

Utilisation du bouillon sélénite F modifié pour dénombrer *Salmonella* dans les milieux aquatiques

Modified Selenite broth
for enumerating environmental *Salmonellae* from
environmental waters

B. BALEUX, J. ALIBOU, M. TROUSSELLIER, P. GOT (1)

RÉSUMÉ

Ce travail a pour objet de présenter une nouvelle méthode de dénombrement des *Salmonella* dans différents types d'eaux (de rivière, saumâtre, eaux usées brutes et épurées) basée sur l'utilisation d'un milieu d'enrichissement au sélénite additionné de Novobiocine et de Pril et sur une adaptation de la technique du N.P.P. à l'ensemencement d'échantillons de grands volumes après filtration permettant de quantifier les très faibles concentrations de *Salmonella*. Les vérifications des performances de cette méthode d'isolement et de quantification sont basées sur l'étude des croissances de différentes souches de *Salmonella* et d'autres espèces bactériennes dans le milieu d'enrichissement modifié, ainsi que sur les résultats quantitatifs et qualitatifs fournis par cette méthode lorsqu'elle est appliquée à des échantillons d'eau en provenance de l'environnement aquatique. Ces résultats montrent notamment que la méthode proposée est suffisamment sensible pour détecter 1 à 2 *Salmonella* dans 10 litres d'eau analysée et qu'elle ne paraît pas exclure de sérotypes, du moins parmi ceux les plus fréquemment isolés en France. L'efficacité de la méthode standardisée API Z pour l'identification enzymatique du genre *Salmonella* a été également testée en référence aux résultats de la sérotypie.

SUMMARY

This paper presents a new method for enumerating *Salmonella* in environmental waters (freshwater, brackishwater, sewage

(1) Laboratoire d'Hydrobiologie marine et Continentale U.A. 694 CNRS.
U.S.T.L. Place Eugène Bataillon, 34060 Montpellier Cédex.

and treated waters) using the F Selenite enrichment broth modified by the addition of Novobiocin and Pril, and an adaptation of the M.P.N. method for the inoculation of large amounts of water after filtration to improve the enumeration of low concentrations of *Salmonella*. The verification of the performance of this detection and enumeration method are based on the study of the growth of different *Salmonella* species and of others bacterial species in the modified enrichment broth, and on the quantitative and qualitative results obtained by the application of this methodology to aquatic environmental samples. These results show on one hand, that the sensitivity of the proposed method allows to enumerate 1 to 2 *Salmonella* in 10 liter samples, and on the other hand that this method to not exclude any serovar from those which are the most frequently isolated in France. The efficiency of the API Z standardized method for the *Salmonella* enzymatic identification versus serological identification was also verified.

INTRODUCTION

Le contrôle de la qualité des eaux est pratiqué par le dénombrement des bactéries témoins de contamination fécale. Si celui-ci apporte, sans contestation, la preuve d'une contamination fécale de l'eau, il sous-entend la possibilité de la présence concomitante de bactéries pathogènes fécales. Cette méthode "indirecte" qui permet, suivant des seuils standard, de définir le bon usage des eaux à des fins, par exemple, de loisir, de baignade, d'aquaculture, est de mise en oeuvre facile et peu onéreuse à l'inverse de la méthode "directe", c'est-à-dire celle qui consiste à dénombrer effectivement les bactéries pathogènes dans les eaux. Il demeure que seule la qualification et surtout la quantification des bactéries pathogènes apporte la preuve d'un risque sanitaire réel. En vue de rendre plus abordable la quantification, dans les eaux de surface et usées, des *Salmonella*, bactéries pathogènes très souvent rencontrées dans les milieux aquatiques et source potentielle d'infections pour l'homme, nous proposons dans cette note compte tenu des milieux de culture et des méthodes déjà existants (LECLERC *et al.*, 1970 ; HARVEY and PRICE, 1976 ; PRESNELL and ANDREWS, 1976 ; HUGUES *et al.*, 1977 ; EDGAR and SOAR, 1979 ; MÜLLER, 1980 ; AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1985 ; MORINIGO *et al.*, 1986) une méthodologie alliant à un nouveau milieu d'enrichissement une technique de quantification qui associe la filtration et le calcul du nombre le plus probable. L'approche d'une quantification réaliste de cette bactérie pathogène devrait permettre de mieux connaître les relations existantes entre *Salmonella* et les bactéries témoins de contamination fécale pour apprécier le rôle de prédiction de ces dernières vis-à-vis des bactéries pathogènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches de référence utilisées dans cette étude sont : *Salmonella paratyphi B* (*S. schottmuelleri*) 10719 A.T.C.C. ; *Salmonella enteritidis*, 13076 A.T.C.C. ; *Salmonella typhimurium*, 13311 A.T.C.C. ; *Escherichia coli*, 14948 A.T.C.C. ; *Citrobacter freundii*, I.U.T. 34 ; *Klebsiella pneumoniae*, 13883 A.T.C.C. ; *Enterobacter cloacae*, 13047 A.T.C.C. ; *Proteus vulgaris*, 13315 A.T.C.C. ; *Providencia stuartii*, I.U.T. 34 ; *Yersinia enterocolitica*, 0780 MEZE ; *Bacillus subtilis*, 6051 A.T.C.C. ; *Micrococcus sp.*, I.U.T. 34.

