

Introduction

Staphylococcus aureus and *Candida albicans* are very widespread microorganisms which have been isolated from aquatic environments (BUCK & BUBUCIS, 1978; BORREGO *et al.*, 1987). The presence of these microorganisms in waters possesses a health hazard since they can infect ears, eyes, cuts, scratches on the skin of bathers.

In this paper, the effects of seawater on the survival of *S. aureus* and *C. albicans* compared to the survival of two indicator microorganisms were studied under controlled diffusion chamber conditions.

Materials and Methods

The chambers used in this study were designed as described by FLIERMANS & GORDEN (1977), and before use they were autoclaved for 20 min at 121°C. UV-sterilized polycarbonate filters of 90 mm diameter and 0.2 µm pore size (Nucleopore) were used as side walls for the chambers. The chambers were filled with filtered seawater, and transported to the experimentation area in containers filled with seawater. The strains employed in this study were: *Escherichia coli* (two strains isolated from seawater), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19333 and one isolated from seawater), *S. aureus* (ATCC 29213 and one isolated from seawater) and *C. albicans* (CECT 1394). In the sampling area, a sterile syringe was used to inoculate 1 ml of the final cell suspension (c.a. 108 cfu/ml) of each strain into each chamber.

Enumeration of the samples was carried out following two procedures, the double agar-layer technique (ANDERSON *et al.*, 1983) used as control medium, and plating directly on selective agar plates. Tryptic Soy Agar (TSA) (Difco) was used as reference medium, and as bottom agar layer. The selective media used were: Endo Agar (Difco) for *E. coli*, KF Agar (Merck) for *E. faecalis*, Mannitol Salt Agar (Difco) for *S. aureus* and mCA Agar (BUCK & BUBUCIS, 1978) for *C. albicans*. All samples were incubated at 37°C for 24 h. The percentages of both surviving and injured cells during time *t* were calculated by means of equations (1) and (2):

$$(1) \% \text{ Survival} = (\text{Count on TSA at time } t / \text{Count on TSA at time } 0) \times 100$$

$$(2) \% \text{ Injury} = [1 - (\text{Count on selective media at time } t / \text{Count on TSA at time } t)] \times 100$$

Microbial inactivation was evaluated by applying the law of logarithmic decrease:

$$C = C_0 10^{-t/T_{90}}$$

where, C_0 and C are the initial microbial concentration and the microbial concentration at *t* time, respectively, measured in hours. T_{90} is a constant characteristic of the process, that represents the time in which the initial population is reduced by 90 %.

Results and Discussion

In Table 1 it can be observed that the survival percentages for all the microorganisms tested were lower than 10 %. The highest percentages of injured cells at the end of the experiments (48 h of immersion) corresponded to *S. aureus* and *E. faecalis*, and T_{90} values of these microorganisms were also very similar. The survival of *C. albicans* was very similar to those of indicator microorganisms, and even at the end of the experiments the population of *C. albicans* showed a lower injury percentage than the other microorganisms. In contrast, the T_{90} value for *Candida* is the lowest. These data do not agree with those results which reported similar survival rates of *C. albicans* compared to indicator and other pathogenic microorganisms (CORNAX *et al.*, 1990). This result may be explained by a higher sensibility of this microorganism to the experimental manipulation before introduction into the diffusion chamber (CORNAX, 1986). This fact could provoke a rapid death of the injured cells, but this reduction of the population would not be due to the effect of seawater.

The lower injury percentages of *E. coli* and *C. albicans* in seawater may be due to the fact that they show different abilities to use the organic nutrients present in seawater. Similarly, SINCLAIR & ALEXANDER (1984) demonstrated that *E. faecalis* had a low capability to obtain energy from natural waters. However, several studies pointed out that the lack of nutrients in the water do not seem to be the main factor affecting the inactivation process of microorganisms in seawater (FUJIOKA *et al.*, 1981; DE VICENTE *et al.*, 1988; MORINIGO *et al.*, 1989; CORNAX *et al.*, 1990).

