

47770
Centre de Brest
I.F.R.E.M.E.R.
29273 BREST Cedex

ERL-CAH-V
Laboratoire Arago
Université P. & M. Curie
UA 117
66650 Banyuls sur mer

DÉPARTEMENT ENVIRONNEMENT
LITTORAL ET GESTION DU MILIEU
MARIN

Utilisation de marqueurs isotopiques dans la biodégradabilité de la matière organique

Deuxième partie

**RECHERCHE de traceurs marqués
INDICATEURS de l'ACTIVITE
métabolique d'une
BACTERIE ENTERIQUE (*E. coli*)
et de son transfert chez DEUX
MOLLUSQUES FILTREURS.**

G. CAHET

IFREMER N°90 430 436

IFREMER-DERO/EL



0EL04419

Centre de Brest
I.F.R.E.M.E.R.
29273 BREST Cedex

Laboratoire Arago
Université P. & M. Curie
UA 117
66650 Banyuls sur mer

Utilisation de marqueurs isotopiques dans la biodégradabilité de la matière organique

Deuxième partie

**RECHERCHE de traceurs marqués
INDICATEURS de l'ACTIVITE
métabolique d'une
BACTERIE ENTERIQUE (*E. coli*)
et de son transfert chez DEUX
MOLLUSQUES FILTREURS.**

G. CAHET

IFREMER N°90 430 436

**RECHERCHE de traceurs marqués
INDICATEURS de l'ACTIVITE
métabolique d'une
BACTERIE ENTERIQUE (*E. coli*)
et de son transfert chez DEUX
MOLLUSQUES FILTREURS.**

I. Traceurs marqués comme indicateurs de l'activité métabolique d'*E.coli* soumis à divers facteurs environnants (salinité, lumière, matière organique).

II. Devenir de cellules vivantes marquées (type *E.Coli*) lors de leur capture par deux bivalves: *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis*.

I. Traceurs marqués comme indicateurs de l'activité métabolique d'*E.coli* soumis à divers facteurs environnants (salinité, lumière, matière organique).

Dans un rapport précédent nous avons testé la 3H-methylthymidine comme substance-test de réponse physiologique à des agents extérieurs.

Nous avons appliqué, à nouveau, cette technique lors d'opérations de survie d'une bactérie d'origine entérique (*E.coli*) en recherchant deux groupes majeurs de macromolécules, l'ADN et les protéines au sens large du terme.

A cette occasion, un autre traceur a été employé, la leucine marquée au carbone 14 ou au tritium.

I.1. Protocole de recherche des macromolécules.

Lorsqu'un composé marqué au tritium est utilisé dans la formation biochimique de macromolécules, le protocole adopté est le suivant: précipitation au TCA 10% final, passage à 4°C puis filtration sur membrane 0,2 µ et lavage à l'alcool. La précipitation entraîne l'ensemble ARN, ADN, protéines, le lavage à l'alcool élimine les éventuels polysaccharides.

Généralement, l'ARN ne figure pas parmi les macromolécules formées dans des expériences à court terme (moins d'une heure)(ROBARTS et al., 1986; MORIARTY, 1986). Pour plus de sécurité, un passage à la soude (1N à 60°C ou 5N à 30°C) élimine l'ARN et ce traitement permet la récupération de l'ensemble ADN-protéines (fig.1). Parallèlement, on propose un traitement TCA 10 ou 20% à 80°C qui élimine l'ADN, laissant les seules protéines présentes dans une nouvelle précipitation au TCA 10%.

On peut ajouter également une filtration directe avec lavage à l'eau glacée qui permet de mesurer une assimilation totale du traceur, comprenant l'ensemble des macromolécules formées et la thymidine intracellulaire non encore transformée.

On possède alors avec cette série d'analyses un ensemble de données susceptibles de nous renseigner sur la réponse des bactéries à un agent stressant.