Milieux d'enrichissement

Compte tenu des résultats de différents auteurs (cités dans l'introduction), les croissances de souches de *Salmonella* de référence ont d'abord été testées sur trois types de milieu d'enrichissement incubés à 43 °C : (i) bouillon au tetrathionate (Institut Pasteur Production) additionné, pour 1 litre de bouillon, de 20 ml d'une solution iodo-iodurée (iode : 6 g.l⁻¹ ; iodure de potassium : 5 g.l⁻¹) et de novobiocine (45 mg.l⁻¹ ; Sigma) ; (ii) bouillon au sélénite F additionné de la même concentration en novobiocine (S) ; (iii) un mélange de ces deux bouillons à part égale, additionné de la même concentration en novobiocine. La croissance des trois souches est estimée par ensemencement d'un échantillon de chaque tube sur gélose nutritive et dénombrement des colonies formées après 48 heures d'incubation à 37 °C. Un quatrième milieu contenant un ammonium quaternaire, le Pril (Sulfate d'alkyl primaire + sulfonate d'alkylbenzène) a été testé sur les souches de référence pour essayer d'augmenter la sélectivité du milieu d'enrichissement en inhibant, entre autres, les souches de *Proteus* (DÖLL, 1956) qui prolifèrent dans les milieux d'enrichissement traditionnels pour *Salmonella* (PENNER, 1984), sans pour autant limiter la croissance des *Salmonella*. La croissance ou l'inhibition des différentes souches (trois *Salmonella*, sept souches de la famille des *Enterobacteriaceae*, un bacille et un coccus Gram +) est testée par inoculation d'un ml d'une culture de 24 heures de chacune de ces souches (concentration : entre 1 et 2,5.10⁶ bactéries par ml) dans le milieu d'enrichissement proposé : bouillon sélénite F (bioMérieux) + novobiocine (45 mg.l⁻¹) + Pril (200 mg.l⁻¹, Henkel), pH 7, par comparaison des densités optiques mesurées par lecture spectrophotométrique à 770 nm après 24 heures d'incubation dans un bain marie à 43 °C.

Principe de quantification et de confirmation

Les tubes d'enrichissement sont ensemencés avec des volumes décroissants des échantillons d'eau à analyser. Pour des volumes d'eau ne dépassant pas 25 ml, les échantillons sont introduits directement dans les tubes contenant le milieu d'enrichissement pour former une série d'ensemencements compatible avec le calcul du Nombre le Plus Probable (N.P.P.). Lorsque les concentrations en *Salmonella* sont très faibles, il est indispensable de recourir à la filtration de volumes d'eau parfois très importants (1 litre voire 10 litres) et d'associer la technique de filtration sur membrane et le N.P.P. tel que proposé par PRESNELL and ANDREWS (1976). Par suite de la charge en matière en suspension il est souvent nécessaire d'utiliser, pour un même échantillon, plusieurs pré-filtres (WHATMAN, GF/C) et membranes filtrantes (Millipore 0,45 µm). Ceux-ci sont placés directement dans des tubes contenant 50 ml

