GERBAM — Deuxième Colloque International de Bactériologie marine — CNRS, Brest, 1-5 octobre 1984 IFREMER, Actes de Colloques, 3, 1986, pp. 483-489

56

ÉTUDE ÉCOLOGIQUE DES VIBRIONS DU BASSIN D'ARCACHON.

M. MARCHAND

Laboratoire de Microbiologie - Université de Bordeaux I, avenue des Facultés, 33405 TALENCE (FRANCE)

RÉSUMÉ - Les vibrions ont été recherchés pendant trois ans dans des échantillons d'eaux et de sédiments collectés mensuellement dans le bassin d'Arcachon (Gironde, France). Aucune présence de *V. cholerae* sérotype 01 n'a pu être signalée. Par contre, la rivière l'Eyre et son estuaire hébergent des vibrions cholériques non-agglutinables (127 souches) principalement dans les eaux. Les faibles températures ralentissent leur développement sans l'arrêter complètement. *V. parahaemolyticus* (257 souches), présent dans les mêmes régions, est surtout isolé de l'eau lorsque la température du milieu atteint 15°C. *V. alginolyticus* (638 souches) colonise l'ensemble du bassin à l'exception de la rivière en toutes saisons. Les basses températures favorisent le développement de *V. metschnikovii* (203 souches), très tolérant vis-à-vis de la salinité. *V. anguillarum* (46 souches) présente un comportement semblable à celui de *V. parahaemolyticus*. Aucune corrélation avec la présence de coliformes fécaux n'a pu être établie.

Mots clés: Vibrio, eau, sédiment, température, salinité, écologie.

ABSTRACT - Water and sediment samples monthly collected from Arcachon Bay (Gironde, France) were examined during three years for the presence of marine vibrios. *V. cholerae* serotype 01 was never detected. On the other hand, the Eyre River and his mouth contain non-agglutinating *V. cholerae* (127 strains) principally in water. The low temperatures slow their development down without stopping it completely. *V. parahaemolyticus* (257 strains) present in the same areas is particularly isolated from water when the aquatic medium temperatures rises to 15°C. *V. alginolyticus* (638 strains) settles the whole Bay, except the river, in any season. The low temperatures promote growth of *V. metschnikovii* (203 strains) very tolerant towards salinity. *V. anguillarum* (46 strains) shows a similar comportment to *V. parahaemolyticus*. No correlation between incidence of fecal coliforms and vibrio could be detected.

Key words: Vibrio, water, sediment, temperature, salinity, ecology.

INTRODUCTION

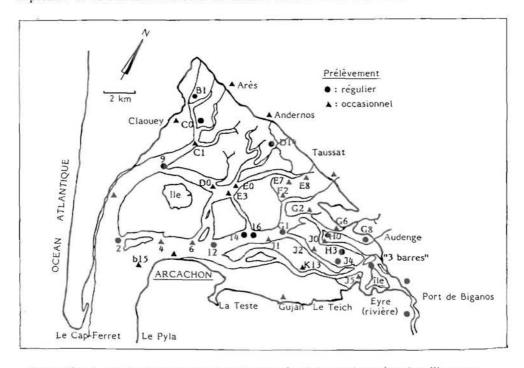
Au cours de la dernière décennie, les vibrions isolés de l'environnement naturel ont fait l'objet d'un grand nombre de recherches d'écologie et de taxonomie - principalement numérique - travaux se traduisant concrètement par la découverte d'espèces nouvelles et une meilleure connaissance de la biologie des membres de la famille des Vibrionacées. Les études de Colwell et coll. (1977) et de Kaneko et Colwell (1973) aux États-Unis à partir de la baie de Chesapeake et l'attention qu'elles ont suscitée dans la communauté scientifique expliquent ce surcroît d'intérêt encore accru par le danger potentiel dû au pouvoir pathogène de certains de ces vibrions impliqués dans des épidémies ou toxi-infections alimentaires.