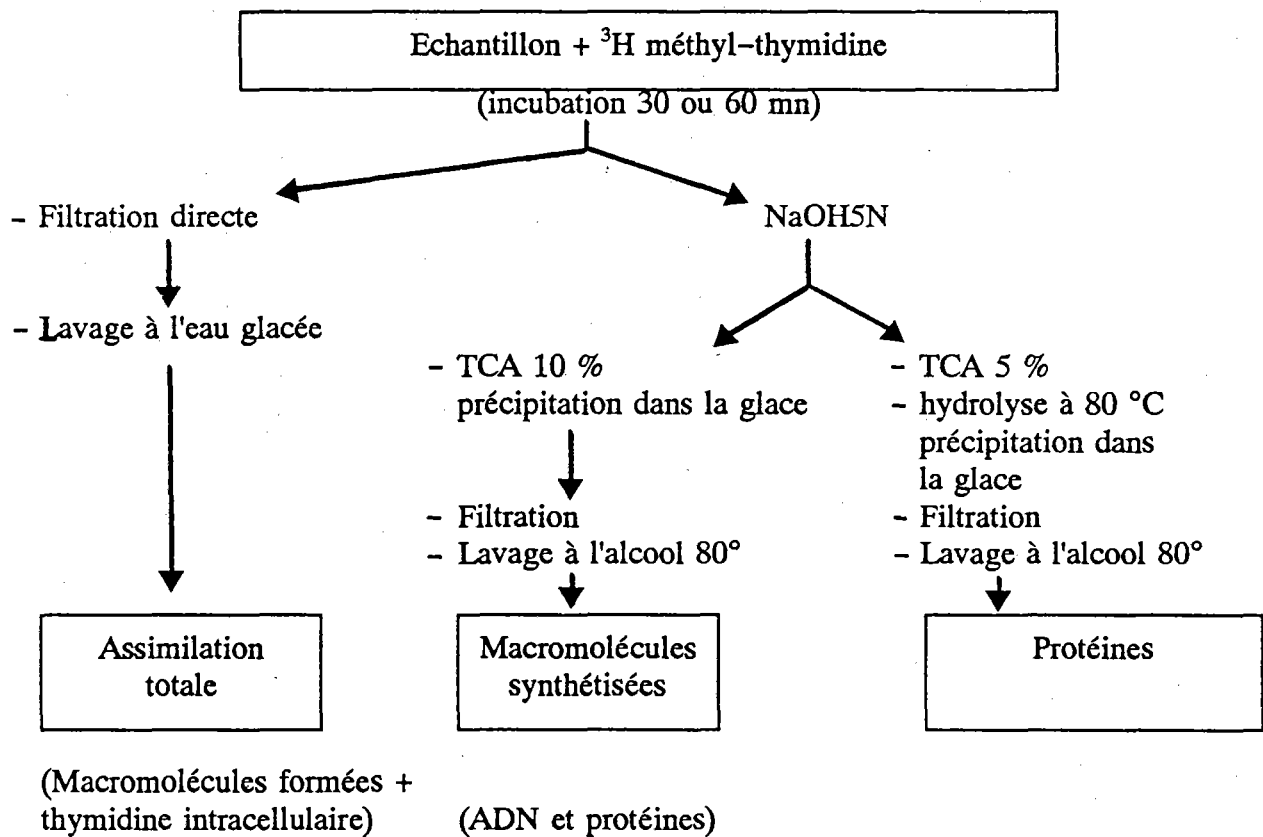


Figure 1 : Protocole expérimental appliqué à l'incorporation de ^3H méthyl-thymidine dans les bactéries.

Le protocole expérimental exposé en figure 1 est appliqué à des échantillons prélevés à 30 (le plus souvent) et 60 minutes (lors de certaines expériences).

Le même protocole est employé pour la leucine. Tous les radiocomptages sont effectués par scintillation liquide avec le Dynagel(Baker) comme scintillant et mesurés à l'aide d'un Beckman LS 5000E. Les résultats sont exprimés en % dpm par rapport à la quantité de dpm injectée.

I.2.Résultats

A. Influence de l'eau de mer sur l'activité métabolique d'E.coli: effet immédiat.

L'incubation de *E.coli* (H 10407) en présence de 3H-méthylthymidine permet de constater, dès leur mise en suspension dans l'eau de mer ou dans l'eau douce, un effet évident du milieu (fig. 2). Quatre essais ont été pratiqués sur les tests d'assimilation totale, synthèse ADN, synthèse protéines.

Dès le T0, l'assimilation totale du traceur est nettement plus élevée dans l'eau douce que dans l'eau de mer. On peut également observer un taux plus faible d'ADN et de protéines marqués dans l'eau de mer par rapport à l'eau douce.

L'eau de mer aurait donc une action immédiate et inhibitrice sur le transport de la 3H-méthylthymidine dans *E.coli* et sur la synthèse de macromolécules. BARCINA et al.(1990), utilisant du ¹⁴C glucose, montrent que l'assimilation de ce composé par *E.coli* est environ 20 fois plus importante dans l'eau douce que dans l'eau de mer.

Il faut toutefois noter que nous ne tenons pas compte, ici, des réactions ultérieures de la souche face à l'agression de l'eau de mer. Il est possible qu'elle rétablisse, par la suite, son métabolisme après avoir mis en action la "pompe à sodium".

