

Vibrio alginolyticus et germes apparentés
isolés des moules des côtes françaises de Méditerranée

par

B. BRISOU, P.E. PHOLOPPE et A. BOUDON

Service de Biologie Médicale de l'Hôpital d'Instruction des Armées Ste Anne, Toulon (France)

Résumé

Du mois de janvier au mois de juillet 1974, 70 broyats de moules provenant de Sète et de la rade de Toulon, ont été traités de manière à isoler des vibrions halophiles. Tous les prélèvements se sont avérés positifs et 28 souches ont été soumises à un examen plus approfondi. Ces germes font partie du groupe *V. alginolyticus* défini par SAKAZAKI. Le nom du genre est sujet à discussions, les auteurs donnant la préférence au genre *Beneckea* tel qu'il a été redéfini par BAUMANN. La première description de ce type de bactéries semble due à DEFRESSINE & CASENEUVE qui en isolèrent plusieurs souches en 1911 au laboratoire de bactériologie de l'Hôpital Maritime de Toulon.

Mots clés : *Vibrio*, *Beneckea*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, moules.

Summary

From January to July 1974, 70 mussels-pounds from Sete and Toulon have been treated in order to isolate halophile vibrions. All the samples were positive and 28 of them were tested more deeply. These genus belong to the *V. alginolyticus* group as definite by SAKAZAKI. The genus name is to be discussed and the authors agree with the BAUMANN's conception of *Beneckea* genus. The first description of this kind of bacterias seems to be reported to DEFRESSINE & CASENEUVE who isolated many strains in 1911 at the bacteriological laboratory of the Naval Hospital of Toulon.

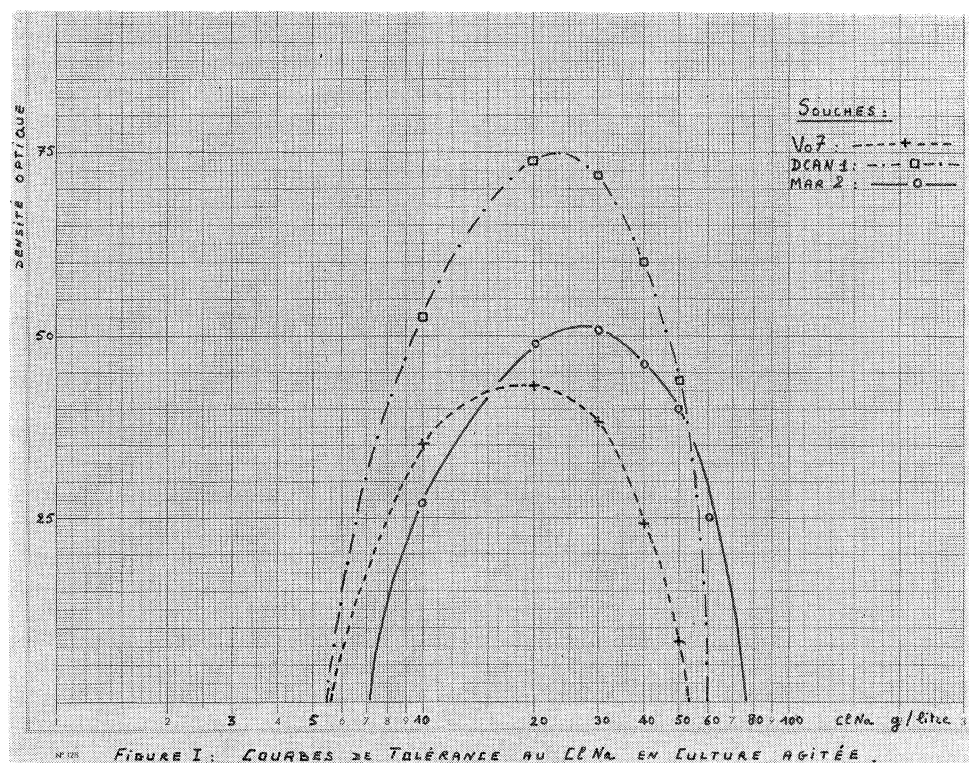
*
* *

En novembre 1911 une épidémie de choléra sévissait à bord de plusieurs bâtiments de la Marine Nationale en rade de Toulon. Le laboratoire de l'Hôpital Maritime entreprenait une étude de la population vibrionienne de l'eau de mer et des moules de cette rade pour rechercher une éventuelle source de contamination au niveau des fruits de mer. DEFRESSINE & CASENEUVE [15] découvrirent ainsi un vibron non cholérique qui paraissait être un hôte habituel des moules.