La bassin d'Arcachon (département de la Gironde), de configuration similaire à celle de Chesapeake avec un gradient de salinité allant de l'eau douce à l'eau de mer normale, s'avérait intéressant à prospecter.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prélèvements

Comme l'indique la carte suivante, le bassin d'Arcachon ressemble très schématiquement à un triangle équilatéral de 20 km de côté communiquant avec l'Océan Atlantique par les passes du Pyla et du Cap-Ferret. La base du triangle orientée Est-Ouest est la plus peuplée avec les villes d'Arcachon, La Teste et Gujan-Mestras. L'Eyre, rivière prenant sa source dans les Landes, alimente, au Sud-Est, le bassin en eau douce de même que de nombreux ruisseaux de la côte Est. L'ensemble représente à marée haute un plan d'eau d'une superficie de 15 000 hectares dont 11500 sont découverts à basse mer.



- Carte schématique du bassin d'Arcachon à marée basse : les chenaux et les stations de prélèvements.

Plus de quarante campagnes de prélèvements (fréquence mensuelle de 1 à 2) ont été effectuées de juin 1981 à mai 1984 depuis le port de Biganos situé sur l'Eyre, rivière se jetant dans le bassin par un delta. Les dates correspondent généralement à des périodes de grandes marées à forts coefficients. A chaque sortie, de 12 à 15 échantillons d'eaux sont récoltés à 20 cm de la surface et autant de sédiments collectés à la benne en des points aussi fixes que possible concrétisés par des balises ou bouées. Sur le terrain, on mesure la température et la salinité, ce dernier paramètre étant affiné de retour au laboratoire. Cette étude, aidée financièrement par l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), a porté sur l'examen de plus de 600 prélèvements d'eaux et autant de sédiments répartis dans la totalité du bassin.

Techniques microbiologiques

L'analyse qualitative des vibrions comprend classiquement les phases d'enrichissement d'isolement et d'identification.

La technique d'enrichissement en eau peptonée alcaline est basée sur les propriétés physiologiques majeures des vibrions: aérophilie, basophilie et rapidité de multiplication cellulaire. Elle s'effectue à la température de 30°C et à 2 teneurs différentes de salinité: 25 g par litre de chlorure de sodium et $0 \, g/l$ itre de façon à favoriser les espèces halophiles ou non.

L'isolement est pratiqué en stries sur 2 boîtes de Pétri, l'une contenant un milieu non sélectif: l'eau peptonée alcaline gélosée, l'autre un milieu sélectif: le T.C.B.S. (Thiosulfate - Citrate - Bile - Saccharose).

L'identification fait appel aux critères très classiques de morphologie, physiologie, biochimie et de sérologie. Les résultats des identifications ont été confrontés avec la description des espèces exposées notamment dans la taxonomie numérique de Kaper et coll. (1983).

De façon concomittante à partir de l'eau, on a procédé à la numération des vibrions susceptibles de cultiver à 42°C en eau peptonée alcaline enrichie à 7 % de chlorure de sodium (technique du nombre le plus probable de germes). Chaque culture positive après 72 h d'incubation au bain-marie est repiquée sur milieu T.C.B.S. L'apparition de colonies jaunes ou vertes après 18 h d'étuve à 42°C témoigne de la présence de vibrions que nous qualifions de "halophiles et thermophiles" (présomption de Vibrio alginolyticus et de V. parahaemolyticus). Les résultats sont exprimés par litre d'eau.

En plus de la recherche de vibrions, les coliformes totaux ont été dénombrés après culture à 30°C pendant 48 h sur bouillon lactosé bilié au vert brillant et, parmi eux, les coliformes fécaux après épreuve de Mac Kenzie à 44°C.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Mille cinq cent vingt souches de Vibrio ont été isolées des eaux et des sédiments ; elles se répartissent presque toutes dans 5 espèces d'importance numérique inégale.

* Il convient d'abord de signaler l'absence de Vibrio cholerae sérotype 01 de l'ensemble des prélèvements. Par contre, 127 souches de V. cholerae non-agglutinables (nag) ont été récoltées pendant une période d'analyse de 2 ans. Les biotypes 2 de Heiberg (1936), c'est-à-dire saccharose-positif, arabinose et mannose négatifs et 1 (saccharose +, arabinose -, mannose +) prédominent avec respectivement 59 et 52 souches, vient ensuite le biotype 5, saccharose-négatif que Brenner et Davis (1981) considèrent comme une nouvelle espèce sous le vocable V. mimicus. On peut négliger les biotypes 3 (2 souches), 4 et 7 (une souche chacun).

