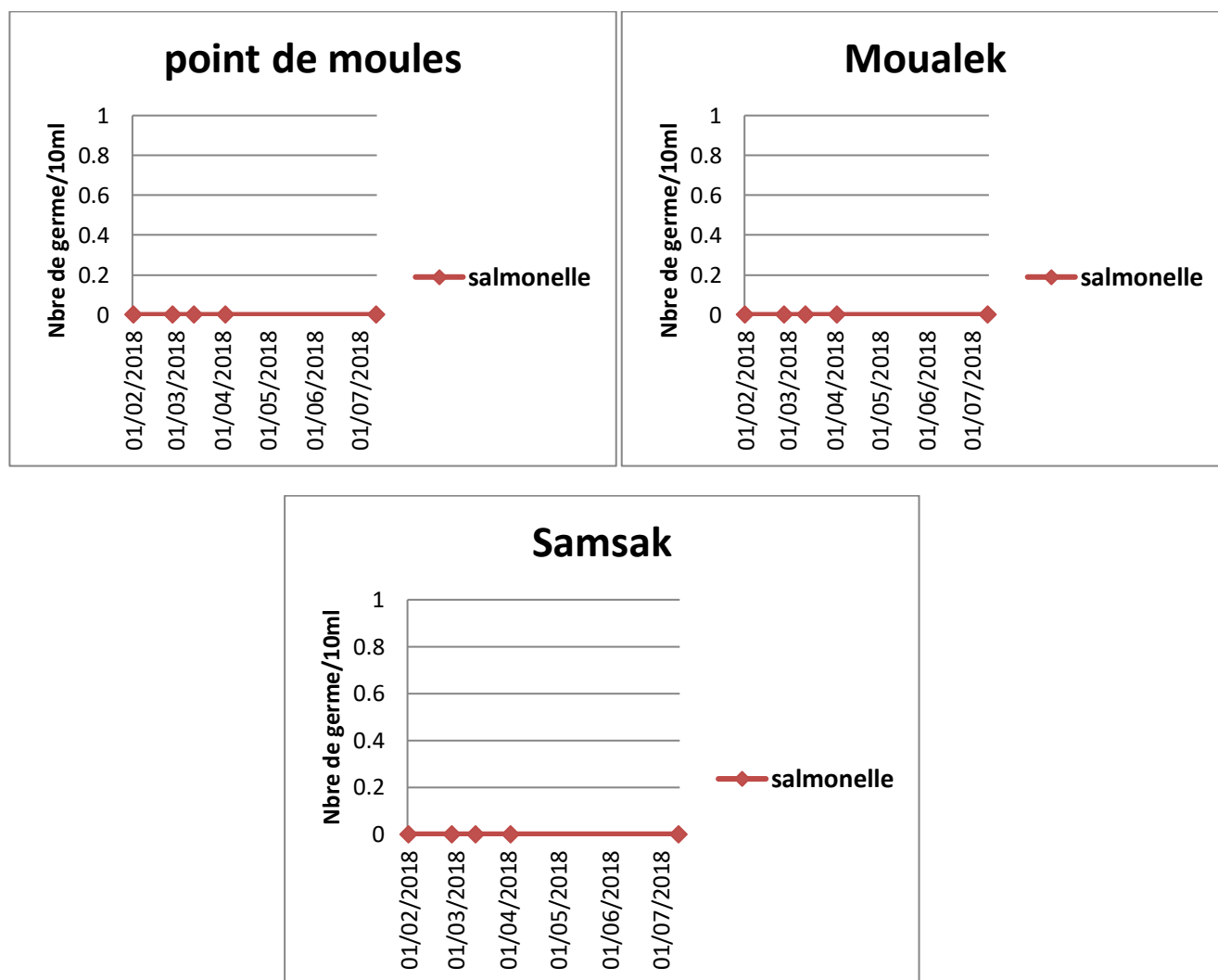


Figure 29: Variations spatio-temporelles des teneurs en les Salmonelles relevées dans les bivalves.

