

55

ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE VIBRIONS HALOPHILES D'UNE STATION EXPERIMENTALE DE MARICULTURE

V. BRUNI* ; E. CRISAFI** ; T.L. MAUGERI* ; R. ZACCONI**

* Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina. Università di Messina, MESSINA (ITALIA)

** Istituto Talassografico CNR. MESSINA (ITALIA).

RESUMÉ - A différentes périodes de l'année, 110 souches de vibrions ont été isolées à partir d'échantillons d'eau de mer, d'eau de bassin d'élevage et de hachis de poisson utilisé dans l'alimentation des poissons. Sur la base des caractères biochimiques et nutritionnels, la majorité des souches isolées ont été identifiées comme étant des *Vibrio anguillarum*. Beaucoup de souches toutefois n'ont pu être identifiées, et ont été rassemblées sous le terme de "autres vibrions". Les difficultés taxonomiques confirment l'existence de nombreuses souches intermédiaires ou atypiques même parmi les souches isolées de milieux particuliers, tel qu'un milieu d'élevage.

ABSTRACT - 110 vibrios strains were isolated, at various times of the year, from samples of sea-water supply, breeding-tank water and discarded fish used as food at the breeding stations. From the results obtained by the biochemical and cultural tests, it was possible to identify most of the isolated strains as *Vibrio anguillarum*. Strains with intermediate characteristics, above-all positive saccharose, proved to be numerous. The A.A discuss the occurrence, in particular environments such as those being studied, of atypical or intermediate vibrios strains which are difficult to classify.

INTRODUCTION

Les vibrions *Vibrio parahaemolyticus* (biotype I) et *Vibrio alginolyticus* (biotype II) sont présents dans les milieux côtiers et saumâtres. Ils sont tous deux considérés comme pathogènes pour les animaux marins (Vanderzant *et al.*, 1970 ; Vanderzant et Nickelson, 1972). Le caractère pathogène pour l'homme, vérifié pour le 1^{er} biotype (Sakazaki, 1968) est encore incertain pour le second (Blake *et al.*, 1980 ; Nacescu *et al.*, 1980).

Le *Vibrio anguillarum* est l'agent le plus pathogène chez les poissons et les autres animaux marins (Sindermann *et al.*, 1970 ; Aubert *et al.*, 1979). Cette espèce est ubiquiste dans les milieux aquatiques, et peut être présente sur la peau saine du poisson. Elle constitue, en tant que saprophyte, la majeure partie de la flore intestinale des organismes marins. Les modifications des conditions du milieu ou les traumatismes d'origines diverses agissent comme facteurs favorisant le déclenchement de l'infection (Di Salvo *et al.*, 1978). Un bassin d'élevage est un milieu fermé dont les caractéristiques (alimentation artificielle, surpopulation, rares renouvellements des eaux, sautes de température) pourraient favoriser le déclenchement d'épidémies chez les poissons en captivité (Evelyn, 1971 ; Gilmour, 1977).

Au cours des expériences sur l'élevage du téléostéen *Diplodus vulgaris* à l'Institut Talas-

sographique de Messina, il a été constaté une importante mortalité de certains sujets ; mortalité attribuée à une "vibriose" provoquée par le *V. anguillarum*, qui était systématiquement isolé chez les poissons présentant des signes évidents de maladie (Faranda *et al.*, 1982). Ces observations ont conduit à enquêter sur la présence de vibrions halophiles dans l'eau d'alimentation, dans l'eau des bassins et dans le hachis du poisson utilisé comme aliment pour les poissons en élevage, au cours de l'expérience.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

Conditions d'élevage :

La station étudiée, située au cap Peloro (Messina) possède plusieurs bassins d'élevage alimentés par de l'eau de mer. Les détails sont présentés dans le travail de Faranda *et al.*, (1983).

Échantillons :

Six échantillons d'eau d'alimentation, quatre échantillons d'eau prélevés dans les bacs, un échantillon de nourriture destinée aux poissons d'élevage (hachis congelé de poissons), ont été étudiés. Les résultats de l'utilisation de ce type de nourriture sur la croissance des espèces d'élevage ont déjà été publiés par Faranda *et al.*, (1984).