du bouillon d'enrichissement pour former, comme dans le cas précédent, une série compatible avec les calculs du N.P.P.. Seuls les tubes dans lesquels une culture s'est développée, après 24 heures d'incubation à 43 °C et à partir de laquelle après dilutions successives il a été possible d'isoler au moins une colonie de *Salmonella*, sont considérés comme positifs et pris en compte dans les calculs subséquents. Les cultures et leurs dilutions développées dans les tubes d'enrichissement sont ensemencées en vue de l'isolement des *Salmonella* sur le milieu *Salmonella shigella* agar (SS gélose/agar-bioMérieux-) choisi, après essais, en raison de sa forte concentration en sels biliaires, inhibiteurs de la flore secondaire. Après incubation à 37 °C pendant 48 heures seules les colonies transparentes à centre noir sont prélevées et soumises à identification. La première étape de l'identification passe par la recherche simultanée de plusieurs tests enzymatiques au moyen de la méthode standardisée API Z (Api system). Cette recherche permet d'éliminer les souches n'appartenant pas au genre *Salmonella* pour ne conserver que les souches présentant une forte présomption confirmée dans l'étape ultime du sérotypage.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Choix d'un milieu d'enrichissement et d'isolement

Les résultats concernant la comparaison des milieux d'enrichissement "standard" sont présentés sur le tableau 1, sous forme du facteur d'accroissement de la concentration (numération à 24 heures/numération à T_0) des différentes souches de *Salmonella* testées au bout de 24 heures d'incubation à 43 °C par rapport à leur concentration initiale.

Tableau 1.- Taux d'accroissement des abondances de trois espèces de *Salmonella* (numération à 24 heures/numération à T_0) dans les différents milieux d'enrichissement. (- : taux d'accroissement non calculé. Au bout de 24 heures la concentration en bactéries est inférieure à celle de l'ensemencement).

Milieu d'enrichissement	souches testées		
	<i>Salmonella paratyphi B</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
Tétrathionate + novobiocine (45 mg.l ⁻¹)	14	86,6	66,6
Sélénite + novobiocine (45 mg.l ⁻¹)	150	300	2860
Tétrathionate + Sélénite + novobiocine (45mg.l ⁻¹)	-	4	-

Le bouillon au sélénite additionné de novobiocine apparaît comme le plus favorable à un accroissement de la concentration en *Salmonella*. Le bouillon au tetrathionate additionné de la même concentration de novobiocine conduit à un enrichissement beaucoup moins important des concentrations des trois souches de *Salmonella* testées. Le milieu composé du mélange des deux précédents bloque le développement de deux des souches testées et ne permet qu'un accroissement très faible de *Salmonella enteritidis*.

A partir du milieu qui permettait la meilleure croissance de *Salmonella* (bouillon au sélénite + novobiocine : S) nous avons souhaité augmenter sa sélectivité par rapport à la flore d'accompagnement et principalement *Proteus* par l'ajout d'un inhibiteur, le Pril, dans les conditions indiquées dans la section Matériel et Méthodes. Les résultats comparatifs de la croissance dans le milieu d'enrichissement S + Pril des trois souches de *Salmonella* par rapport aux neuf autres souches bactériennes sont reportés dans le tableau 2.

Tableau 2.- Résultats des croissances des différentes espèces bactériennes dans le milieu Sélénite-Novobiocine-Pril.
(D.O. : densité optique).

Souche testée	D.O.	Souche testée	D.O.	Souche testée	D.O.
<i>S. enteritidis</i>	0,22	<i>Providencia stuartii</i>	0,28	<i>Citrobacter sp.</i>	0,00
<i>S. paratyphi B</i>	0,13	<i>Escherichia coli</i>	0,15	<i>Yersinia enterocolitica</i>	0,00
<i>S. typhimurium</i>	0,09	<i>Enterobacter cloacae</i>	0,09	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,00
		<i>Proteus vulgaris</i>	0,01	<i>Bacillus subtilis</i>	0,00
				<i>Micrococcus sp.</i>	0,00