III-2-1-2- 3 Escherichia coli :

Les moules ne présentent pas une contamination marquée, 8 germes/10ml est la valeur la plus élevée obtenue dans les trois sites en 27/02/2018, cette concentration varie entre 02 germes/10ml enregistrée le 13 mars et le 1 Avril et 03 germes/10ml le 1 juillet au niveau du site de Moualek.

Au Point de moule on a détecté 05 germes/10ml pour le prélèvement du mois de juillet.

Au niveau du site SAMSAK nous avons 0 germes détecté.

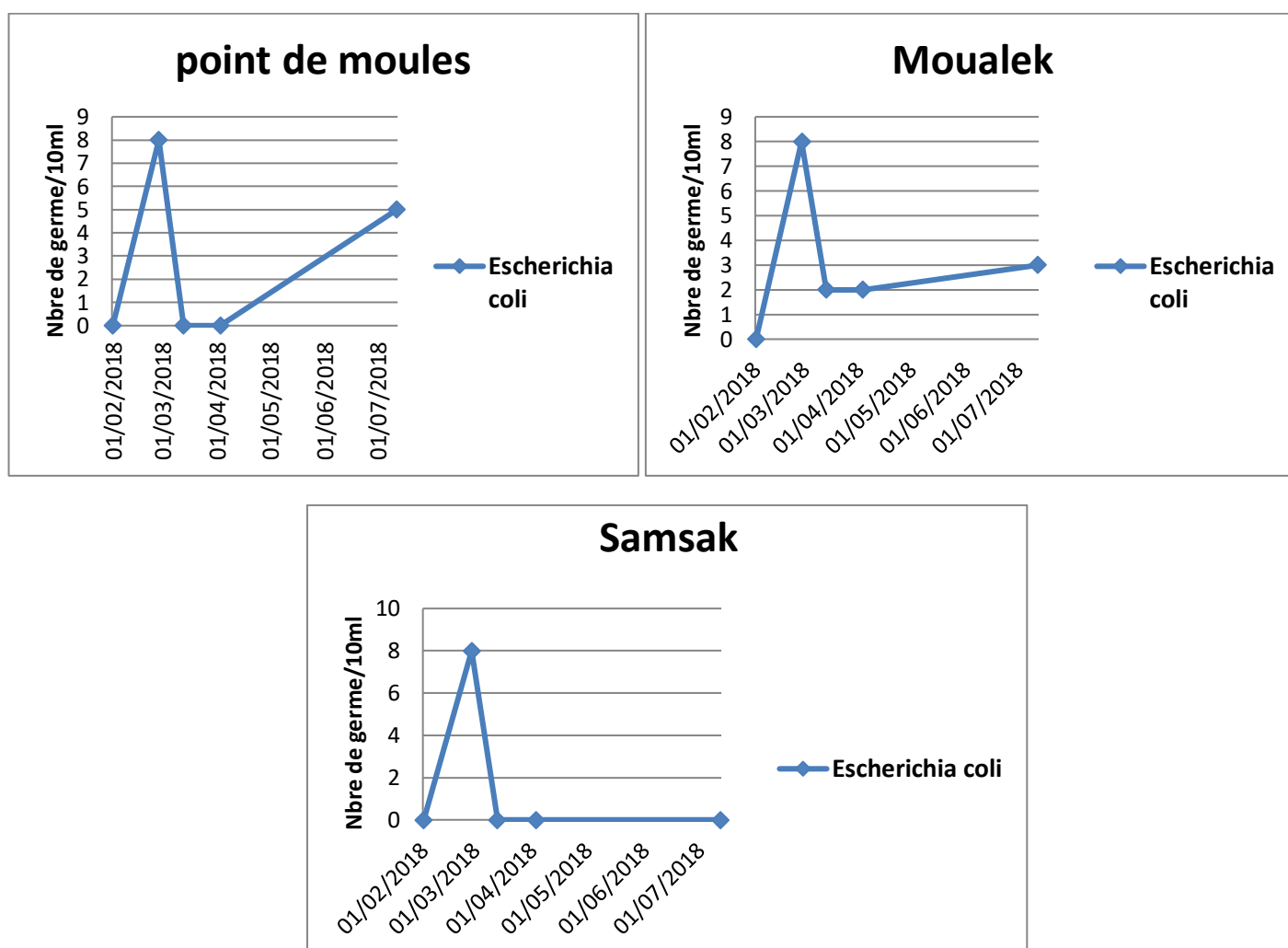


Figure 30 : Variations spatio-temporelles des teneurs en Escherichia coli relevées dans les bivalves.

III-3-Décision et classement de la zone d'élevage conchylicole SAKET.

La Zone d'étude SAKET au niveau de la wilaya du BIJIAI est classée selon ces analyses dans la classe A, donc les moules seront commercialisée directement et sont propre à la consommation humain.

Ce classement est applicable pour les trois sites d'élevage.

Conclusion :

Le suivi –bio sanitaire des zones d'élevages conchylicoles fait partie d'un programme de surveillance du milieu marin..

Dans notre travail on a choisis de traiter la partie microbiologique, donc des analyses microbiologiques réalisée après les prélèvements des échantillons d'eau de mer et la récolte des moules, la préparation des échantillons a analysée pour la recherche et le dénombrement des germes indicateurs de pollution fécale dans l'eau de mer et les bivalves.

Les germes recherchées dénombrées son les coliformes fécaux et les streptocoques et l'Escherichia. Coli pour l'eau de mer, et les coliformes fécaux l'Escherichia. Coli et les salmonelles pour les moules.

Les résultats montre que la zone d'étude Saket a BIJAIA est sein et classer dans la classe A, les moules seront commercialisée directement pour la consommation humain.

Références bibliographiques

« A »