A partir des années 50, les auteurs japonais démontraient le rôle de *Vibrio parahaemolyticus* dans certaines gastro-entérites succédant à l'ingestion de produits marins. Depuis 1970 ce vibron fut isolé de coprocultures et des eaux côtières dans plusieurs pays (2-3). Les variétés biochimiques se multipliant, de nombreuses études taxinomiques tentèrent d'éclaircir la situation de ce groupe microbien.

Poursuivant une évaluation de la pollution microbienne des eaux de la région toulonnaise [9-10-11], le laboratoire de bactériologie de l'Hôpital d'Instruction des Armées de Ste Anne a procédé à l'analyse de broyats de moules en utilisant une méthodologie propre à isoler préférentiellement les germes halophiles. Le vibron de DEFRESSINE & CASENEUVE fut isolé dans tous les lots et la présente étude tente de faire le bilan des variétés rencontrées.

Rapp. Comm. int. Mer Médit., 23, 6, pp. 117-125, 5 figs. (1976).



I — Matériel et méthodes

1 — Isolements

Les isolements sont pratiqués à partir de lots de moules dans les heures suivant leur ramassage. Les mollusques sont ouverts stérilement, leur chair est recueillie et broyée au mixer avec l'eau intervalvaire. Des dilutions de raison 10 sont effectuées en eau peptonée salée à 3 %, ajustée à pH 8,5. Après 24 heures d'étuve à 37° les isolements sont pratiqués sur gélose T.C.B.S. Parallèlement 0,05 ml de la dilution au 1/100 sont étalés au râteau sur une boîte de gélose Trypticase-soja salée à 3 % et sur une boîte de gélose T.C.B.S.

La provenance des souches faisant l'objet de la présente étude, est la suivante :

- Souches DCAN 1-2-3-4-12 : moules sauvages de la rade de Toulon.
- Souches M14-171-172-18-19-301-302-31-36-37-38-57-58-610-613-620 : moules des parcs d'élevage toulonnais.
- Souches M590-600-601-602 : moules en provenance de Sète.
- Souche Mar 2 : eau de mer de la côte marseillaise, traitée par filtration sur membrane type Coli 5. Soit au total 28 souches.

2 — Étude de l'halophilie

Les essais sont pratiqués en eau peptonée (trypticase BD Mérieux) à 1 % ajustée à pH 7,4, salée de 0 à 11 %. Les tubes sontensemencés avec 0,1 ml d'une suspension contenant environ 500.000 germes/ml. Les suspensions sont faites en eau physiologique pour éviter un choc osmotique dû à l'eau distillée, susceptible de tuer en quelques minutes certaines bactéries halophiles. Les lectures sont effectuées après trois jours d'incubation à 28°.

Pour l'établissement des courbes de tolérance au CINa le même procédé est employé, les cultures étant agitées pendant 8 heures à 37°. Après addition de 0,1 ml de formol, la lecture est faite au photomètre de JEAN & CONSTANT à la longueur d'onde de 7.500 angströms avec une cellule au césium.

3 — Caractères culturels et biochimiques

L'aspect des colonies et l'essaimage ("Swarming") sont étudiés sur gélose trypticase-soja renfermant 30 g de ClNa par litre. La mise en évidence des cils utilise la méthode argentique de FONTANA modifiée par RHODES en 1958 (in 25).