Méthodes d'analyse :

L'étude des bactéries hétérotrophes a été réalisée sur le milieu Marine Agar 2216 (Difco) par l'étalement en surface de 0,1 ml d'échantillon. Le dénombrement est effectué après 7 jours d'incubation à 24°C.

Pour les vibrions halophiles, les échantillons d'eau ont été filtrés sur membranes Millipore (0.45 μm de porosité) ; les membranes déposées sur le TCBS agar (Difco) ont été incubées à 24° et 35°C respectivement pendant 48 et 24 heures. Ces deux températures ont été utilisées pour une différenciation préliminaire des vibrions qui se développent aussi à 37°C (surtout le *V. parahaemolyticus* et le *V. alginolyticus*).

L'échantillon de nourriture (hachis de poisson) a été homogénéisé avec de l'eau peptonée à 3% de NaCl et, après dilution, a été inoculé sur des milieux identiques à ceux utilisés pour l'eau.

Les colonies suspectes, jaunes et vertes, isolées sur le TCBS, ont été soumises à des examens d'identification au moyen du système API 20 E (Maugeri *et al.*, 1983) et de méthodes traditionnelles. L'origine et le nombre des souches étudiées sont reportés dans le tableau I.

Les souches qui étaient négatives pour les caractères suivants :

- fermentation du lactose sur milieu de Kligler avec NaCl 3% ;
 - production d'H₂S sur TCBS ;
 - production de gaz fermenté sur milieu de Kligler avec NaCl 3% ;
 - coloration de Gram ;
 - culture sur eau peptonée avec NaCl 0% ;
- et qui étaient positives pour les caractères suivants :
- fermentation du glucose sur milieu de Kligler avec NaCl 3% ;
 - aspect en bacille ou virgule ;
 - sensibilité au composé vibriostatique 0/129 ;
 - culture sur eau peptonée avec NaCl 3% ;
- ont été considérées comme vibrions halophiles.

Echantillon	Date	T°C	Marine agar	TCBS 24°C	TCBS 35°C	N° des souches isolées
Eau d'alimentation	29.11.82	16,8	3,4 x 10 ⁴	6,0 x 10 ³	0	5
Eau d'alimentation	30.11.82	17,0	9,0 x 10 ³	2,5 x 10 ²	2,4 x 10 ²	13
Eau d'alimentation	02.02.83	14,8	2,9 x 10 ⁴	2,5 x 10 ²	3	24
Eau d'alimentation	02.02.83	14,6	2,5 x 10 ⁴	1,1 x 10 ²	5	13
Eau d'alimentation	08.09.83	21,0	8,1 x 10 ⁴	2,2 x 10 ³	2,2 x 10 ³	2
Eau d'alimentation	08.09.83	23,9	2,8 x 10 ⁴	6,9 x 10 ²	7,5 x 10 ²	17
Eau des bassins	09.12.83	16,0	1,7 x 10 ⁵	-	3,0 x 10 ³	5
Eau des bassins	13.01.82	13,8	8,2 x 10 ⁴	-	64	23
Eau des bassins	05.05.83	16,0	3,3 x 10 ⁴	2,4 x 10 ⁴	-	7
Eau des bassins	07.09.83	20,5	8,4 x 10 ⁵	3,0 x 10 ⁴	1,9 x 10 ⁴	19
Nourriture	18.02.83	-	-	8,5 x 10 ⁴ (*)	-	27

(*) Le résultat se réfère à 1 gramme de nourriture homogénéisée.

Tableau 1 : Charges (/100 ml) en hétérotrophes totaux et en vibrions présomptifs dans les échantillons examinés.

Les caractères suivants ont également été étudiés : lysine décarboxylase, ornithine décarboxylase, arginine dihydrolase, culture sur eau peptonée avec NaCl 10% (selon Sakazaki), fermentation du saccharose avec NaCl 3%.

La distinction entre ces trois biotypes établis par Sakazaki *et al.* (1963) est effectuée sur la base de trois caractères : culture avec NaCl 10%, fermentation du saccharose et production d'écétoïne.

