

Quantitative study of *Vibrio parahaemolyticus* in sea water, shellfish and sediments of a marine area affected by a moderately polluted river discharge

E. MARTINEZ-MANZANARES, M.A. MORINIGO, F. EGEA, D. CASTRO, A. LUQUE and J.J. BORREGO

Depart. de Microbiologia, Facultad de Ciencias, Universidad de MALAGA (Spain)

*Vibrio parahaemolyticus* is considered to be a part of the normal microflora of seawater and sediments of lukewarm seawaters (KANEKO & COLWELL, 1973). This microorganism is a potential pathogen of fish and shellfish and it has been involved in human illness caused by the consumption of raw or lightly cooked seafood (KATO *et al.*, 1970).

The distribution of *V. parahaemolyticus* in seawater, shellfish and sediments, in a marine area affected by the outfall of Guadalhorce river (Malaga, Spain), was studied.

The samples were collected from five sample stations, monthly during a year, and processed following standard procedures (APHA, 1985; FDA, 1978).

The most probable number of *V. parahaemolyticus* per 100 ml of water or 100 g of shellfish and sediments was studied by means of the multiple tube technique (APHA, 1985), using alkaline and saline peptone water, incubated at 36±1°C for 8 h and streaked on TCBS agar plates (DUPRAY & CORMIER, 1983). Presumptive *V. parahaemolyticus* colonies were confirmed according to the protocol described by FDA (1978).

The results, given in Figure 1, show that the annual evolution of the concentrations of the microorganism studied is almost parallel in the three types of samples. The mean concentrations ranged from <3 to 12 MPN/100 ml of seawater, from <3 to 208 MPN/100 g of shellfish and from <3 to 1280 MPN/100 g of sediments. These densities are very similar to those obtained by ABEYTA (1983), but lower than those reported by EL-SAHN *et al.* (1982). The level of accumulation in shellfish and sediments in relation with seawater is evident.

Two peaks of high density of microorganisms can be observed, one in May (15°C in seawater) another in October (18°C). In summer and winter *V. parahaemolyticus* disappears, in coincidence with the highest and lowest water temperatures (22° and 13°C, respectively).

*V. parahaemolyticus* has never been detected in shellfish in enough number to be considered as a health hazard (10<sup>6</sup>-10<sup>7</sup> per g), (TWEDT *et al.*, 1980), but it is demonstrated the high survival ability of this microorganism in shellfish, and its elevated resistance to the depuration (GREENBERG *et al.*, 1982; EYLES & DAVEY, 1984; MARTINEZ-MANZANARES *et al.*, 1991). For these reasons, the presence of this microorganism must be considered as a potential health-hazard associated with seafood consumption.

On the other hand, the role of marine sediments as a reservoir of *V. parahaemolyticus* has been demonstrated, and we consider that the follow up of this microorganism in sediments may provide an additional insight of the microbiological quality of shellfish growing areas.

Examen de la qualité de l'eau de mer par immunofluorescence

T.L. MAUGERI\*, R. ZACCONE\*\*, G. CARUSO\*\*, E. CRISAFI\*\* et C. GUGLIANDOLO\*

\* Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina, Università, MESSINA (Italia)

\*\* Istituto Sperimentale Talassografico, CNR, MESSINA (Italia)

Le degré de pollution des eaux de mer est évalué par le dénombrement et les indicateurs de contamination fécale que sont les bactéries entériques. Celles-ci donnent des informations sur leur présence dans les eaux usées. L'énumération des espèces indicatrices est effectuée au moyen de milieux de culture adéquats en suivant la technique conseillée par les Autorités Sanitaires.

L'utilisation des coliformes et des streptocoques fécaux comme espèces indicatrices est basée sur la connaissance de leur survie. Cette épreuve est réalisée sur les milieux de culture.