La région concernée est celle de la rivière l'Eyre et de son estuaire dans un rayon de 8 km c'est-à-dire la portion sud-est du bassin caractérisée par une salinité sujette à variations selon le lieu et l'état de la marée. Ainsi pratiquement nulle dans la rivière, la teneur en sels atteint en moyenne pour les prélèvements intéressés 12 à 13 g/l. De plus, cette région présente une teneur en matière organique élevée notamment dans les sédiments. La majorité des isolements (74 %) provient des prélèvements effectués de mai à octobre, période où la température de l'eau égale ou dépasse 15°C. Cette catégorie de vibrions se rencontre surtout dans les eaux (81 %). Ces deux remarques sont valables quel que soit le groupe biochimique examiné.

Le biotype 2 se rencontre surtout dans les eaux de la rivière et du proche estuaire, peu fréquent dans les sédiments (14 %) dont il est pratiquement absent en période froide. Le biotype 1 présente un comportement similaire à cette différence près que les pourcentages

de vibrions dans l'eau (77 %) et dans les sédiments (23 %) restent identiques en période chaude ou froide. Enfin, le biotype 5, saccharose-négatif, ne se développe pratiquement que dans des eaux à très faible salinité c'est-à-dire dans la rivière et surtout en période chaude.

En accord avec les auteurs américains (Colwell et coll., 1977) et européens tels Muller (1980), Pujalte et coll. (1983), West et Lee (1982), on peut conclure que les vibrions non-agglutinables se rencontrent principalement dans l'environnement au niveau des eaux de surface douce et saumâtre (régions d'estuaire) avec une prolifération accentuée en été. Ils peuvent être assimilés à des constituants de la microflore autochtone des rivières. Une origine fécale paraît improbable, aucune corrélation avec le nombre de coliformes fécaux, par exemple, ne peut être établie. Lee et coll en 1982 mettent l'accent sur les relations possibles entre ces vibrions et les animaux surtout les oiseaux aquatiques susceptibles de disséminer ces bactéries et d'en assurer la pérennité. Enfin, ils peuvent être pathogènes. De nombreux auteurs citent des cas de gastro-entérites accompagnées ou non de septicémie.

* A côté de ces vibrions, 257 souches de *V. parahaemolyticus* ont été isolées en nombre sensiblement équivalent dans les eaux et les sédiments. Elles donnent toutes une réaction de Kanagawa négative : absence d'hémolyse sur milieu de Wagatsuma (Miyamoto et al., 1969) comme c'est le cas pour 99,5 % des souches isolées de l'environnement.

Les isolements effectués en période que l'on peut qualifier de chaude (température de l'eau égale ou supérieure à 15°C) prédominent (72 %) aussi bien dans l'eau que dans les sédiments. Lorsque les conditions thermiques se détériorent, la présence du vibrion se raréfie dans les eaux, il subsiste dans les sédiments mais vraisemblablement en très faible nombre car l'analyse habituelle des 5 g est négative alors que le traitement de plusieurs centaines de g, le met en évidence.

L'examen de la localisation géographique révèle, pendant la période de mai à octobre, de grandes similitudes avec les sites d'isolement de V. cholerae nag mais sa disparition de la colonne d'eau en période froide le singularise nettement. Comme l'envisagent Kaneko et Colwell (1973) ou Sochard et coll. (1979), cette bactérie survit pendant les conditions défavorables dans les sédiments mais est également associée au zooplancton marin (copépodes).