Les caractères biochimiques sont recherchés par les méthodes classiques, avec addition de ClNa dans certains milieux (7-21-25); un système API à 50 caractères permet de compléter l'étude des fermentations hydrocarbonées. La lecture des gammes est faite à la 8^e heure et après 24 heures d'étuve. En effet les vibrions alcalinisent certains milieux rapidement, rendant les lectures parfois malaisées.

II — Résultats

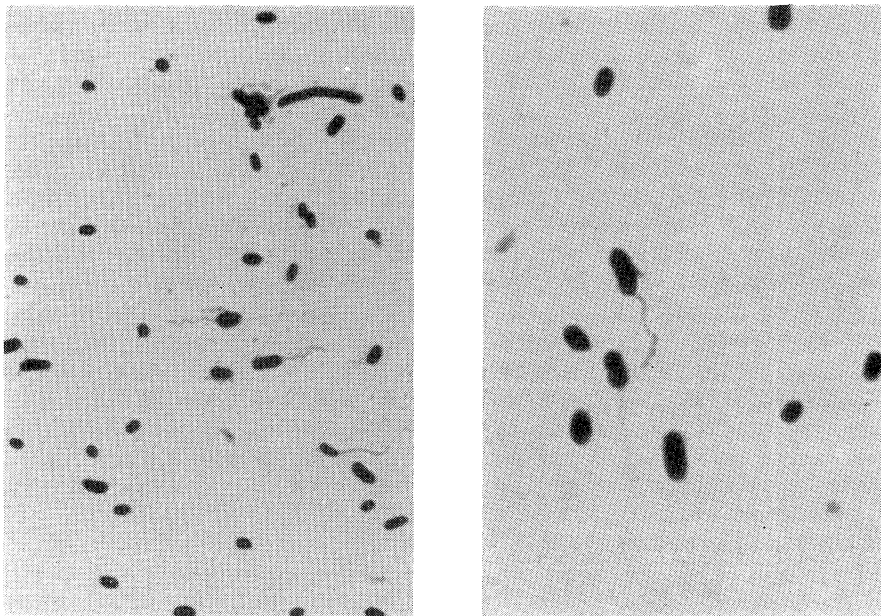
Du mois de janvier au mois de juillet 1974, 70 lots de moules ont été analysés, à raison de deux à quatre lots par semaine. Tous les lots contenaient des vibrions du groupe *alginolyticus*, aucune souche de *V. parahaemolyticus* biotype 1 ou 3 n'ayant été isolée. Le nombre de *V. alginolyticus* variait de 10² à 10⁶ par ml de broyats. Seules 28 souches ont subi une étude particulière.

1 — Morphologie

Les germes étudiés se présentent, en phase exponentielle de croissance, comme des batonnets de 0,8 μ à extrémités arrondies, pléomorphes avec des formes très courtes, coccoïdes, et des formes plus longues, en majorité droites, parfois légèrement incurvées. Ils n'ont jamais l'aspect de « bacille virgule » typique du *Vibrio cholerae*. Ils ont la mobilité extrême du genre en milieu liquide et l'examen au microscope à contraste de phase du voile d'essaimage sur milieu solide révèle une masse animée d'un grouillement vermiculaire.