Récemment l'utilisation des méthodes culturales et des milieux sélectifs a été mise en discussion après que plusieurs auteurs aient découvert que les bactéries entériques, dans le domaine marin, ne perdent pas leur intégrité cellulaire pendant plusieurs jours, mais toutefois ne croissent plus dans les milieux artificiels. De plus ces bactéries ne perdent pas leur éventuelle virulence (GRIMES et COLWELL, 1986). La possibilité de démontrer au microscope à épifluorescence la présence de bactéries par les fluorochromes a fourni une méthode plus efficace pour la démonstration directe des cellules bactériennes. L'utilisation de l'orange d'acridine ou du DAPI a permis une évaluation plus exacte de la biomasse bactérienne dans les milieux marins. La non-spécificité de la méthode ne permet pas d'identifier les bactéries comptées mais il est possible d'utiliser un anti-sérum spécifique contenant les anticorps pour les différentes espèces recherchées.

Le dénombrement direct des cellules conduit à une inévitable révision des concepts de mortalité et des temps d'autodépuration dans la mer. L'utilisation de la méthode d'immunofluorescence (FA) pour la recherche spécifique des espèces indicatrices de contamination fécale et/ou des bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Vibrio cholerae*), peut mettre en évidence toutes les bactéries qui ne sont pas à même de se développer sur les milieux culturaux. Elles ne sont pas mortes mais elles sont transformées en cellules qui dorment et peuvent se réveiller quand, dans le milieu, il y aura des conditions plus favorables à leur multiplication.

XU *et al.* (1982) ont utilisé la technique du comptage direct au microscope à épifluorescence pour démontrer que *E. coli* et *V. cholerae* peuvent être viables même quand ils ne sont pas cultivables sur les milieux.

Dans des échantillons prélevés dans le Déroit de Messine au débouché du grand émissaire de la ville, on a utilisé les techniques culturales et celles du dénombrement direct pour la recherche de *E. coli* (ZACCONE *et al.*, 1991) et pour *Salmonella* sp. On a employé la méthode des membranes filtrantes pour les coliformes fécaux qui ont été concentrés sur un filtre de 0.2 µm de porosité. Pour la recherche de *Salmonella*, on a réalisé un enrichissement en bouillon de Sélénite (DIFCO) et Müller Kauffmann incubé à 37° C pendant 24h et l'épreuve de confirmation sur la gélose SS et "Hektoen enteric" (DIFCO).

Pour la méthode du comptage direct, on a suivi la technique de DESMONTS *et al.* (1990) modifiée, pour *Salmonella* et pour *E. coli*, celle de ZACCONE *et al.* (1991).

Le sérum anti-*Salmonella* (polyvalent I, Behring) qui contient des immunoglobulines anti-*Salmonella* (groupes A-E4) a été préliminairement testé avec les espèces suivantes: *Salmonella* (8 espèces), *Shigella* (2), *Citrobacter* sp, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* (3), *Pseudomonas* (3), *Proteus* (2), *Vibrio* (3), *Enterobacter agglomerans*, *Enterococcus* sp.

Dans l'eau de mer, on a toujours trouvé une charge plus élevée de *E. coli* (1-2 ordre de grandeur) et on a pu démontrer la présence de *Salmonella* plus rapidement et plus facilement avec la méthode de l'immunofluorescence (FA).

Les résultats posent le problème de la révision des techniques de numération conseillées par les Autorités Sanitaires. Ils encouragent à considérer l'opportunité d'évaluer les conditions dans lesquelles les cellules qui dorment retourneront à leur reproduction active dans le milieu ambiant et/ou dans les milieux de culture. Pour le *Vibrio cholerae*, on a vu que c'est surtout la présence du substrat qui joue un rôle très important dans la concentration et aussi dans la dissémination de cette bactérie qui vit et survit à la surface des copépodes (TAMPLIN et COLWELL, 1986). Pour *E. coli* aussi, il est démontré que certaines activités diminuent progressivement après la mise en eau de mer, dont la capacité de dégradation du lactose qui est fondée sur l'activité de la β-galactosidase. Ces résultats nous poussent à modifier nos connaissances sur la validité du dénombrement bactérien dans les milieux de culture.

Il faut considérer la différence dans l'activité protectrice de la matière organique pour les bactéries libres et pour celles qui sont fixées aux matières en suspension où les bactéries peuvent trouver des microhabitats qui leur sont plus favorables.

La présence effective de germes pathogènes (comme *V. cholerae*, *Salmonella*, etc.) et des espèces indicatrices est aussi très importante pour le contrôle des eaux destinées à l'élevage de coquillages.