Ces résultats montrent que les trois espèces de *Salmonella* testées peuvent se développer dans le bouillon S + Pril. Cinq des autres souches testées sont incapables de réaliser une croissance en 24 heures dans ce bouillon. Enfin le développement de *Proteus vulgaris* est fortement inhibé. Seules trois autres espèces d'Enterobactéries semblent croître de façon comparable à *Salmonella* dans ce milieu d'enrichissement. Il est possible cependant de les différencier de *Salmonella*, à l'étape suivante, au niveau de leur aspect sur le milieu d'isolement. Sur milieu SS Gélose/agar seules les souches de *Salmonella* (hormis celles de *Proteus* et de *Citrobacter* qui sont totalement ou partiellement inhibées dans le milieu d'enrichissement proposé) formeront des colonies transparentes à centre noir (lactose (-), H₂S (+)).

Vérification des performances de la méthodologie utilisée

A partir de six échantillons issus des eaux usées urbaines la méthode de quantification telle que décrite dans la section Matériel et Méthodes a été appliquée et ses performances ont été analysées, notamment en isolant et en identifiant à partir des tubes de N.P.P. positifs des colonies bactériennes transparentes à centre noir sur milieu SS gélose/agar. Sur 425 colonies transparentes à centre noir, 277 ont été identifiées comme appartenant au genre *Salmonella*, soit 65,1 % des colonies présumptives. Bien que ce pourcentage soit relativement élevé ce résultat indique la nécessité de confirmer les tubes d'enrichissement positifs

et ne permet pas de s'affranchir d'une vérification des colonies transparentes à centre noir formées sur le milieu SS gélose/agar. Par contre la concordance totale entre les indications données par le système API 2 et celles issues des diagnostics sérologiques permet de proposer de limiter les processus de confirmation au seul emploi de ce dispositif, dans la mesure où l'on ne désire pas accéder à l'identification sérologique d'une façon impérative.

Le tableau 3 montre les résultats des dénombrements obtenus sur ces échantillons, soit en considérant tous les tubes du N.P.P. ayant donné un trouble (N.P.P. total), soit uniquement ceux où la présence de *Salmonella* a été confirmée (N.P.P. *Salmonella*).

Tableau 3.- Comparaison des valeurs moyennes de N.P.P. obtenues soit sans tenir compte d'une confirmation des tubes positifs (N.P.P. total), soit en tenant compte des seuls tubes où la présence de *Salmonella* a été confirmée (N.P.P. *Salmonella*).

	échantillons					
	I	II	III	IV	V	VI
N.P.P. total (l^{-1})	$9,2 \cdot 10^5$	$1,6 \cdot 10^5$	$6,0 \cdot 10^5$	$8,0 \cdot 10^5$	$3,6 \cdot 10^6$	$6,0 \cdot 10^5$
N.P.P. <i>Salmonella</i> (l^{-1})	$9,6 \cdot 10^3$	$3,6 \cdot 10^2$	$8,0 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^2$	$1,6 \cdot 10^2$	$6,0 \cdot 10^1$

Les différences obtenues entre ces deux séries de dénombrements montrent toute l'importance de l'étape de confirmation pour quantifier de façon réaliste les concentrations en *Salmonella*.

A titre d'exemple d'application de la méthode de quantification, le tableau 4 représente l'évolution des concentrations en *Salmonella* dénombrées par la méthode du N.P.P. (3 séries de 3 tubesensemencés avec les membranes filtrantes sur lesquelles ont été filtrées 3×1 litre, 3×100 ml et 3×10 ml d'eau à analyser) dans les eaux d'un étang saumâtre (étang de Thau) recevant des eaux usées urbaines épurées par lagunage.

La méthode employée permet de dénombrer *Salmonella* jusqu'à des concentrations minimales de 0,16 *Salmonella* par litre soit, par extrapolation, entre 1 et 2 *Salmonella* dans 10 litres d'eau.