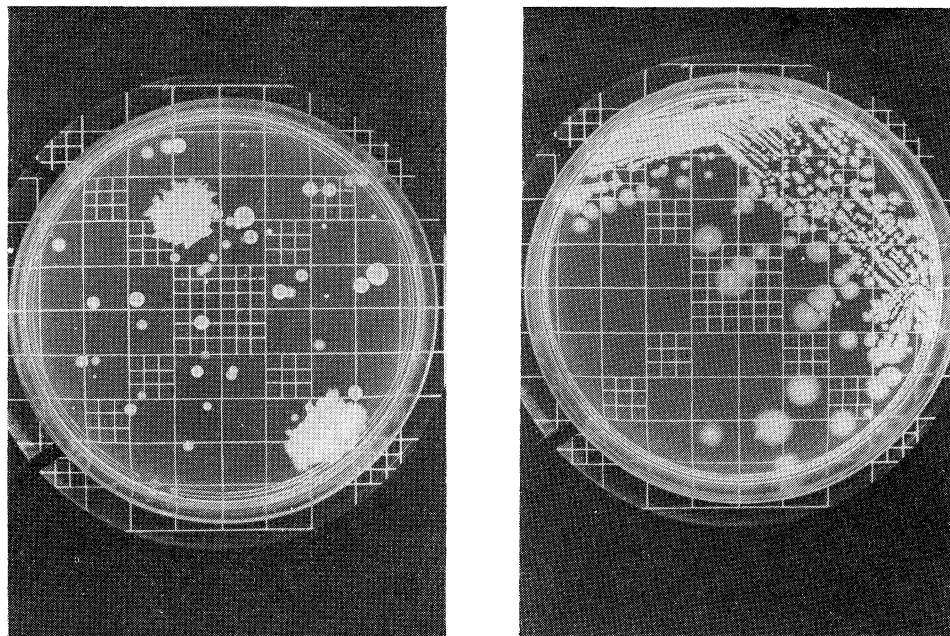
Ils ne gardent pas la coloration de Gram et la fuschine les teinte uniformément avec parfois un renforcement aux extrémités.

Ils possèdent un seul cil polaire épais. Après culture sur milieu solide aucune flagellation péritriche incontestable n'est notée; par contre certaines images suggèrent la présence d'une touffe de flagelles très tenus et très longs formant une sorte de chevelure à une extrémité.



Photographie N° 1. — Souche DCAN 3 coloration de Rhodes.

Photographie N° 2. — Souche DCAN 3 coloration de Rhodes.



Photographie N° 3. — Broyat de moules dilué au 1/100. Isolement direct sur gélose trypticase-soja salée à 3 %. Essaimage de la souche M 620 (2 colonies).

Photographie N° 4. — Essaimage en voile de la souche M 610 sur gélose trypticase-soja salée à 3 %.

2 — Caractères cultureux et halophilie

La rapidité de croissance dans les milieux favorables est une des caractéristiques de ces vibrions. Ils troublent l'eau peptonée salée à 3 % en quelques heures et produisent rapidement à la surface un voile épais qui tend à monter le long des parois du tube. Sur gélose ordinaire et T.C.B.S. les colonies sont visibles vers la sixième heure.

Divers types de colonies ont été décrits (22-27). Nos souches ont présenté les aspects suivants : le plus souvent les colonies sont rondes, surélevées, lisses, blanchâtres, opaques à bords réguliers, de 3 mm de diamètre en moyenne. Par essaimage, ces colonies peuvent s'agrandir en voile fin ou en pseudopodes épais. Cette morphologie très particulière est parfois rencontrée lors du premier isolement et permet de repérer facilement *V. alginolyticus*. L'importance du phénomène est très variable d'une souche à l'autre et, sensible à la composition du milieu, il demande parfois plusieurs jours pour devenir évident. Outre ces colonies opaques, dont certaines prennent une teinte jaunâtre en vieillissant, ces vibrions forment des colonies régulières, mais plus translucides et légèrement bleutées. Quelques-unes de nos souches se dissocient en colonies opaques et colonies translucides. Enfin des formes R sont susceptibles d'apparaître, autoagglutinables et donnant aux cultures un aspect sec sur les milieux solides.

Nos souches sont halophiles obligatoires se cultivant qu'en présence d'une concentration minimale de ClNa de 0,5 %, rarement de 0,3 %. Dans les conditions d'expérience choisies, certains vibrions poussaient encore à 11 % de ClNa, d'autres ne toléraient que 6 %. Les résultats, consignés dans le tableau I où ils sont comparés à ceux obtenus avec la souche de *V. parahaemolyticus* Vo 7 de l'Institut Pasteur de Paris, ainsi qu'à deux souches d'halotolérants : un *Vibrio* El Tor sérotype Ogawa de la collection de l'École du Pharo de Marseille et une souche locale d'*Aeromonas hydrophila subspecies aerogenes* isolée d'une hémoculture. Les courbes néphélométriques (Fig. 1) de tolérance effectuées sur trois souches dont Vo 7, indiquent un optimum voisin de 1,7 % pour celle-ci alors qu'il est compris entre 2,3 et 2,7 % pour les souches DCAN 1 et Mar 2.