A.C.I.A., 2004. Manuel des opérations de contrôle de solubilité des mollusques.

A.C.I.A., 2004. Manuel des opérations de contrôle de solubilité des mollusques.

AFNOR V 08 013. Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Polytech
Département STIA.

AFNOR V 08 013. Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Polytech
Département STIA.

Anonyme, 1987. Plan d'Action pour la Méditerranée

Anonyme, 2005. Thèse de modélisation de la bioaccumulation de métaux lourds chez la moule en milieu méditerranéen, Toulon, 46 p

« B »

BEAUMONT A.R., SEED R. & P. GARCIA-MARTINEZ, 1989 .Electrophoretic and morphometric criteria for the identification of the mussel *Mytilus edulis* and *Mytilus galloprovincialis*. J. Ryland and P.A Tyler (editor), Reproduction, Genetics and Distributions of Marine Organisms. Olsen and Olsen. Fredensborg, Danmark : 251-258.

Bernabe, 1991. Bases biologiques et écologiques de l'aquaculture. Edition Lavoisier.
Paris.500p

Boukroufa F., 1987. Reproduction et structure des populations de la moule *Perna perna* (Lubet, 1973) sur la côte Algéroise. Thèse de Magistère, U.S.T.H.B. Alger .140 p.

Brisou J.F. et Denis F.A. (1978). Hygiène de l'Environnement Maritime. Edition : Masson, Paris.

« G »

Google, 2019. Google earth programme.

Guiraud P-J., 2003. Microbiologie alimentaire. Dunod, Paris, pp 15

« I »

Ifemer Juin 2017 .Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole Départements de l'Hérault et du Gard Ifemer Juin 2017 - RST.LER/LR-17-03

« L »

Lamarck [J.-B. M.] de. (1819). Histoire naturelle des animaux sans vertèbres. Tome sixième

Lamarck, J. B. P. A., 1819. Histoire naturelle des animaux sans vertèbres, vol. 6(1), p. 1-343

Lauckner, G., 1983. Diseases of Mollusca: Bivalvia. In Diseases of marine animals. Vol. II. Introduction, Bivalvia to Scaphopoda (ed. O. Kinne), pp. 477-961. Hamburg: Biologische Anstalt Helgoland.

