



**HAL**  
open science

# UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES DANS LA RÉALISATION DES CULTURES DE FORAMINIFÈRES SOUS FAIBLE VOLUME

E. Lagarde

► **To cite this version:**

E. Lagarde. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES DANS LA RÉALISATION DES CULTURES DE FORAMINIFÈRES SOUS FAIBLE VOLUME. Vie et Milieu , 1967, pp.27-35. hal-02951241

**HAL Id: hal-02951241**

**<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-02951241v1>**

Submitted on 28 Sep 2020

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES DANS LA RÉALISATION DES CULTURES DE FORAMINIFÈRES SOUS FAIBLE VOLUME

## SOMMAIRE

Ce travail est consacré à l'utilisation des antibiotiques dans la réalisation de cultures de Foraminifères. Dans une première partie, la discrimination des inhibiteurs convenables aux organismes en culture a été faite par deux méthodes, l'une manuelle, l'autre automatique utilisant un biophotomètre enregistreur (E.L.). La seconde phase de l'étude a consisté à rechercher empiriquement les concentrations des antibiotiques convenables à la culture des Foraminifères en circuit fermé, sous faible volume d'eau (Z. M. A.). Ces résultats sont très proches des valeurs obtenues dans la première partie.

## I. — ÉTUDE DE L'ACTION DES ANTIBIOTIQUES SUR LES MICROFLORES HÉTÉROTROPHES MARINES

par E. LAGARDE

*Laboratoire Arago, 66-Banyuls-sur-Mer*

## INTRODUCTION

Les recherches systématiques de l'action des antibiotiques sur les microflores bactériennes marines sont relativement rares; pourtant ces études ne sont pas dépourvues d'intérêt.

Fréquemment, en effet, des investigations d'ordre physiologique ou métabolique amènent les chercheurs à réaliser au laboratoire des cultures d'algues, d'organismes planctoniques, etc., en milieu exempt de bactéries.

Il pourrait sembler, à priori, aisé d'adjoindre à ces milieux divers antibiotiques, afin d'inhiber les proliférations bactériennes, mais certains composés présentent une réelle toxicité vis-à-vis des organismes en culture.

La détermination rigoureuse de l'activité des antibiotiques et le calcul de leurs doses optimales doivent ainsi être réalisés avant tout essai de culture. Ces expériences sont, à l'heure actuelle, grandement facilitées par l'emploi d'appareils de culture automatique, mais une méthodologie précise doit toutefois être respectée lors de la réalisation de ces essais préliminaires que nous allons décrire maintenant.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les milieux de culture utilisés pour l'étude de la croissance d'organismes marins, tels que foraminifères, algues, etc., sont en général assez pauvres. Ils sont le plus souvent exclusivement minéraux, certains comportent toutefois de faibles teneurs en matériel organique. Il faudra tenir compte de cette notion lors des essais d'inhibition des microflore bactériennes de contamination, dont la méthodologie différera par conséquent quelque peu de celle utilisée lors des estimations classiques, spécialement pour ce qui est de son aspect quantitatif.

Nous prendrons ici comme exemple les expériences réalisées avec Z. ARNOLD, lors de l'exécution de cultures de Foraminifères.

### 1) DÉTERMINATIONS QUALITATIVES

A partir d'un milieu de culture de Foraminifères pollué, nous avons effectué tout d'abord une culture d'enrichissement des microflore hétérotrophes contaminatrices, en milieu liquide, de composition suivante :

Eau de mer vieillie . . . . .	750 ml (1)
Eau distillée . . . . .	250 ml
Phosphate ferrique . . . . .	0,200 g
Bacto-peptone « Difco » ..	4 g
Yeast-extract « Difco » ...	1 g
pH = 7,4	

(1) Eau de mer prélevée au large, stabilisée par conservation de trois semaines au moins, à la température du laboratoire et à l'obscurité, et stockée dans un récipient en verre.

Le milieu, quelquefois trouble, doit être précipité à 120 °C pendant 20 minutes, filtré sur papier, réparti en tubes de 20 × 200, à raison de 10 ml par tube, ou en Erlenmeyer, puis stérilisé à nouveau à 112 °C pendant 20 minutes.

Il peut être solidifié par adjonction de 14 g par litre d'agar, pour la réalisation des essais de sélection des antibiotiques.

Après incubation de 36 à 48 heures à 20°, la culture d'enrichissement est centrifugée et lavée deux fois à l'eau de mer à 75 %, stérile. Cette suspension de bactéries non proliférantes conservée à + 4 °C servira aussi bien aux déterminations qualitatives qu'aux essais quantitatifs.