On admet classiquement que l'embouchure des rivières constitue le foyer de prédilection de V. parahaemolyticus. Les résultats de nos recherches vont également dans ce sens, la bactérie est encore isolée, en été, à cinq kilomètres en amont de l'estuaire de l'Eyre. On pourrait hâtivement conclure avec Yasunaga (1964) que la source du vibrion parahémolytique est terrestre, déduction paradoxale pour ce vibrion que les premiers chercheurs japonais ont qualifié de "pathogène halophile". Cette déduction est contredite par le fait que V. parahaemolyticus n'est jamais isolé d'une rivière non soumise au régime des marées. Tous les prélèvements effectués au-delà de la portion du cours d'eau influencée par les marées se sont révélés négatifs. Les travaux de Aiso et coll. cités par Kaneko et Colwell (1973) permettent, peut-être, de comprendre la survie de cette bactérie en eau pratiquement douce. Selon ces auteurs, l'optimum de concentration en NaC1 influant sur la croissance du vibrion dépend de la température. A 20°C, l'optimum se situe entre 0,5 et 1 %, à 37° à 3 %; la croissance s'arrête pour une teneur inférieure à 0.05 %. Si l'on extrapole ces observations à l'environnement naturel dans le bassin d'Arcachon où l'on relève une température moyenne de la rivière ne dépassant que très rarement 20°C, on peut concevoir une survie de courte durée de l'ordre d'un cycle de marée à de très faible salinité. Il ne faut pas écarter, comme l'indiquent Sarkar et collaborateurs (1983), une association possible avec le plancton d'eau douce.

* Vibrio alginolyticus présente de grandes similitudes physiologiques et biochimiques avec la bactérie précédente mais en diffère par une halophilie plus marquée (croissance dans des milieux supplémentés à 10 % de NaCl) et par la dégradation du saccharose.

Six cent trente huit souches ont été isolées des eaux et des sédiments en proportions sensiblement égales. Sur le plan qualitatif, aucune influence de la température ne peut être notée contrairement aux 2 précédentes espèces. Quelle que soit la date du prélèvement, la localisation reste la même: tous les territoires sont colonisés à l'exception de la rivière et de son embouchure immédiate. On peut remarquer, avec Sakazaki et Balows (1981), que ce vibrion paraît être le plus commun dans les eaux côtières.

Les résultats des numérations mensuelles de "vibrions halophiles thermophiles" confirment l'influence de la température sur la croissance de ces 2 catégories de vibrions, le tableau suivant regroupe les moyennes des dénombrements par trimestre. De façon à mettre en relief l'action du facteur thermique, les mois composant le trimestre ont été choisis de façon que les eaux présentent entre elles des écarts de température aussi faibles que possible. On remarque ainsi que deux trimestres ont une moyenne de 20 à 21°C, les deux autres 9 à 10°C. On constate d'abord, à une exception près (automne 1982), le faible

Période	1982		1983					1984
	Mai Juin Juillet	Août Septembre Octobre	Novembre Décembre Janvier	Février Mars Avril	Mai Juin Juillet	Août Septembre Octobre	Novembre Décembre Janvier	Févrie Mars Avri
Température Moyenne °C	21	20	9	12	21	21	10	11
Eyre (2h. Jusant)	5.102	1,2.104	2,7.103	4,8.103	1,9.103	5.10 ²	2,7.103	6.10
Balise D14	4.104	3,2.104	1,7.103	1,5.103	1,7.104	3,9.104	3,8.103	8,4.1
Ві	1.105	3,2.104	1,3.104	7.102	4,7.104	1,2.105	3,2.103	1,6.1
9	5.103	7.104	1,3.104	1,9.103	5.103	5,2.104	1,8.103	1,8.10
2	1,1.104	4.104	1,8.103	8.102	3,3.103	1.104	2,2.103	3,5.1
12	1,2.104	4.104	1,3.103	3,8.103	1.104	4,2.104	1,9.103	4.10
GI	2,7.104	4,7.104	1,5.103	2,1.103	1,2.104	4,3.104	3,2.103	1,8.10
	-	-	2,4.103	2,6.10 ³	1,7.104	3,2.104	9,4.103	3,1.10
но	-	-	7.103	2,4.10 ³	1,6.104	2.104	3,2.103	2,6.1
G8	-	-	3,5.103	2,3.10 ³	2,4.104	9.104	9,6.103	9,8.10
Н3	9,5.103	1,5.104	2.103	5,5.10 ³	1,7.104	1,5.104	3,8.103	2,2.1
Les trois barres	2,3.103	2,1.104	5.103	1,8.103	2,1.103	1,3.103	1,1.103	5,3.10
Eyre (2h. flot)	3.102	5.103	6.102	2,4.103	1.103	3.102	1,8.103	3.10