Lubet P. 1970. Cycles et rythmes sexuels chez les mollusques pélécytopodes. Influence de milieu et étude expérimentale. Annales de l'institut Michel Pacha, 3 :24 –50.

Lubet P., 1959. Recherches sur le cycle sexuel et l'émission des gamètes chez les mytilidés et les pectinidés (Moll. Bival). Rev. Trav. Inst. Pêche Marit. 23, 4, pp. 389-548.

Lubet P., 1973. Exposé synoptique des données biologiques sur la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lmk., 1819). Synop. F.A.O. Pêche 88.

« M »

MAC DONALD J.H., & R.K. KOEHN, 1988 .The mussel *Mytilus galloprovincialis* and *M. trossulus* on the pacific coast of North America. Marine Biology, 99: 111-118.

MAC DONALD J.H., SEED R. & R.K. KOEHN, 1991 .Allozymes and morphometric characters of three species of *Mytilus* in the northern and southern Hemispheres. Marine Biology, 111:323-333.

MARTEIL L., 1976 .La conchyliculture Française. Biologie de l'huître et de la moule. Inst. Scient. Tech. Pêches maritimes, 319p. Nantes Cedex. France.

MoulesNature.https://www.naturalsciences.be/sites/default/files/dossier_didactique_Moules.pdf consulté 16/01/2019

« N »

Norme de l'Agence de Normalisation Française (AFNOR) NF EN ISO 6887-1. Suspension mère et dilutions décimales; 1.Règles générales.

Norme de l'Agence de Normalisation Française (AFNOR) NF T90- 411.Recherche et dénombrement des streptocoques du groupe D. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide.

Norme de l'Agence de Normalisation Française (AFNOR) NF T90- 411.Recherche et dénombrement des streptocoques du groupe D. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide

Norme de l'Agence de Normalisation Française (AFNOR) NF T90-413. Recherche et dénombrement des coliformes thermo tolérants .Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP).

Norme de l'Agence de Normalisation Française (AFNOR) NF V 08-010. Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.

Norme de l'Agence de Normalisation Française (AFNOR) NF V 08-010. Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.

« O »

OMS., 1983. Détermination des coliformes fécaux dans les bivalves par le test des tubes multiples. N° 5. Rev.1.

« P »

PAM : Plan d'Action pour la Méditerranée

Plusquellec A., Beucher M., Legal Y., 1986. Bivalves : indicateurs de pollution microbienne des eaux littorales

Polytech Département STIA. Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique

« Q »

Quero, J. C., DuBuit, M. H., and Vayne, J. J. 1998. Les observations de possions tropicaux et le re'chauffement de eaux dans l' Atlantique europe' en. Oceanologia Acta, 21: 341 –451

« R »

RODIER J. (1978). L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. 6ème édition

Rodier J., Georffroy G-H., Kovacs G., Laporte J., Verneaux J., et Vial J., 1978.

L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires et eau de mer. 6ème édition. Paris. 1136 p

Rodier, 1984. L'analyse de l'eau, eaux naturelles, eaux résiduaires et eaux de mer. 7ème édition. Paris. 1365 p.

« W »

Wikipedia (Béjaïa) : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Béjaïa> consulté 16/01/2019

Wikipedia (SAKET) : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Saket> consulté 16/01/2019

- **Préparation des échantillons :**

Pour les **produits liquides** (ou semi-liquides) une agitation manuelle vigoureuse en présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante. Pour **les produits solides** diverses techniques de "broyage" sont utilisables :

- 1) broyage manuel au Potter ou en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier)
- 2) broyage mécanique. (Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Polytech Département STIA.)