Le test qualitatif s'effectue par la méthode des disques de l'Institut Pasteur : on coule le milieu gélosé en boîtes de Pétri, sur 4 mm de hauteur environ. L'épaisseur du milieu doit être constante pour que la diffusion de l'antibiotique se réalise dans les meilleures conditions et que la reproductibilité du test soit optimale.

On ensemence sur toute la surface de la gélose une ou deux gouttes de la suspension bactérienne et on dispose à 2 cm environ du bord de la boîte une série de disques de papier buvard, imprégnés de divers antibiotiques (disques fournis par l'Institut Pasteur).

La lecture se fait après 36 à 48 heures d'incubation à 20 °C, l'efficacité de l'antibiotique étant fonction du diamètre de la zone d'inhibition observée autour des disques.

## RÉSULTATS

Dans le cas particulier de l'étude des contaminations des cultures de Foraminifères, nous avons ainsi testé 15 antibiotiques; les résultats de nos observations sont consignés dans le tableau 1.

Ainsi, sur les 15 antibiotiques testés, 4 seulement ont montré une activité intéressante. Ces résultats ne nous ont pas cependant étonné, étant donné la forte proportion de souches mobiles à Gram négatif composant la microflore de contamination testée.

### 2) DÉTERMINATIONS QUANTITATIVES

Les investigations précédentes ont permis de sélectionner les composés actifs sur les microflores bactériennes considérées, il restera à déterminer les quantités optimales d'antibiotiques à adjoindre aux milieux afin d'éviter les contaminations.

TABLEAU 1

Antibiotiques	Diamètre de la zone d'inhibition en mm.
Bacitracine	0
Framycétine	0
Colimycine	20
Spiramycine	0
Auréomycine	0
Erythromycine	0
Pénicilline	0
Chloramphénicol	26
Streptomycine	21
Terramycine	0
Tétracycline	0
Kanamycine	0
Novobiocine	0
Polymyxine	20
Néomycine	12

Nous traiterons ici, seulement, de l'application du pouvoir bactériostatique des antibiotiques, la détermination du pouvoir bactéricide requiert en effet des techniques particulières du ressort du spécialiste.

Deux méthodes peuvent être employées dans ce but, l'une dite manuelle ne nécessite qu'un minimum de matériel, l'autre, automatique, utilise un appareillage spécial (Figure 1).

a) *Méthode manuelle*

1. On prépare tout d'abord des solutions mères, en eau de mer à 75 % filtrée sur membranes d'acétate de cellulose (porosité 0,45  $\mu$ ), des divers antibiotiques retenus. (En principe ces solutions sont à 100 mg par litre.)

2. On répartit dans des petits flacons stérilisés des quantités croissantes des antibiotiques testés, seuls ou en association. Les flacons du type pénicilline (26 ml) conviennent parfaitement.

3. A un milieu de composition suivante :

Eau de mer vieillie . . . . .	1 000 ml
Bacto-Peptide « Difco » . . . . .	0,050 g
Yeast-extract « Difco » . . . . .	0,050 g