Dans un deuxième temps, au cours des années 1984-1986, la méthode de quantification a été appliquée à un nombre beaucoup plus important d'échantillons d'eau (283) en provenance d'une plus grande diversité de milieux aquatiques (différents types d'ouvrages épurateurs, milieu lagunaire, milieu marin côtier ...). Sont reportés ici que les résultats concernant la diversité des sérotypes rencontrés dans ces différents échantillons afin de juger de l'éventuelle sélectivité de la méthode d'enrichissement vis-à-vis de certains sérotypes, sélectivité qui peut constituer un inconvénient majeur d'un milieu d'enrichissement, notamment lors de son emploi dans des études à des fins épidémiologiques. Sur 3780 souches de *Salmonella* isolées et sérotypées à partir des différents échantillons d'eau, 44 sérotypes différents ont été mis en évidence. Le tableau 5 présente la liste de ces sérotypes rangés par ordre décroissant de fréquence d'isolement, toutes origines confondues.

Tableau 4.- Séries de dénombrements temporels des Salmonella dans un étang saumâtre : valeur du N.P.P. l⁻¹ et limites supérieures et inférieures de son intervalle de confiance au seuil de 95 % de probabilité.

Dates	N.P.P. l ⁻¹	Limite sup. (95%)	Limite inf. (95%)	Dates	N.P.P. l ⁻¹	Limite sup.(95%)	Limite inf.(95%)
08/10/84	0,80	4,20	0,20	24/09/85	0,16	5,16	0,04
21/11/84	1,60	8,40	0,40	22/10/85	0,16	5,16	0,04
17/12/84	6,00	20,00	2,00	18/11/85	3,60	15,20	0,80
14/01/85	1,60	8,40	0,40	16/12/85	3,60	15,20	0,80
11/02/85	9,20	51,60	2,80	13/01/86	0,16	5,16	0,04
11/03/85	0,16	5,16	0,04	10/02/86	3,60	15,20	0,80
09/04/85	0,00	-	-	10/03/86	0,16	5,16	0,04
06/05/85	1,60	8,40	0,40	07/04/86	0,00	-	-
03/06/85	0,00	-	-	06/05/86	0,00	-	-
01/07/85	0,00	-	-	02/06/86	3,60	15,20	0,80
29/07/85	3,60	15,20	0,80	30/06/86	1,60	8,40	0,40
26/08/85	0,00	-	-				

Tableau 5.- Liste des 44 sérotypes de Salmonella par ordre décroissant de fréquence relative.

espèce	%	espèce	%	espèce	%	espèce	%
<i>S. para B</i>	37,10	<i>S. hadar</i>	1,64	<i>S. minneapolis</i>	0,45	<i>S. djugu</i>	0,05
<i>S. branderup</i>	9,10	<i>S. heidelberg</i>	1,37	<i>S. sandiego</i>	0,42	<i>S. aba</i>	0,02
<i>S. typhimurium</i>	6,98	<i>S. ibadan</i>	1,16	<i>S. kedougou</i>	0,34	<i>S. bukuru</i>	"
<i>S. virchow</i>	5,79	<i>S. montevidéo</i>	0,90	<i>S. newington</i>	0,32	<i>S. H caledon</i>	"
<i>S. agona</i>	5,10	<i>S. enteritidis</i>	0,84	<i>S. saintpaul</i>	0,31	<i>S. easibourn</i>	"
<i>S. goldcoast</i>	4,95	<i>S. grampian</i>	0,76	<i>S. poona</i>	0,29	<i>S. larochelle</i>	"
<i>S. newport</i>	4,79	<i>S. london</i>	0,68	<i>S. canada</i>	0,21	<i>S. manhattan</i>	"
<i>S. bovis morbificans</i>	2,09	<i>S. bredeney</i>	0,66	<i>S. salinatis</i>	0,21	<i>S. H nachshonim</i>	"
<i>S. panama</i>	3,70	<i>S. brandenburg</i>	0,58	<i>S. isangi</i>	0,10	<i>S. weltevreden</i>	"
<i>S. anatum</i>	3,30	<i>S. livingston</i>	0,55	<i>S. ohio</i>	0,10	<i>S. wien</i>	"
<i>S. infantis</i>	2,14	<i>S. blockley</i>	0,50	<i>S. papuana</i>	0,10	<i>S. zuilen</i>	"