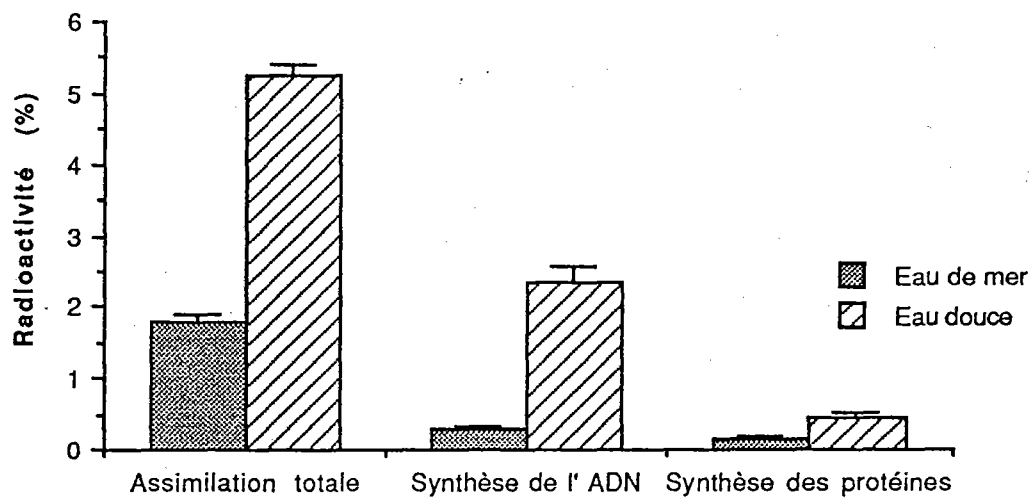


Figure 2 : Effet immédiat du milieu (eau de mer et eau douce) sur l'assimilation totale de ^3H méthyl-thymidine, la synthèse de l'ADN et la synthèse des protéines. Chaque valeur représente la moyenne de 4 essais \pm 1 écart-type.

B. Influence de la lumière visible sur l'activité métabolique (court terme: 48 heures).

Après exposition de 24-48 h. à la lumière visible, des échantillons sont prélevés et incubés 30 minutes avec de la 3H-méthylthymidine(fig.3). Les résultats indiquent une diminution rapide dans les 24 heures de l'assimilation totale et de la synthèse de macromolécules.

Ces résultats confirment ceux exposés dans un rapport précédent pour des situations expérimentales similaires. BARCINA et al.(1990) observent que l'exposition à la lumière naturelle provoque aussi en 48 heures une chute très importante de l'assimilation du glucose marqué dans l'eau de mer et dans l'eau douce. A l'obscurité, cette assimilation reste constante et est 20 fois supérieure dans l'eau douce par rapport à l' eau de mer.

On constate donc que l'effet de la lumière est ici plus immédiat avec la thymidine comme précurseur qu'avec le glucose.

Dans ces mêmes expériences, nous avons également testé l'incorporation de 14C leucine et de 3H leucine avec cette souche.

A aucun moment, nous n'avons pu relever(tabl.annexe I) la formation de 14CO₂, seul à T0 a-t-on pu noter quelques % en incorporation totale et en macromolécules précipitables au TCA 10%. La réponse est nettement meilleure en eau douce. En eau de mer, la leucine 14C n'est pas intégrée dans les macromolécules et la 3H leucine faiblement dans un seul cas.

Ainsi donc, en quelques heures, une inhibition quasi complète de l'assimilation totale et de la synthèse de macromolécules est constatée chez *E.coli* exposé à la lumière en eau de mer.

A l'obscurité, une activité métabolique est préservée à faible niveau lorsque les conditions expérimentales ne sont pas trop stressantes (eau douce). Or les bactéries sont présentes et cultivables (fig.4), mais leur métabolisme a déjà évolué à très court terme.

A ce titre, l'utilisation de la 3H-méthylthymidine semble un bon indicateur de situations écologiquement stressantes.