Dans le futur, on effectuera d'autres expériences de vitalité des bactéries au moyen de la méthode de KOGURE *et al.* (1979) ce qui permet de distinguer les cellules sensibles au traitement avec l'acide nalidixic et qui par conséquent sont considérées comme vivantes.

REFERENCES

DESMONTS C., MINET J., COLWELL R.R. & CORMIER M., 1990.- *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1448-1452.  
GRIMES D. & COLWELL R.R., 1986.- *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 161-165.  
KOGURE K., SIMIDU U. & TAGA N., 1979.- *Can J. Microbiol.*, 25: 415-420.  
TAMPLIN M.L. & COLWELL R.R., 1986.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 297-301.  
ZACCONE R., CARUSO G. & CRISAFI E., 1991.- *Rev. Inter. Océan. Méd.*, 101-104: 90-93.  
XU H., ROBERTS N., SINGLETON F.L., ATTWELL R.W., GRIMES D.J. & COLWELL R.R., 1982.- *Microb. Ecol.*, 8: 313-323.

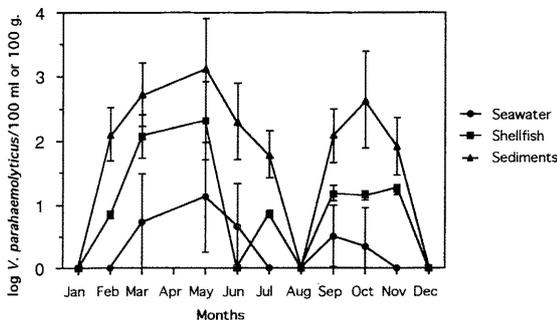


Fig. 1.- Temporal evolution of *V. parahaemolyticus* densities in seawater, shellfish and sediments

REFERENCES

ABEYTA C., 1983.- *J. Food Prot.* 46: pp. 901-909.  
AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION, 1985.- Standard methods for the examination of water and wastewater, 16th ed. APHA, Washington, D.C.  
DUPRAY E., & CORMIER M., 1983.- *Appl. Environ. Microbiol.* 46: pp.1234-1235.  
EL-SAHN M.A., EL-BANNA A.A. & EL-TABEY SHEHATA A.M., 1982.- *Can. J. Microbiol.* 28: pp.1261-1264.  
EYLES M.J., & DAVEY G.R. 1984.- *Int. J. Food Microbiol.* 47: pp. 703-706.  
FOOD DRUG ADMINISTRATION, 1978.- Bacteriological analytical manual for foods. AOAC, Washington, D.C.  
GREENBERG E.P., DUBOISE M. & PALHOF B., 1982.- *J. Food Safety.* 4: pp. 113-123.  
KANEKO T. & COLWELL R.R., 1973.- *J. Bacteriol.*, 37: pp. 24-32.  
KATO T., KAWAHARA N., TAKAHASHI R., TANAKA E., YAMAGUCHI T. & SATO M., 1970.- *Med. Circle*, 15: pp. 109-111.  
MARTINEZ-MANZANARES E., EGEA F., CASTRO D., MORINIGO M.A. ROMERO P. & BORREGO J.J. 1991.- *J. Food Protec.* 54: pp. 612-618.  
TWEDT R.M., PEELER J.T. & SPAULDING P.L., 1980.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: pp. 1012-1016.

REFERENCES

DESMONTS C., MINET J., COLWELL R.R. & CORMIER M., 1990.- *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1448-1452.  
GRIMES D. & COLWELL R.R., 1986.- *FEMS Microbiol. Lett.* 34: 161-165.  
KOGURE K., SIMIDU U. & TAGA N., 1979.- *Can J. Microbiol.*, 25: 415-420.  
TAMPLIN M.L. & COLWELL R.R., 1986.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 52: 297-301.  
ZACCONE R., CARUSO G. & CRISAFI E., 1991.- *Rev. Inter. Océan. Méd.*, 101-104: 90-93.  
XU H., ROBERTS N., SINGLETON F.L., ATTWELL R.W., GRIMES D.J. & COLWELL R.R., 1982.- *Microb. Ecol.*, 8: 313-323.