Par l'utilisation de la méthode décrite dans la présente note nous avons isolé à partir de biotopes aquatiques variés 21 des 27 sérotypes les plus fréquemment ($\geq 0,5$ %) isolés en France, toutes origines confondues au cours des années 1980-1983, par Le Minor et collaborateurs (Le Minor *et al.*, 1985). Cette constatation tend à indiquer que la méthode proposée ne paraît pas exclure de sérotypes, bien que d'une part la température d'incubation utilisée puisse bloquer en partie le développement de certains d'entre eux (GREENFIELD and BIGLAND, 1970) et que les résultats de croissance obtenus sur les souches pures dans le milieu d'enrichissement proposé indiquent des croissances plus nettes pour certaines souches de *Salmonella* que pour d'autres. La solution idéale qui permettrait d'obtenir une croissance égale de tous les sérotypes de

Salmonella tout en empêchant celle des autres bactéries présentes dans le même échantillon n'existe pas. Seul un compromis tel que celui que nous proposons dans cette note paraît actuellement réaliste.

REMERCIEMENTS

Cette étude a bénéficié d'un financement de l'Agence de bassin Rhône-Méditerranée-Corse (convention n° 85.0951). Nous tenons à remercier particulièrement Monsieur G. Larbaigt, chargé de mission recherches dans cet organisme, pour ses conseils dans la réalisation de cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (1985). Standard methods for the examination of water and wastewater. 16th ed. APHA, Inc., Washington D.C..
- DÖLL W. (1956). Hemmung des schwärmens von *Proteus* bakterien durch oberflächennaktive substanzen (Pril und Rei). *Zent. bl. Bakt. Parasitkde Abt. Orig.*, 166: 43-47.
- EDGAR D., SOAR M.S. (1979). Evaluation of culture media for the isolation of *Salmonellas* from sewage sludge. *J. Appl. Bacteriol.*, 47: 237-241.
- HARVEY R.W.S., PRICE T.H. (1976). Isolation of *Salmonella* from sewage-polluted river water using selenite F and Muller-Kauffmann tetrathionate. *J. Hyg.*, 77: 333-341.
- GREENFIELD J., BIGLAND C.M. (1970). Selective inhibition of certain enteric bacteria by selenite media incubated at 35 °C and 43 °C. *Can. J. Microbiol.*, 16: 1267-1271.
- HUGUES B., PLISSIER M., PAGLIARDINI A., ROULET M. (1977). Efficacité comparée des milieux d'enrichissement au sélénite et au tétrathionate de sodium pour la recherche de *Salmonella* dans les eaux usées. *Rev. Inst. Pasteur Lyon*, 10: 79-86.
- LECLERC H., CATSARAS H., SAVAGE C., EYMARD C. (1970). Sur l'isolement des *Salmonella* dans les milieux fortement pollués : essais sur des eaux résiduelles. *Ann. Inst. Pasteur Lille*, XXI: 277-294.
- LE MINOR L., LE MINOR S., GRIMONT P.A.D. (1985). Rapport quadriennal du centre national des *Salmonella* sur l'origine et la répartition en sérotypes des souches isolées en France continentale au cours des années 1980 à 1983. *Rev. Epidem. et Santé Publ.*, 33: 13-21.
- MORINIGO M.A., BORREGO J.J., ROMERO P. (1986). Comparative study of different methods for detection and enumeration of *Salmonella* spp. in natural waters. *J. Appl. Bacteriol.*, 61: 169-176.
- MÜLLER H.E. (1980). Vergleichende untersuchungen über die effizienz von Selenit- und Tetrathionat-brühe und von Leifson- und Wilson-Blair-agar bei der isolierung von Salmonellen. *Zent. bl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. Abt., I*, 248: 202-209.
- PENNER J.L. (1984). *Proteus* In : *Bergey's manual of systematic bacteriology*, vol. I, Krieg, N.R. editor, Williams & Wilkins, Baltimore : 491-492.
- PRESNELL M.W., ANDREWS W.H. (1976). Use of the membrane filter and a filter aid for concentrating and enumerating indicator bacteria and *Salmonella* from estuarine waters. *Water Res.*, 10: 549-554.