- **Préparation des dilutions :**

Le récipient contenant le liquide à diluer est agité manuellement avec précaution pour éviter les projections pendant une dizaine de secondes. On prélève stérilement 1 ml de ce liquide (aspirer et refouler une fois avant le prélèvement) que l'on introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile. Le tube est agité par des mouvements de rotation ou au moyen d'un Vortex. On obtient ainsi une dilution au 1/10. Avec une nouvelle pipette de 1 ml on prélève 1ml de cette dilution que l'on introduit dans un nouveau tube de diluant de 9 ml ; on obtient une dilution au 1/100 et ainsi de suite jusqu'au niveau de dilution recherché. (Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Polytech Département STIA.)

- **Dénombrement des coliformes totaux et recherche d'E. coli (Dénombrement en milieu liquide (AFNOR, 1974)) :**

Les essais sont effectués en triple et les résultats analysés par la méthode de Mac Grady. Le vert brillant inhibe les germes Gram(+), et la bile, par son fort pouvoir tensioactif lié à la présence de sels biliaires, inhibe la plupart des germes qui ne sont pas d'origine intestinale.

Après ensemencement, les milieux sont incubés à 37°C pendant 24 h puis 48 h. Sont considérés comme positifs les tubes dans lesquels il y a croissance et une production notable de gaz (1/10 au moins du volume de la cloche).

La numération des coliformes fécaux (ou E. coli présumptifs) est effectuée avec le même milieu mais après 48 heures d'incubation à 44,5°C.

***Test confirmatif (Test de Mac KENZIE) Identification des Coliformes thermotolérants (Escherichia coli présumptifs) :**

Quelques fois les milieux de culture sont utilisés à double concentration dans le but de préserver une composition finale adéquate au milieu après addition d'un volume d'inoculum égal au volume du milieu. Ceci permet la numération d'un nombre peu élevé de coliformes

Coloration Gram :

Faire une coloration de Gram à partir des colonies suspectes développées sur la gélose SS (bâtonnet Gram négatif).

1. Fixation des colonies : On prend une colonie suspecte cultivée sur gélose SS, à l'aide d'une anse de platine stérile, on l'étale sur la lame puis on fait sécher jusqu'à la fixation.
2. Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée.
3. Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération identiquement pour plus de sécurité.
4. Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone) : verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée.
5. Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes.
6. Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement x 1000).

Les étapes 2 et 3 colorent en violet le contenu de la bactérie. Le violet de gentiane se fixe sur les composants cytoplasmiques de toutes les bactéries. Le lugol permet de fixer cette coloration interne.

L'étape 4 (alcool) sert à décolorer le cytoplasme des bactéries qui seront dites « Gram négatives ». En effet, celles-ci ont une paroi pauvre en peptidoglycane –donc plus fine- qui va laisser passer l'alcool (molécule lipophile) ou le mélange alcool-acétone, et qui décolorera le cytoplasme en éliminant le violet de gentiane. Au contraire, pour les bactéries dites «

Gram positifs » la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool car elle est composée d'une couche de peptidoglycane plus importante donc de ce fait ; plus épaisse. Elles resteront alors violettes.

L'étape 5 est une contre coloration ayant pour but de redonner aux bactéries Gram négatives précédemment décolorées une teinte rose permettant de les visualiser au microscope. Les bactéries à Gram positif restées violettes seront évidemment insensibles à cette contre-coloration plus pâle que violet imprégnant leur cytoplasme.

Ces différences de coloration et les différences de formes (bacille ou cocci) sont à l'origine de la classification des bactéries

Tableau 09: Table de Mac Grady pour 3 séries de 3 tubes (Eau)

Nombre de tubes positifs	Nombre de germes/100ml	Nombre caractéristique	Nombre de germes/100ml
001	3	300	23
010	3	301	39
100	4	302	64
101	7	310	43
110	7	311	75
111	11	312	120
120	11	320	93
200	9	321	150
201	14	322	210
210	15	330	240
211	20	331	460
220	21	332	1100
221	28	333	>2400

Tableau 10 : Table de Mac Grady pour 3 séries de 3 tubes (bivalves).