3 — Caractères biochimiques

Les caractères suivants sont constamment positifs : aéro-anaérobies facultatifs, oxydase, catalase, sensibilité au vibriostatique 0/129, nitrates réductases, Tetrathionate réductase, gélatine, indole, citrate

de SIMMONS, Tween 80, chitine, fermentation avec production d'acide sans gaz de : glucose, ribose, levulose, mannitol, N. acétyl-glucosamine, maltose, saccharose, trehalose et amidon.

Les caractères variables sont consignés dans le tableau II.

Les caractères constamment négatifs sont : arginine dihydrolase, tryptophane désaminase, urée, malonate, béta-xylosidase (8), lactose, erythritol, d (—) arabinose, d(+) et l(—) xylose, adonitol, méthyl-xyloside, sorbose, dulcitol, méso-inositol, méthyl-d-mannoside, méthyl-d-glucoside, amygdaline, arbutine, esculine, mélibiose, inuline, mélézitose, raffinose, amylose. La production d'H₂S a été constamment négative en système API et en milieu de Hajna, par contre en eau peptonée salée de 1 à 5 %, le papier au sous-acétate de plomb révèle un dégagement très net de ce gaz.

Ainsi sur 60 caractères culturels et biochimiques étudiés, 13 d'entre-eux seulement sont variables d'un vibron à l'autre, l'exception ne touchant, pour certains, qu'une seule souche. Ce groupe paraît donc relativement homogène.

4 — Discussion

En 1961, MIYAMOTO *et coll.* [19] proposaient la création d'un nouveau genre, *Oceanomonas*, pour les vibrons halophiles comprenant *V. parahaemolyticus* et décrivaient trois espèces : *O. parahaemolytica*, *O. enteritidis* et *O. alginolytica*. En 1963, SAKAZAKI *et coll.* [22] doutant de l'opportunité du nouveau genre, maintenaient l'intégrité de l'espèce *parahaemolyticus* qu'ils divisaient en deux biotypes. Deux ans plus tard, grâce à des études statistiques, ZEN-YOJI *et coll.* [30] excluaient le biotype 2 de SAKAZAKI de l'espèce *parahaemolyticus*. Ce dernier auteur s'est rangé depuis à cet avis donnant les caractéristiques de la nouvelle espèce, *V. alginolyticus*, soulignant le manque d'intérêt de l'algino-lyse tout en insistant sur le phénomène de l'essaimage qui reste, pour lui, une propriété physiologique fondamentale de ce germe [25].

Outre sa morphologie en batonnet droit, parfois incurvé, à cil polaire gainé, *V. alginolyticus* est capable d'élaborer des cils péritriches en culture sur milieu solide complexe. Déjà signalé par BUTTIAUX & VOISIN en 1958 [12], cette coexistence de cils polaires et péritriches a été particulièrement étudiée par ALLEN & BAUMANN [1]. ULITZUR & KESSEL [29] ont décrit récemment un phénomène nouveau chez ce germe : pendant son essaimage sur milieu à pH 8,5, apparaissent de véritables échelons de cils géants pouvant atteindre 150 à 200 μ .