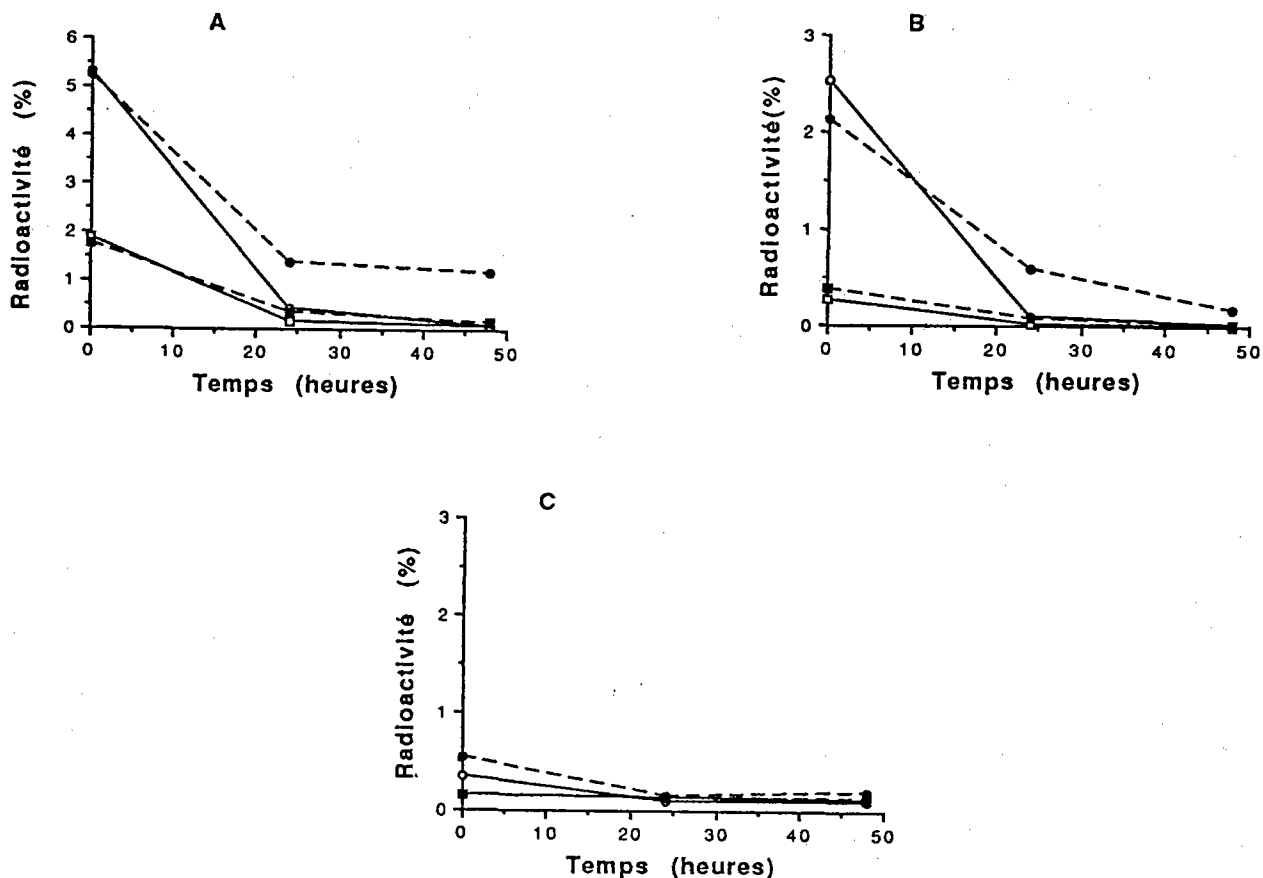


Figure 3 : Influence de la lumière visible sur l'assimilation totale (A), sur la synthèse de l'ADN (B), sur la synthèse des protéines (C) après incubation avec la ^3H méthyl-thymidine.

Eau de mer - lumière (—□—), eau de mer - obscurité (—■—), eau douce - lumière (—○—), eau douce - obscurité (—●—). Chaque point représente la moyenne de 2 essais.

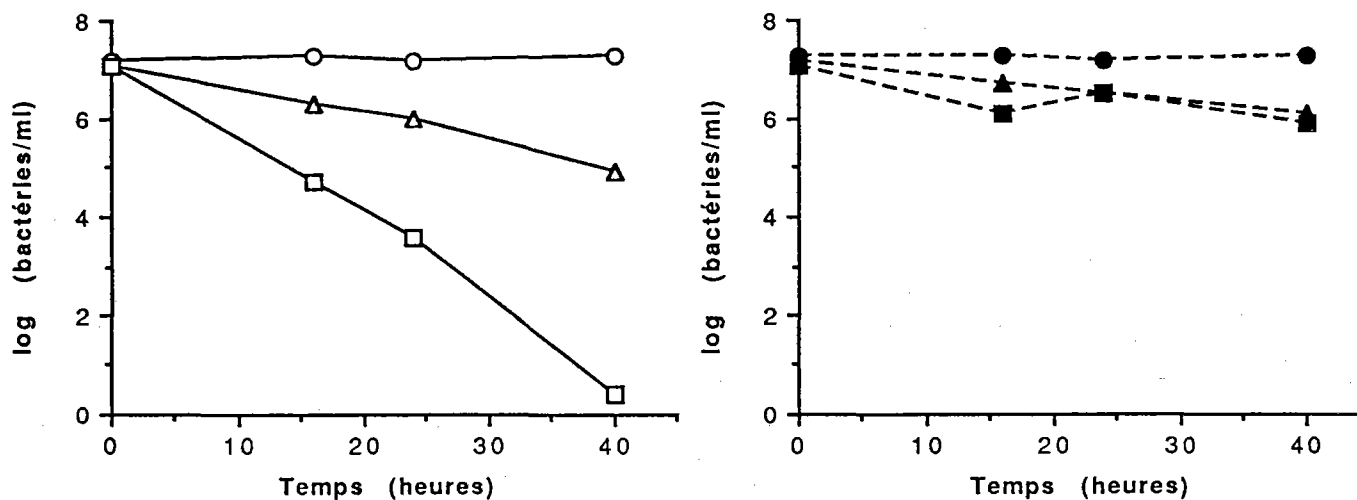


Figure 4 : Survie d'*E. coli* dans l'eau de mer avec exposition à la lumière visible (A) et à l'obscurité (B) par trois techniques de numérations différentes.