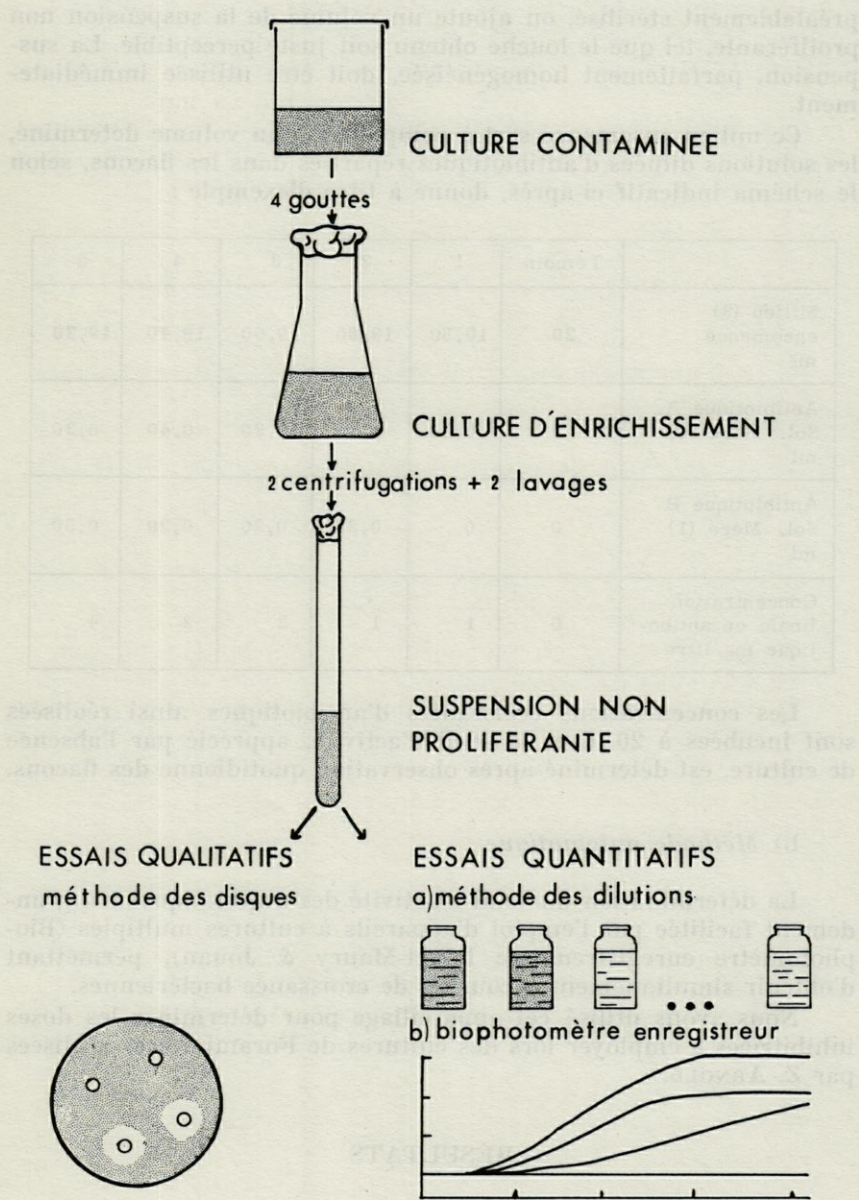


Fig. 1. — Schéma indiquant la méthodologie des essais à effectuer en vue de l'appréciation de l'action des antibiotiques.

préalablement stérilisé, on ajoute un volume de la suspension non proliférante, tel que le louche obtenu soit juste perceptible. La suspension, parfaitement homogénéisée, doit être utilisée immédiatement.

Ce milieuensemencé sert à compléter, à un volume déterminé, les solutions diluées d'antibiotiques réparties dans les flacons, selon le schéma indicatif ci-après, donné à titre d'exemple :

	Témoin	1	2	3	4	5
Milieu (3)ensemencé ml	20	10,80	19,80	19,60	19,40	19,20
Antibiotique A Sol. Mère (1) ml	0	0,20	0	0,20	0,40	0,30
Antibiotique B Sol. Mère (1) ml	0	0	0,20	0,20	0,20	0,50
Concentration finale en antibiotique mg/litre	0	1	1	2	3	4

Les concentrations croissantes d'antibiotiques ainsi réalisées sont incubées à 20 °C et le seuil d'activité, apprécié par l'absence de culture, est déterminé après observation quotidienne des flacons.

### b) Méthode automatique

La détermination du seuil d'activité des antibiotiques est grandement facilitée par l'emploi d'appareils à cultures multiples (Biophotomètre enregistreur de Bonet-Maury & Jouan), permettant d'obtenir simultanément 6 courbes de croissance bactériennes.

Nous avons utilisé cet appareillage pour déterminer les doses inhibitrices à employer lors des cultures de Foraminifères réalisées par Z. ARNOLD.

## RÉSULTATS

La figure 2 montre l'allure des courbes de croissance obtenues au biophotomètre-enregistreur, en fonction de diverses concentrations de Streptomycine et de Chloramphenicol.

DENSITE OPTIQUE

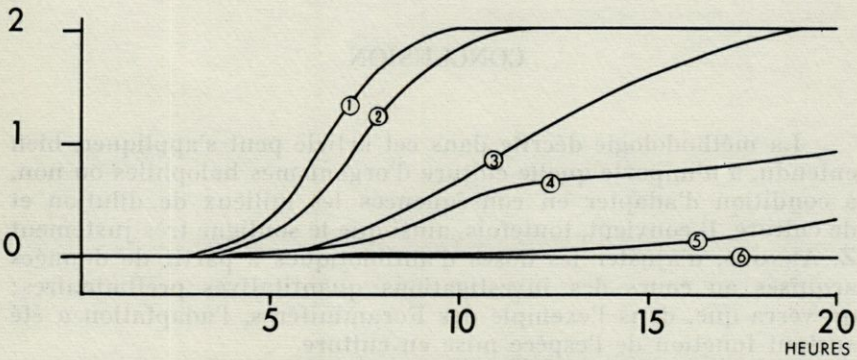


FIG. 2. — Courbes de croissance de la microflore hétérotrophe provenant d'une culture de Foraminifères, en fonction de diverses concentrations de Streptomycine et de Chloramphénicol :