BAUMANN *et coll.* [6], reprenant l'étude de bacilles à Gram négatif isolés du milieu marin, ont été amenés à redéfinir le genre *Beneckea* proposé par CAMPBELL & WILLIAMS [13] et regroupant des bactéries ayant la propriété commune d'hydrolyser la chitine. Pour BAUMANN le genre *Beneckea* comprend des bacilles droits et incurvés, non pigmentés, non sporulés, Gram négatif, d'origine marine qui, lorsqu'ils croissent en milieu liquide ont un seul flagelle polaire et gainé. Sur milieu solide, plusieurs souches produisent une ciliature péritriche sans gaine en plus du flagelle polaire gainé. Le GC % est compris entre 45 et 48. Ils sont tous chimio-organotrophes, anaérobies facultatifs et fermentent le glucose avec production d'acide sans gaz. Ils sont oxydase positive et l'ion sodium est nécessaire à leur croissance. Parmi les diverses espèces du genre, BAUMANN propose *Beneckea alginolytica* [MIYAMOTO *et coll.*] *comb. nov.* qui se distingue par sa flagellation péritriche sur milieu solide, son pouvoir d'envahir un milieu complexe et de produire du 2-3 butylénéglycol. Par analyse numérique, l'auteur rapproche de cette espèce-type certains groupes et quelques souches qui ne répondent pas strictement à la définition.

A la suite de certains auteurs, RICHARD [21] définit un biotype 3 de *V. parahaemolyticus* moins tolérant au ClNa que le biotype 2, n'essaillant pas sur milieu solide, fermentant le saccharose, possédant une béta-galactosidase mais ne produisant pas d'acétoïne. Récemment CHATTERJEE décrivait des biotypes 3 et 4 en se basant sur la variation de ces caractères [14].

Les souches isolées des moules de Sète et de Toulon ont des caractères physiologiques et biochimiques qui permettent de les classer dans le biotype 2 de SAKAZAKI, les excluant des biotypes 1 et 3 tels que les rapports RICHARD [21]. Mais il faut souligner la présence de caractères insolites chez certaines souches : DCAN 1 ne possède aucune décarboxylase; M 620 ne produit pas d'acétoïne; or ces deux souches possèdent un fort pouvoir d'essaimage sur milieu gélosé à 1,5 %. Il semble donc exister des variations au sein de l'espèce *alginolyticus*, ce qui ne doit pas conduire à la description d'autant de biotypes. Tout au plus, dans notre série, peut-on distinguer un groupe un peu particulier, constitué par les souches M 601, M 602,

Tableau I

Cl Na %	Souches																
	Vo 7	DCAN 1	DCAN 2	DCAN 3	DCAN 4	DCAN 12	M 14	M 171	M 172	M 18	M 29	M 302	M 58	M 601	M 602	M 613	Mar 2
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	++	+	+
10	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
20	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
30	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
40	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
50	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
60	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	++
80	-	-	-	+	+	-	++	+	-	++	+	++	++	-	+	-	++
100	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+
110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-

Tolérance au ClNa de *Vibrions marins*, *Vibrio Eltor* et *Aéromonas hydrophila subsp. aerogenes*.

Tableau II

Réactions	Souches																			
	DCAN 1	DCAN 2	DCAN 3	DCAN 4	DCAN 12	M 14	M 171	M 172	M 18	M 19	M 28	M 29	M 301	M 302	M 31	M 36	M 37	M 38	M 57	
Lysine - décarboxylase	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornithine - décarboxylase	0	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Béta - galactosidase	0	0	+a	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Production d'acétoïne	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
l (+) arabinose	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Galactose	0	+	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+	0	0	+	+	+	0	0	0
d (+) mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salicine	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
d (+) cellobiose	+	0	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+
Dextrine	0	0	0	+	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0
Goglycène	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+

Réactions Métaboliques Variables chez les Vibrions des Moules

a : réaction positive uniquement après induction sur milieu Pastosé.

M 613 et M 620 qui ne produisent pas d'acétoïne et qui attaquent la salicine. Pour le choix du genre, il semble souhaitable d'isoler ces germes halophiles obligatoires à l'aspect en batonnet, des véritables vibrions et de les inclure dans le genre *Beneckea* redéfini par BAUMANN.