Lumière (traits pleins et sigles vides). Obscurité (traits pointillés et sigles pleins). AODC (○, ●), DVC (Δ, ▲) et comptage du nombre d'UFC (□, ■). Chaque point représente la moyenne de 2 essais.

C. Effet protecteur de la matière organique en tant que nutriments et/ ou osmoprotecteurs à l'égard de la lumière visible (court terme; 72 heures).

Lors d'une autre expérience, l'effet toxique de la lumière sur *E.coli* a été examiné en survie dans de l'eau de mer naturelle stérile pauvre en matière organique (C.O.D.= 2,5 mg/l).

Des comparaisons de survie des bactéries exposées à la lumière dans l'eau de mer et dans l'eau douce indiquent une perte de cultivabilité plus rapide en eau de mer qu'en eau douce.

Deux explications ont été proposées:

- effet du choc osmotique en eau de mer,
- effet de la matière organique, en concentration plus élevée dans l'eau douce que dans l'eau de mer.

Cette constatation a conduit à une expérimentation tenant compte:

- de l'apport de nutriments
- de l'apport d'osmoprotecteurs (fig.5, milieu minimum M63 avec ou sans glycine-bétaïne, régulateur de la pression osmotique).

A la lumière, l'évolution du nombre de bactéries cultivables indique une chute très rapide du nombre de ces bactéries dans l'eau de mer qui n'a pas reçu de composés nutritifs ou osmoprotecteurs (fig.5). La meilleure protection est obtenue avec un milieu M 63 au 1/100 en présence de glycine-bétaïne et de BTS au 1/100.

A l'obscurité, la survie d'*E.coli* dans l'eau de mer est également améliorée par l'apport de matière organique ou d'osmoprotecteurs.

Concernant l'assimilation de la 3H-méthylthymidine, l'addition de matière organique à l'eau de mer, aux concentrations envisagées, ne suffit pas à empêcher l'effet de la lumière sur le métabolisme d'*E.coli* (fig.6). Une diminution très forte avec suppression du métabolisme après 24

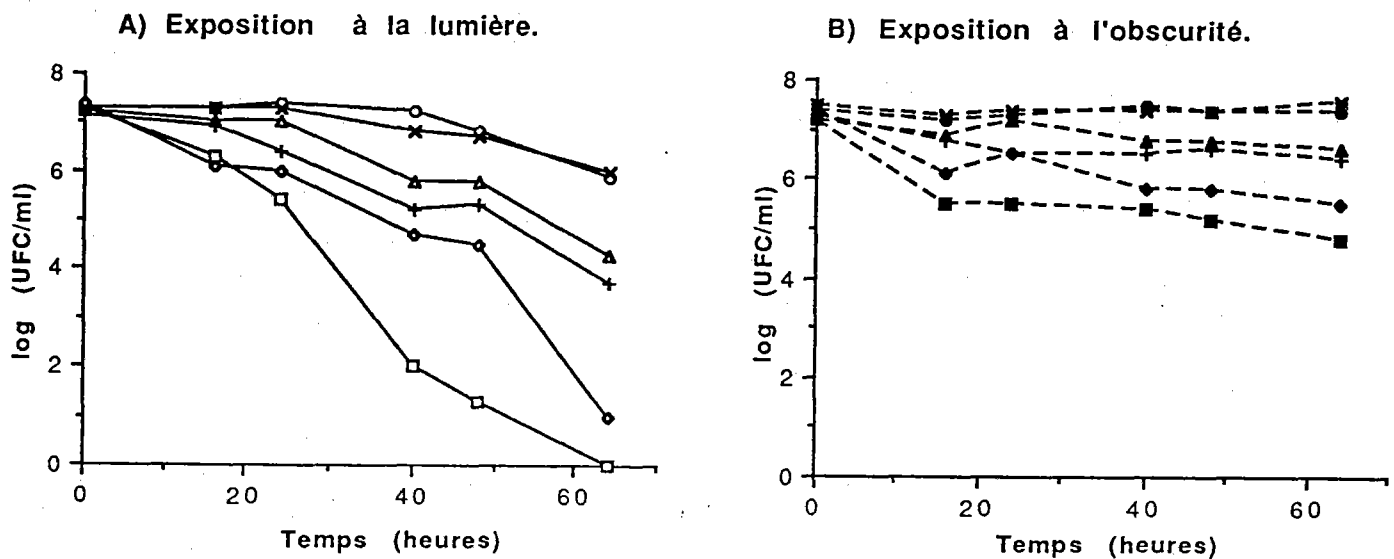


Figure 5 : Survie d'*E. coli* dans l'eau de mer avec exposition à la lumière visible (H) ou incubation à l'obscurité (B) avec apports ou non de nutriments avec ou sans osmoprotecteurs.