Nombre caractéristique	Nombre de germes/ml	Nombre caractéristique	Nombre de germes/ml	Nombre caractéristique	Nombre de germes/ml
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

NB : Le nombre de germes pris du tableau sera multiplier par 10, la chair et de liquide intervalvaire ont été dilués à 1/10.

Tableau 11: Normes de la qualité requise des eaux de baignades (directive européenne du 8 décembre 1975, reprise par le décret exécutif n° 91-980 du 20 septembre 1991. J.Off.Comm.Europ et par le décret exécutif N° :93-164 du 10 juillet 1993. JORA N° 46

Paramètres bactériologiques	Norme guide	Nombre impératif
Coliformes totaux/100ml	500	10000
Coliformes thermotolérants/100ml	100	2000
Streptocoques fécaux/100ml	100	-
Salmonelle	absence	absence

La directive européenne du 8 décembre 1975, reprise par le décret n° 91-980 du 20 septembre 1991, a établi les normes de qualité des eaux de baignade et les a classées en quatre catégories :

- o Catégorie A : bonne qualité, respect des valeurs guides et impératives de la directive.
- o Catégorie B : qualité moyenne, respect des normes impératives.
- o Catégorie C : pouvant momentanément être polluée (entre 5 et 33 % d'échantillons non conformes aux valeurs impératives).
- o Catégorie D : mauvaise qualité, trop fréquemment polluée (plus de 33 % d'échantillons non conformes aux normes impératives).

Ce classement attribué en fin de saison, partage d'une part, les eaux conformes (A et B) et d'autre part les eaux non conformes (C et D).

Tableau 12: Normes de la qualité des eaux conchylicoles (Communauté Européenne, 1991).

Paramètres	Zone A	Zone B	Zone C
Coliformes fécaux (nombre/100g de chair et de liquide intervalvaire)	> 300 et < 1 000 pour 90 % des échantillons	> 6000 et < 60 000 pour 90 % des échantillons	> 60 000 pour 90 % des échantillons
Escherichia coli (nombre/100g de chair et de liquide humide)	> 230 et <1000 pour 90 % des échantillons	> 4 600 et < 46 000 pour 90 % des échantillons	> 46 000 pour 90 % des échantillons

Les eaux conchylicoles sont, comme les eaux de baignade, classées en catégories de qualité. Il existe ainsi quatre zones :

- Zone A : zone où il est possible de récolter les coquillages pour une consommation humaine directe.
- Zone B : zone où les coquillages doivent faire l'objet d'une purification et/ou d'un reparcage d'une durée adaptée dans une zone de qualité A, avant d'être acceptés pour la consommation humaine.
- Zone C : comme la zone B, mais la purification doit être plus poussée ou le reparcage de beaucoup plus longue durée.
- Zone D : zone où il est impossible de récolter des coquillages pour la consommation humaine

Tableau 13 : Critères microbiologiques pour les coquillages bivalves (arrêté européen du 23 mars 1993).

Paramètres bactériologiques	Valeur guide
Coliformes thermotolérants	< 2.3.102 /100ml de chair et de liquide intervalvaire.
Stréptocoques fécaux	<2.5.103 /100ml de chair et de liquide intervalvaire.
Salmonelle dans 25 g	Absence.
Autre germes pathogènes et toxines	Absence.

⌘ Bouillon Lactosé bilié au vert brillant / cloche (BLBVB).

Usage :

Milieu de dénombrement des coliformes totaux (48 h à une température de 37°C.

Composition :

- Peptone 10,0g
- Lactose 10,0g
- Bile ddéshydratée 20,0ml
- Vert brillant 13,0 mg (pH = 7,4)

Préparation :

40 g par litre d'eau distillée. Stérilisation classique.

Lecture

La cloche de Durham permet le recueil des gaz signant la présence de coliformes, à condition que le milieu ait été agité correctement pour que les bactéries soient bien réparties, y compris sous la cloche. Il est conseillé d'agiter légèrement le milieu plusieurs heures avant la lecture