La mesure de la sensibilité à 9 antibiotiques parmi les plus communs (bacitracine, chloramphénicol, colistine, érythromycine, novobiocine, pénicilline, polymyxine B, streptomycine et tetracycline) et au sulfamide sulfatiazole (Difco) a été réalisée par la technique de l'antibiogramme sur milieu gélosé. Chaque souche a été repliquée en bouillon de culture (Marine Broth 2216-Difco), puis incubée 24 h à 24°C. La culture a été diluée en eau de mer stérile jusqu'à une densité optique 0.10 (à 625 nm). Cette suspension a été utilisée pour inoculer en surface le milieu gélosé (Marine Agar 2216-Difco). Le degré de résistance a été établi selon l'échelle des zones d'inhibition établie par les laboratoires Difco.

RÉSULTATS

Le tableau 1 présente les dates de prélèvement, les températures, les nombres de bactéries hétérotrophes et de vibrions halophiles ainsi que le nombre des souches de "vibrions présomptifs" isolées de l'eau d'alimentation, de l'eau des bassins et de la nourriture.

Les dénombrements les plus élevés, comme on pouvait s'y attendre, ont été trouvés dans les échantillons d'eau des bassins d'élevage et, en particulier lorsque la température était la plus élevée (20,5°C) le 7/9/1983. La quantité de vibrions halophiles par rapport aux hétérotrophes totaux était élevée. Des tests préliminaires, effectués selon les indications fournies par Barrow (1973) (sensibilité au 0/129, réaction de Gram, croissance à diverses concentrations de NaCl, mobilité, test à l'oxydase) sur 156 souches isolées par le TCBS et considérés comme des "vibrions présomptifs" ont confirmé l'appartenance au genre *Vibrio* de 110 souches. Les caractéristiques biochimiques et culturelles de ces 110 vibrions par comparaison avec trois souches de vibrions fournies par la "National Collection of Marine Bacteria" de Aberdeen (Écosse) ont été reportées dans le tableau 2.

Test	Souche	V (1)	V (2)	V (3)	V (4)	V (5)	V (6)	V (7)
O/129		+(100)	+(100)	+(100)	+(100)	+	+	+
ONPG		V (84)	V (31)	V (50)	+(19)	+	+	-
ADH		V (80)	-(0)	-(0)	V (60)	+	-	-
LDC		-(0)	+(100)	+(100)	-(7)	-	+	-
ODC		-(0)	+(93)	+(100)	-(0)	-	-	-
CIT		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-	-	-
H ₂ S		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-	-	-
URE		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-	-	-
TDA		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-	-	-
IND		+(90)	+(100)	+(100)	V (60)	-	-	-
VP		V (12)	V (16)	V (50)	V (24)	-	-	-
GEL		V (58)	V (62)	V (67)	-(4)	+	-	-
GLU		+(100)	+(100)	+(100)	+(100)	+	+	+
MAN		+(97)	+(100)	+(100)	V (79)	+	+	+
INO		+(100)	-(0)	-(0)	-(0)	-	-	-
SOR		V (21)	V (16)	-(0)	V (13)	-	-	-
RHA		-(3)	-(0)	-(0)	-(0)	-	-	-
SAC		V (84)	-(0)	+(100)	V (66)	-	-	-
MEL		-(0)	-(0)	-(0)	-(0)	-	-	-
AMY		V (77)	V (16)	V (33)	V (25)	-	+	+
ARA		V (34)	V (23)	V (33)	V (13)	-	-	-
OX		+(100)	+(100)	+(100)	+(100)	-	+	+
Croissance à 35°C		V (81)	+(100)	+(100)	+(91)	-	-	-
Croissance à 42°C		-(2)	V (15)	+(100)	-(6)	-	-	-
Croissance avec 0% NaCl		V (19)	-(0)	-(0)	V (16)	-	-	-
Croissance avec 3% NaCl		+(100)	+(100)	+(100)	+(100)	-	-	-
Croissance avec 10% NaCl		-(7)	-(8)	V (67)	V (25)	-	-	-

Tableau 2 : Caractéristiques de 110 souches de vibrions isolés et des souches de référence (le nombre entre parenthèse indique le pourcentage des souches avec réaction positive).