Lumière (traits pleins et sigles vides). Obscurité (traits pointillés et sigles pleins).
 Sans apports de nutriments ou d'osmo protecteurs (□, ■), milieu minimum M63 au 1/1 000 (◇, ◆), M63 au 1/1 000 + glycine-bétaïne (GB) 1 mM (+, +), M63 au 1/100 (△, ▲), M63 au 1/100 + GB 1 mM (○, ●), milieu riche (BTS) au 1/100 (×, ✕). Chaque point pour les échantillons placés à la lumière représente la valeur de 2 essais.

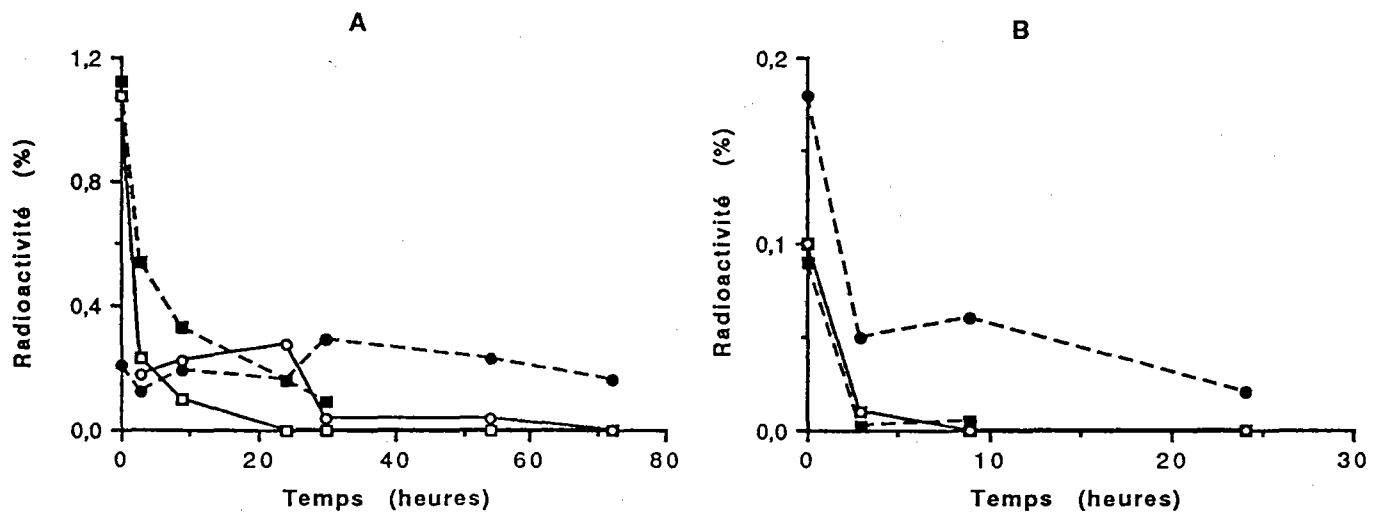


Figure 6 : Influence de l'apport de matière organique (BTS) sur l'assimilation totale de ³H méthyl-thymidine (A) et la synthèse de l'ADN (B) chez *E. coli* exposé à la lumière visible.

Eau de mer - lumière (—○—), Eau de mer - Obscurité (—■—)
 Eau de mer - BTS au 1/10 Lumière (—○—), Eau de mer - BTS au 1/10 obscurité (—●—). Chaque point représente la moyenne de 2 essais.

heures est constatée, tandis qu'à l'obscurité, elle diminue régulièrement sur 36 heures.

A l'obscurité, si on ajoute du BTS au $1/10^{\circ}$, l'assimilation totale est maintenue à un faible niveau dès T0 jusqu'à 72 heures, tandis qu'elle s'annule complètement à la 24^e heure en présence de lumière.

L'addition de matière organique agit donc comme un concurrent métabolique au début (T0), mais permet de maintenir une réponse à la thymidine sur une plus longue durée durant l'expérience (24 heures à la lumière ; 72 heures et au delà à l'obscurité).

La synthèse d'ADN est inhibée dans les 3 heures d'exposition à la lumière, avec ou sans addition de BTS au $1/10^{\circ}$. Bien qu'*E.coli* assimile à la lumière la 3H méthylthymidine sur 24 heures, il n'est donc plus capable de synthétiser à la lumière même avec du BTS $1/10$.

La condition "eau de mer- obscurité " présente des réponses équivalentes aux précédentes. Seule la condition " obscurité + BTS $-1/10$ " indique une synthèse ADN sensible à T0 et une activité légère jusqu'à la 72^e heure et peut-être au delà.

Une dilution au $1/100$ et au $1/1000$ a été pratiquée sur des échantillons " lumière" et " lumière + BTS $1/10$ " âgés de 24 heures. Ils ont été enrichis avec de l'extrait de levure 2,5% et placés à l'obscurité. On constate après 24 heures une reprise très nette de la part des échantillons "lumière + BTS $1/10$ " qui, à l'obscurité, capte vivement la 3H méthylthymidine et la transforme en ADN et ce , aussi bien pour la dilution au $1/100^{\circ}$ que celle au $1/1000^{\circ}$ (fig 7).