Table 1. Injury and survival rates and T_{90} values of the microorganisms in diffusion chambers experiments

Microorganisms	Injury percentage	Survival percentage	T_{90} value (hours)
<i>E. coli</i>	83.3 ± 4.6	8.0 ± 1.6	47.2
<i>E. faecalis</i>	94.0 ± 2.7	7.3 ± 3.6	37.0
<i>S. aureus</i>	96.2 ± 3.6	6.0 ± 2.9	34.0
<i>C. albicans</i>	79.4 ± 2.8	8.0 ± 3.3	24.0

REFERENCES

- ANDERSON I.C., RHODES M. and KATOR H., 1983.- *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1877-1883.
 BORREGO J.J., FLORIDO J.A., MROCEK P.R. and ROMERO P., 1987.- *J. Appl. Bacteriol.*, 63: 85-93.
 BUCK J.D. and BUBUCIS P.M., 1978.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 35: 237-242.
 CORNAX R., 1986.- Estudio de la supervivencia de microorganismos aléctonos en el medio marino. *Master Thesis*. University of Malaga.
 CORNAX R., MORINIGO M.A., ROMERO P. and BORREGO J.J., 1990.- *Curr. Microbiol.*, 20: 293-298.
 FLIERMANS C.B. and GORDEN R.W., 1977.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 207-210.
 FUJIOKA R.S., HASHIMOTO H.H., SIWAK E.B. and YOUNG R.H.F., 1981.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 41: 690-696.
 MORINIGO M.A., CORNAX R., MUNOZ M.A., ROMERO P. and BORREGO J.J., 1989.- *Curr. Microbiol.*, 18: 267-273.
 SINCLAIR J.L. and ALEXANDER M., 1984.- *Appl. Environ. Microbiol.*, 48: 410-415.
 DE VICENTE A., AVILES M., BORREGO J.J. and ROMERO P., 1988.- *Zentralbl. Bakteriol. Microbiol. Hyg.* 1B, 186: 261-272.

Les Bryozoaires forment un groupe important parmi la communauté des filtreurs, tant en milieu marin que dulcicole. Ils jouent par conséquent un rôle écologique non négligeable. Cependant leur nutrition est mal connue. Les quelques études qui y ont été consacrées montrent qu'ils se nourrissent de nanoplancton, d'algues et de diatomées (JEBRAM, 1980; KAMINSKI, 1984; WINSTON, 1976). Les auteurs s'accordent à dire que les bactéries sont également un des composants de leur nourriture mais jusqu'à présent aucune étude n'avait démontré ce fait. Des essais de nutrition bactérienne d'un bryozoaire marin ont été tenés par WINSTON (1976) mais sans succès.

Dans ce travail nous avons étudié la capacité des Bryozoaires à filtrer des bactéries et à s'en nourrir, en prenant comme modèle *Plumatella fungosa*, un bryozoaire d'eau douce. En effet, les bryozoaires d'eau douce présentent l'avantage de produire des formes de résistance, les statoblastes, qui peuvent être cultivés au laboratoire, permettant ainsi une expérimentation dans des conditions standardisées. Les statoblastes peuvent être conservés au froid pendant plusieurs années sans perdre leur pouvoir de germination.

Les statoblastes récoltés dans la nature ont été cultivés dans un milieu minéral mis au point pour la culture d'éponges (RASMONT, 1961). Après 3 jours, à 20°C et un éclaircissement de 12h par jour, les jeunes polypides deviennent visibles entre les deux valves du statoblaste. Cinq jours après l'éclosion, ils sont nourris avec des *Escherichia coli* colorés vitalement au formazan.

Cette technique nous a permis de suivre l'ingestion des bactéries, leur transit dans le tube digestif et leur émission sous forme de pelotes fécales colorées en rouge. Tous les polypides contiennent des pelotes fécales colorées dont le taux d'émission est fonction de la concentration bactérienne dans le milieu extérieur. L'observation microscopique des pelotes fécales montre qu'elles sont constituées de bactéries endommagées.

Des expériences ont été réalisées afin de quantifier le taux d'ingestion des *E. coli* en suivant leur disparition dans le milieu par dénombrement sur milieu sélectif (E.M.B. Difco). Cette quantification est toutefois difficile à réaliser étant donné que les pelotes fécales, émises à un rythme rapide, enrichissent le milieu.

Ces expériences montrent clairement que *Plumatella fungosa* est capable, non seulement d'ingérer des bactéries comme seule source de nourriture, mais aussi de les digérer. Il en est probablement de même pour les autres bryozoaires qui, de ce fait, joueraient un rôle considérable dans l'épuration des eaux.

REFERENCES

- JEBRAM D., 1973.- Preliminary observations on the influence of food and other factors on the growth of Bryozoa. *Kieler Meeresforsch.* 29: 50-57.
 KAMINSKI M., 1984.- Food composition of three bryozoan species (Bryozoa, Phylactolaemata) in a mesotrophic lake. *Pol. Arch. Hydrobiol.* 31 (1): 45-53.
 RASMONT R., 1961.- Une technique de culture des éponges d'eau douce en milieu contrôlé. *Ann. Soc. R. Zool. Belg.* 91: 147-156.
 WINSTON J.E., 1976.- Experimental culture of the estuarine ectoproct *Conopeum tenuissimum* from Chesapeake Bay. *Biol. Bull.* 1 50: 318-335.