5 — Conclusion

Le traitement de broyats de moules par des méthodes similaires à celles décrites pour l'isolement de *V. parahaemolyticus* (16-18-26-29) a permis l'étude d'un groupe relativement homogène de germes répondant aux descriptions de *V. alginolyticus*. Hôtes habituels des moules méditerranéennes où ils sont présents en quantité non négligeable, ces germes correspondent à ceux décrits par DEFRESSINE & CAZENEUVE [15]. Leur description est à notre connaissance la première en date et si ces germes possèdent un certain pouvoir pathogène lorsqu'ils sont inoculés aux animaux de laboratoire, leur rôle en pathologie humaine semble nul, contrairement à ce qui se passe avec *V. parahaemolyticus* biotype 1 dont les souches « Kanagawa » positives provoquent des gastro-entérites d'origine alimentaire (5-20-24). BAROSS & LISTON [4] KANEKO & COLWELL [17] étudiant l'écologie des deux types de germes, ont constaté des fluctuations de densité en fonction de la température de l'eau de mer. Les isollements de *V. alginolyticus* augmentent en nombre lorsque croît la température ambiante. Comme l'optimum de salinité de ce germe est plus élevé que ceux de *V. parahaemolyticus* biotypes 1 et 3, les conditions écologiques de salinité et de température lui sont nettement favorable sur les côtes de Méditerranée. Ainsi peut-on comprendre que, jusqu'à présent, le biotype 2 ait été détecté dans les moules de nos côtes, à l'exclusion des deux autres. Seule la méthode d'isolement direct et l'étude de nombreuses colonies permettra peut être de retrouver les autres biotypes qui, s'ils sont présents, le sont certainement en petit nombre par rapport à leur concurrent.

Références bibliographiques

- [1] ALLEN (R.D.) & BAUMANN (P.). — Structure and arrangement of Flagella in Species of the Genus *Beneckea* and *Photobacterium Fischeri*. *J. Bacteriol.* 1971, **107**, 295-302.
- [2] BARKER (W.H.) Jr. — *Vibrio parahaemolyticus* Outbreaks in the United States. *The Lancet.* 1974, n° 7857, 551-553.
- [3] BARKER (W.H.) Jr. & GANGAROSA (E.J.). — Food poisoning due to *Vibrio parahaemolyticus*. *Annual Rev. Med.* 1974, **25**, 75-81.
- [4] BAROSS (J.) & LISTON (J.). — Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington State. *Appl. Microbiol.* 1970, **20**, 179-186.
- [5] BARTLEY (C.H.) & SLANETZ (L.W.). — Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* in Estuarine waters and Oysters of New Hampshire. *Appl. Microbiol.* 1971, **21**, 965-966.
- [6] BAUMANN (P.), BAUMANN (L.) & MANDEL (M.). — Taxonomy of marine bacteria : the genus *Beneckea*. *J. Bacteriol.* 1971, **107**, 268-294.
- [7] BRISOU (J.). — Techniques d'enzymologie bactérienne, 1971. Masson et Cie. Paris.
- [8] BRISOU (B.), RICHARD (C.) & LENRIOT (A.). — Intérêt taxonomique de la recherche de la β . xylosidase chez les « Entérobacteriaceae ». *Ann. Inst. Pasteur.* 1972, **123**, n° 3, 341-347.
- [9] BRISOU (B.) & CHAMFEUIL (R.). — Marée brune et marée rose ou les risques d'infection sur le bord de mer. *Med. et Mal. Infect.* 1973, **3**, n° 8-9, 345-349.
- [10] BRISOU (B.) & ROCHE (J.C.). — Evolution de l'endémie Typho-paratyphoïdique à Toulon de 1874 à 1972. *Med. et Mal. Infect.* 1973, **3**, n° 11, 421-427.
- [11] BRISOU (B.) & BOUDON (A.). — Essai d'inventaire des *Salmonella* au niveau du réseau d'égouts d'une commune de 18.500 habitants. *Rev. Epidém., Méd. Soc. et Santé Publ.* 1974, **22**, n° 3, 199-213.
- [12] BUTTIAUX (R.) & VOISIN (C.). — Coexistence de cils polaires et péritriches chez un bacille halophile. Influence de la composition du milieu sur cette association. *Ann. Inst. Pasteur Lille.* 1958/59, **10**, 151-158.
- [13] CAMPBELL (L.L.) & WILLIAMS (O.B.). — A study of chitin-decomposing micro-organisms of marine origin. *J. Gen. Microbiol.* 1951, **5**, 894-905.