L'ajout initial de BTS au $1/10^{\circ}$ a donc mis *E.coli* en situation de reprise possible après exposition à la lumière, puis passage à l'obscurité, mais dilué et en présence d'extrait de levure.

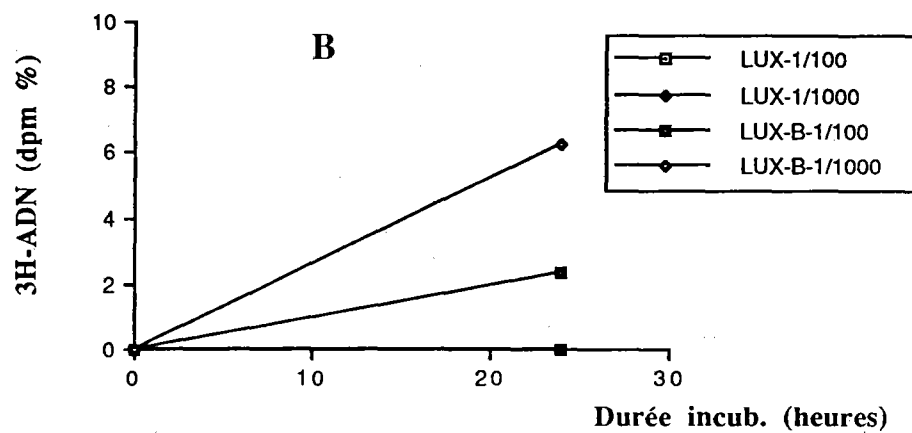
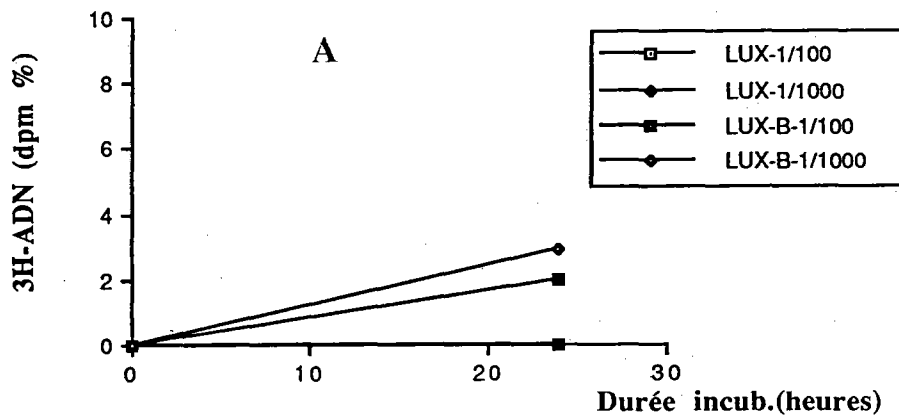
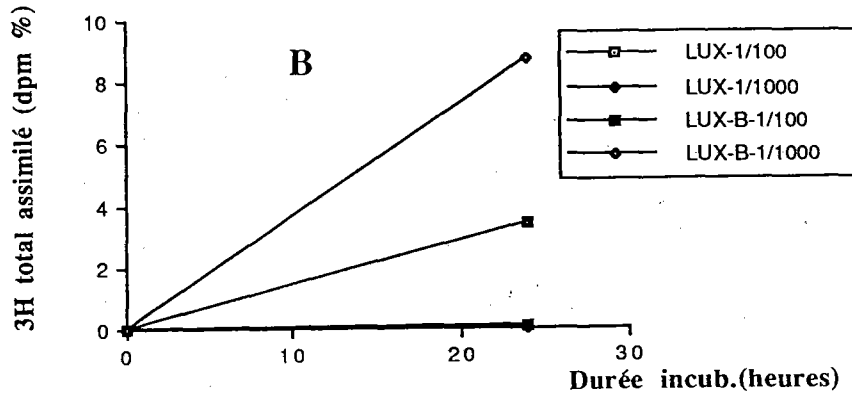
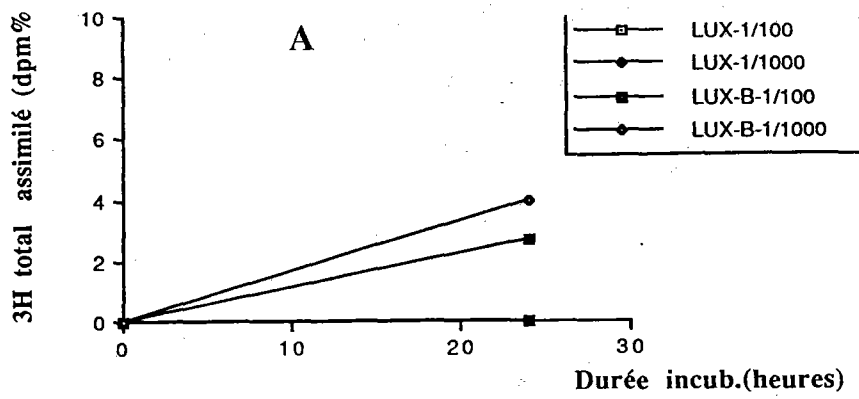


Figure 7.