- 1 — Témoin sans antibiotique.
- 2 — Streptomycine : 1 mg/litre.
- 3 — Chloramphénicol : 1 mg/litre.
- 4 — Chloramphénicol : 1 mg + Streptomycine : 1 mg/litre.
- 5 — Chloramphénicol : 2 mg + Streptomycine : 2 mg/litre.
- 6 — Chloramphénicol : 3 mg + Streptomycine : 2,5 mg/litre.

La microflore hétérotrophe, testée lors de ces essais, a donc été trouvée sensible à l'association : Streptomycine + Chloramphénicol aux concentrations de 2,5 mg par litre pour chaque antibiotique, nous reviendrons plus loin sur l'importance de la détermination précise de ces doses inhibitrices.

Nous avons par la même méthode étudié les deux autres composés qui avaient montré une bonne activité lors des essais qualitatifs, à savoir la Colimycine et la Polymyxine; les résultats de nos investigations sont consignés dans le tableau 2 ci-après :

TABLEAU 2  
*Action des antibiotiques  
sur la croissance des microflores hétérotrophes aérobies  
contaminatrices des cultures de Foraminifères*

Chloramphenicol		1	1		1	1	2				2	2,5	3	2		3	5	
Streptomycine		1		1	1		2			2		2,5				5	2	5
Polymyxine	5	1	1	1		2								2	2			
Colimycine							2	5	2	2								
Résultats	±	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	+	-	-	-	-	-	

+ : Croissance

- : Inhibition

± : Douteux



## CONCLUSION

La méthodologie décrite dans cet article peut s'appliquer, bien entendu, à n'importe quelle culture d'organismes halophiles ou non, à condition d'adapter en conséquences les milieux de dilution et de culture. Il convient, toutefois, ainsi que le souligne très justement Z. ARNOLD, d'ajuster les doses d'antibiotiques à partir de données acquises au cours des investigations quantitatives préliminaires; on verra que, dans l'exemple des Foraminifères, l'adaptation a été surtout fonction de l'espèce mise en culture.

Depuis l'achèvement des travaux entrepris à Banyuls avec Z. ARNOLD, nous avons eu à maintes reprises l'occasion de pratiquer des investigations analogues, avec des chercheurs travaillant sur différents groupes. La méthodologie décrite ici nous a toujours permis de résoudre rapidement le problème de la contamination des cultures. La seule difficulté réside dans le choix de la concentration optimale d'antibiotiques qui ne doivent, en aucun cas, perturber le développement des organismes en culture. Nous avons, à ce propos, remarqué l'apparition de certaines lésions tératologiques sur lesquelles nous reviendrons dans un prochain article.

## RÉSUMÉ

L'inhibition des microflores de contamination, présentes dans les cultures de divers organismes, peut être facilement réalisée par l'emploi d'antibiotiques judicieusement choisis. La discrimination des inhibiteurs nécessite une étude préalable indispensable, car le choix des doses optimales est fonction de la susceptibilité des organismes en culture aux antibiotiques et à leur association. Une méthode simple d'appréciation des quantités adéquates à utiliser est décrite dans le présent article.

## SUMMARY

The inhibition of contaminating microfloras in cultures of various organisms can easily be achieved by the judicious use of wisely chosen antibiotics. Discriminating between inhibitors requires

a preliminary study, however, since the choice of optimal dosages is a fonction of the susceptibility of the organisms to the antibiotics and to the combination in which they are used. A simple method of determining adequate quantities for the purpose is described in the present article.

### ZUSAMMENFASSUNG

Das Aufkommen einer verunreinigenden Mikroflora, welche sich in den Aufzuchten verschiedener Organismen findet, ist leicht zu verhindern durch geschickt gewählte und angewendete Antibiotica. Die Auslese von inhibierenden Substanzen bedarf vorangehender Untersuchungen, denn die Wahl der optimalen Dosis ist abhängig von der Empfindlichkeit der aufgezogenen Organismen gegenüber den Antibiotica und den mit ihnen verbundenen Substanzen. Eine einfache Bestimmungsmethode der zu gebrauchenden, angemessenen Quantitäten wird in dieser Arbeit beschrieben.