- [14] CHATTERJEE B.D. — Present status of Heiberg groups for classifying cholera-like organisms. *Indian J. Med. Res.* 1974, **62**, 479-483.
- [15] DEFRESSINE (C.) & CAZENEUVE (H.). — Vibrions cholériques et paracholériques. Vibrions des moules des parcs de Brégaillon. *Arch. Méd. et Pharm. Nav.* 1914, **101**, 46-55 et 103-119.
- [16] FISHBEIN (M.) & WENTZ (B.). — *Vibrio parahaemolyticus* methodology for isolation from seafoods and epidemic specimens. *J. Milk Food Technol.* 1973, **36**, 118-123.
- [17] KANEKO (T.) & COLWELL (R.R.). — Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 1973, **113**, 24-32.
- [18] MAC CORMACK (W.M.), DEWITT (W.E.), BAILEY (P.E.), MORRIS (G.K.), SOEHARJONO (P.) & GANGAROSA (E.). — Evaluation of Thiosulfate - Citrate - Bile Salts Sucrose agar, a selective medium for the isolation of *Vibrio cholerae* and other pathogenic vibrios. *J. Infect. Dis.* 1974, **129**, 497-500.
- [19] MIYAMOTO (Y.), NAKAMURA (K.) & TAKIZAWA (K.). — Pathogenic halophiles proposal of a new genus "Oceanomonas" and of the amended species names. *Japan J. Microbiol.* 1961, **5**, 477-486.
- [20] MIYAMOTO (Y.), KATO (T.), OBARA (Y.), AKIYAMA (S.), TAKIZAWA (K.) & YAMAI (S.). — In vitro hemolytic characteristic of *Vibrio parahaemolyticus*: its close correlation with human pathogenicity. *J. Bacteriol.* 1969, **100**, 1147-1149.
- [21] RICHARD (C.), GIAMMANCO (G.) & POPOFF (M.). — *Vibrio parahaemolyticus*. Isolement et diagnostic bactériologique. *Ann. Biol. Clin.* 1974, **32**, 33-40.
- [22] SAKAZAKI (R.), IWANAMI (S.) & FUKUMI (H.). — Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural, and biochemical properties and its taxonomical position. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 1963, **16**, 161-188.
- [23] SAKAZAKI (R.). — Proposal of *Vibrio alginolyticus* for the biotype 2 of *Vibrio parahaemolyticus*. *Japan J. Med. Sci. Biol.* 1968, **21**, 359-362.
- [24] SAKAZAKI (R.), TAMURA (K.), KATO (T.), OBARA (Y.), YAMAI (S.) & HOB0 (K.). — Studies on the enteropathogenic, facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*. III. Enteropathogenicity. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 1968, **21**, 225-231.
- [25] SKERMAN (V.B.D.). — A guide to the identification of the Genera of Bacteria. 1967. Second ed. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- [26] THOMSON (W.K.) & TRENHOLM (D.A.). — The isolation of *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic bacteria from Canadian Atlantic shellfish. *Can J. Microbiol.* 1971, **17**, 545-549.
- [27] TWEDT (R.M.), SPAULING (P.L.) & HALL (H.E.). — Morphological, Cultural, Biochemical and Serological Comparison of Japanese Strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolated in the United States. *J. Bacteriol.* 1969, **98**, 511-518.
- [28] ULITZUR S. & KESSEL (M.). — Giant flagella bundles of *Vibrio alginolyticus* (NCMB 1803). *Arch. Microbiol.* 1973, **94**, 331-339.
- [29] VANDERZANT (C.) & NICKELSON (R.). — Procedure for isolation and enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.* 1972, **23**, 26-33.
- [30] ZEN-YOJI (H.), SAKAI (S.), TERAYAMA (T.), KUDO (Y.), BENOKI (M.) & NAGASAKI (M.). — Epidemiology, enteropathogenicity, and classification of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Infect. Dis.* 1965, **115**, 436-444.