V (1) = *V. anguillarum* (59 souches); V (2) = *V. parahaemolyticus* (13 souches); V (3) = *V. alginolyticus* (6 souches); V (4) = *Autres vibrions* (32 souches); V (5) = *V. anguillarum* NCMB 1291; V (6) = *V. fisheri* NCMB 1274; V (7) = *V. natriegens* NCMB 857

La plupart des colonies jaunes (sacc+) du TCBS agar était des *V. anguillarum*, d'autres des *V. alginolyticus* ou "intermédiaires". Ces dernières ont été appelées "autres vibrions" parce qu'ils n'étaient pas facilement assimilables à des espèces déterminées. Seulement 13 souches (sacc-) étaient des *V. parahaemolyticus* typiques.

Le tableau 3 présente la sensibilité aux substances antibactériennes des 59 souches de *V. anguillarum*. Sur la base de la largeur des zones d'inhibition de croissance autour du disque, on a pu diviser les souches en trois catégories : sensibles, intermédiaires ou résistantes. Toutes les souches se sont avérées sensibles au chloramphénicol qui a produit des halos d'inhibition les plus grands, en accord avec ce qui avait été déjà observé lors des recherches précédentes (Bruni *et al.*, 1983). La tétracycline s'est également montrée

efficace sur toutes les souches examinées mais avec des diamètres d'inhibition inférieur à ceux du chloramphénicol. Quatre souches seulement se sont montrées résistantes à la polymyxine B, considérée comme assez active. De plus, bien que uniquement cinq souches aient été résistantes à la colistine, la novobiocine et l'érythromycine, les halos mis en évidence pour les autres souches étaient de surface variable. La bacitracine s'est avérée l'antibiotique le moins efficace, le nombre de souches résistantes étant très élevé.

		Sensibles	Intermédiaires	Résistantes
Bacitracine	10 U	1	3	55
Chloramphénicol	30 µg	59	0	0
Colistine	10 µg	50	4	5
Erythromycine	15 µg	23	31	5
Novobiocine	30 µg	28	26	5
Pénicilline	10 U	8	29	22
Polimyxine	300 U	48	7	4
Streptomycine	10 µg	5	24	30
Sulfatiazole	300 µg	38	14	7
Tétracycline	30 µg	55	4	0

Tableau 3 : Expériences de sensibilité à des substances antibactériennes des 59 souches de *Vibrio anguillarum*.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les vibrions halophiles constituent une partie importante de la flore bactérienne des milieux examinés. L'accroissement de leur nombre dans les eaux de bassin peut être en relation avec la nourriture employée. Valdimarsson (1977) avait déjà observé des densités plus élevées, en hétérotrophes comme en *Vibrio* sp., dans les eaux des bassins que dans l'eau d'alimentation.

Les souches le plus fréquemment isolées ont été celles de *V. anguillarum* du type **A** de Smith, biotype II ou *V. ordalii* (Schiewe *et al.*, 1981). Cette espèce a été isolée sur tous les échantillons examinés. Plus rarement le *V. alginolyticus* et le *V. parahaemolyticus* ont été rencontrés.

L'espèce *V. anguillarum*, représente l'agent étiologique le plus connu dans le cas d'infections touchant des espèces très variées de poissons (Kusuda *et al.*, 1979 ; Egidius, 1983). Les biotypes de *V. anguillarum* ont été différenciés sur la base de la fermentation du saccharose, du mannitol et de la production d'indole (Nybelin, 1935 ; Smith, 1961). Pour Hastein et Smith (1977) il s'agit de 2 biovars (biovar I, arabinose-positif ; biovar II, arabinose-négatif). Le *V. ordalii* (Schiewe) correspondrait au biotype **II**.

Il serait par conséquent intéressant de définir le nombre normal de bactéries pour cette espèce dans nos milieux, en tenant compte surtout de la température élevée de l'eau dans la période été-automne. En effet, les données de la littérature se réfèrent à des environnements où la température est considérablement inférieure à celle de notre latitude. En ce qui concerne les élevages danois, par exemple, Larsen et Jensen (1982) reportent que la charge en *V. anguillarum* de 1000/100 ml d'eau et de 5-10.000/g de sédiment peut être considérée comme indicatrice de contamination et constituer un risque potentiel pour les poissons qui ont des lésions cutanées.