⁻ Tableau des moyennes trimestrielles des dénombrements de vibrions halophiles thermophiles (microorganismes par litre).

nombre de vibrions dans l'Eyre et l'estuaire de la rivière. Aucune influence de la température ne se manifeste. Par contre, les prélèvements effectués dans la rivière 2 heures après la pleine mer fournissent toujours des dénombrements supérieurs à ceux obtenus à partir d'eaux récoltées 2 heures après la basse mer. On peut donc en conclure que cette catégorie de micro-organismes ne se développe pas dans des eaux pratiquement douces mais qu'elle est apportée par les eaux marines à l'occasion des marées. Dans toutes les autres stations du bassin, la température agit fortement sur le développement des vibrions, la différence entre périodes froide et chaude se concrétise sur le plan numération par un gain minimum d'une puissance de 10, surtout pendant les mois d'août, septembre et octobre. Les valeurs les plus fortes sont relevées à l'est (balises B1 et G8).

- * Vibrio metschnikovii, anciennement dénommé V. proteus ou encore V. cholerae biotype proteus est une bactérie bien inféodée au bassin d'Arcachon. Ce vibrion se singularise par l'absence de cytochrome-oxydase, très généralement par la nonproduction d'indole et l'incapacité de réduire les nitrates. Pendant deux années de recherches, 128 souches ont été extraites des eaux et 75 des sédiments. La fréquence des isolements, fait surprenant car inhabituel, augmente d'une manière très sensible durant la période froide: 65 % contre 35 % pendant les mois de mai à octobre. Le maximum de souches récoltées se situe à la fin de l'hiver et au début du printemps. C'est la première fois, au cours de ce travail, que l'on assiste à un comportement semblable qui coïncide avec l'observation, également pour la première fois, d'une espèce capable de se développer à 5°C. Ainsi, son caractère plus psychrophile que mésophile pourrait expliquer un meilleur développement pendant les mois froids où la température moyenne du milieu aquatique oscille entre 6 et 10°C. Pendant la saison froide, cette bactérie est présente dans la totalité du bassin y compris la rivière. De mai à octobre, elle subsiste dans la rivière, au niveau de l'estuaire et plus au Nord dans la région d'Andernos, zone de salinité variable, à teneur en matière organique non négligeable. S'accommodant in vitro de salinité allant de 0 à 10 % selon les biotypes, on conçoit qu'elle puisse exister dans des environnements très divers. Ainsi la croissance de V. metschnikovii, que certains auteurs comme Rajashekaraiah (1981) considèrent comme pathogène opportuniste, semble stimulée par les basses températures.
- * Enfin, sur une durée d'analyse de 16 mois, 46 souches de *V. anguillarum* ont été récoltées. Elles se développent entre 0,5 et 7 % de NaC1; les températures de 42°C et même de 37°C dans près de la moitié des cas ne permettent pas la croissance qui, en revanche, se déroule normalement à 5°C. Du point de vue numérique, on ne note pas de différences entre les deux grandes périodes de prélèvement. Il en va tout autrement si l'on compare le lieu d'origine. Pendant les mois froids, la fréquence de la distribution diminue fortement dans les eaux : elle atteint 14 % en moyenne alors que les sédiments paraissent bien pourvus. Lorsque la température du milieu aquatique s'élève au-delà de 15°C, on isole ce vibrion aussi bien de l'élément liquide que solide. Ce comportement rappelle celui de *V. parahaemolyticus*, le facteur température doit en être la cause. La localisation géographique ressemble également à celle de *V. parahaemolyticus*.

A côté du grand ensemble constitué par les 5 espèces qui viennent d'être décrites, V. vulnificus et V. shigelloides furent isolés de façon très sporadique. Leur très faible fréquence d'isolement tend à nous les faire considérer comme des micro-organismes en transit plutôt que comme des habitants permanents du milieu aquatique.

CONCLUSION

Il existe une variété assez grande d'espèces qui semble refléter la diversité des faciès du milieu aquatique dans le bassin d'Arcachon. Deux facteurs de l'environnement jouent un rôle déterminant : la température et la salinité. Il convient d'ajouter, dans une moindre mesure, la teneur en matière organique.

Aucune corrélation entre la présence de coliformes fécaux et de vibrions n'a pu être établie, ce qui traduit le caractère autochtone de ces derniers.

Malgré cette relative abondance de vibrions, aucune pathogénie déclarée n'est à signaler dans le bassin d'Arcachon.

Brenner D.J., Davis B.R., 1981. Characterization of biochemically atypical V. Cholerae strains and designation of a new pathogenic species, V. mimicus. J. clin. Microbiol., 14, no6, 631-639.

COLWELL R.R., KAPER J., JOSEPH S.W., 1977. Vibrio cholerae, Vibrio parahaemolyticus and other vibrios, occurrence and distribution in Chesapeake Bay. Science, 198, no 4315, 394-396.

HEIBERG B., 1936. The biochemical reaction of vibrios. J. Hyg., Camb., 36, 114-117.

KANEKO T., COLWELL R.R., 1973. Ecology of Vibrio parahaemolyticus and related organisms in Chesapeake Bay. J. Bacteriol., 113, 24-32.

KANEKO T., COLWELL R.R., 1978. The annual cycle of Vibrio parahaemolyticus in Chesapeake Bay. Microbiol. Ecology 4, 135-155.

KAPER J.B., LOCKMAN H., REMMERS E.F., KRISTENSEN K., COLWELL R.R., 1983. Numerical taxonomy of vibrios isolated from estuarine environments. *Internation. J. System. Bacteriol.*, 33, no 2, 229-255.

LEE J.R., BASHFORD D.J., DONOVAN T.J., FURNISS A.L., WEST P.A. 1982. The incidence of Vibrio cholerae in water, animals and birds in Kent, England. J. appl. Bacteriol., 52, no 2, 281-291.

MIYAMOTO Y., KATO T., OBARA Y., AKIYAMA S., TAKIZAWA K., YAMAI S., 1969. In vitro Hemolytic characteristic of Vibrio parahaemolyticus: its close correlation with human pathogenicity. J. Bact., 100, no 2, 1147-1149.

MULLER G., 1980. Non-agglutinating cholera-like vibrios in sewage, surface water and sea water. *Environ. Internation.*, 3, 59-63.

PULJATE M.J., ARNAU A., AMARO C., ALCAIDE E., GARAY E., 1983. Numerical taxonomy of Vibrio strains isolated from the coastal area of Valencia (Spain) in "Les Bacilles à gram négatif d'intérêt médical et en santé publique", Les Editions INSERM, PARIS. 1983.

RAJASHEKARAIAH K.R., 1981. Vibrio metschnikovii, bacteremia in a patient with cholecystitis. J. clin. Microbiol., 14, nº 6, 711-712.

SAKAZAKI R., BALOWS A., 1981. Genre Vibrio, Plesiomonas and Aeromonas in "The Prokaryotes", vol. I edited by Mortimer P. Starr.

SARKAR B.L., BALAKRISH-NAIR G., SIRCAR B.K., PALS.C., 1983. Incidence and level of Vibrio parahaemolyticus associated with freshwater plankton. Appl. environ. microbiol., 46, no 1, 288-290.

SOCHARD M.R., WILSON D.F., AUSTIN B., COLWELL R.R., 1979. Bacteria associated with the surface and gut of marine Copepods. Appl. environ. microbiol., 37, no 4, 750-759.

WEST P.A., LEE J.V. - Ecology of Vibrio species including Vibrio cholerae in natural waters of Kent, England. J. appl. Bacteriol., 52, no 3, 435.

YASUNAGA N., 1964. Studies of pathogenic halophilic bacteria. I. Pathogenic halophilic bacteria isolated from the river in Nagasaki City. Shokuhin Eisei kyu 5, 112-115.