Réponses à la 3H-thymidine d'échantillons " lux" et "lux + BTS 1/10" âgés de 24 heures , dilués (1/100 et 1/1000) , enrichis avec de l'extrait de levure 2,5%, puis placés à l'obscurité avec une incubation de 24 heures.

Durée du test thymidine : 30 (A) et 60 (B) minutes.

D. Réponses de E.coli à plus long terme en présence de faible quantité de lumière.

Une expérience menée dans des conditions de lumière limitante mais avec alternance jour-nuit in vitro indique bien (fig.8) que cette flore peut survivre longtemps et maintenir son caractère cultivable pendant plus de 30 jours en eau de mer.

Il faut attendre 3 à 4 jours, en eau douce ou en eau de mer, pour obtenir une réponse nette à la 3H-méthylthymidine. Une synthèse d'ADN microbien apparaît clairement et ce sur plusieurs jours. Ultérieurement, l'ADN n'est plus synthétisé, la situation de la microflore se dégrade et elle transforme la thymidine ajoutée en macromolécules protéiniques.

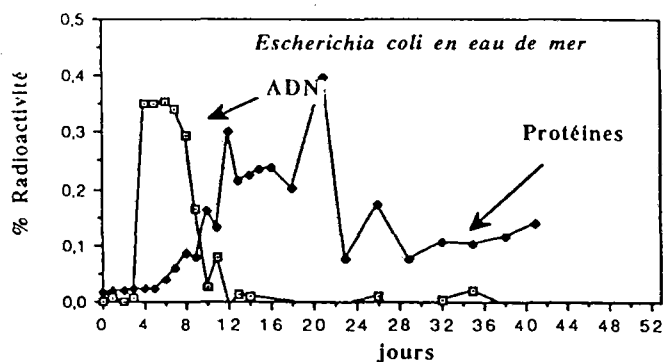
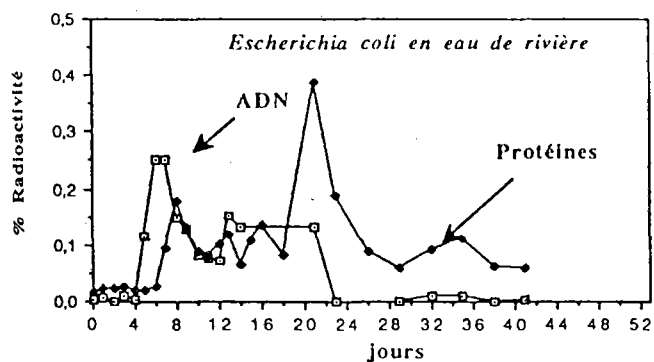
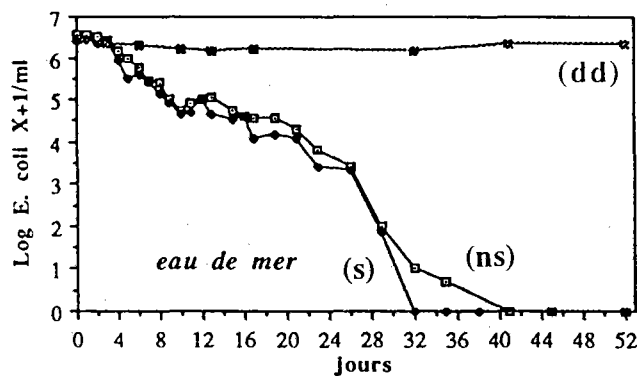
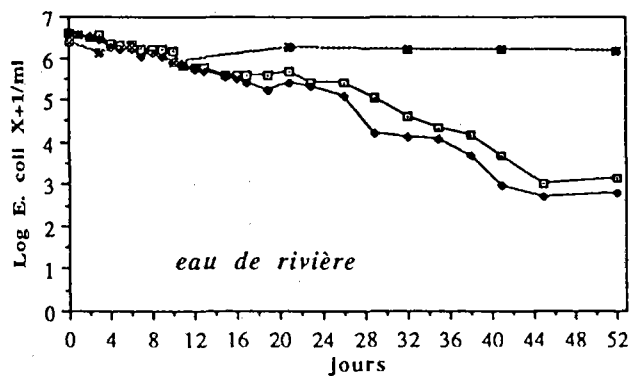


Figure 8. Suivi temporel journalier des abondances d' *E.coli* en eau douce et en eau de mer:
 - en haut, dénombrement indirect sur milieux de culture non sélectif (ns) ou sélectif (s) et par dénombrement direct(dd).
 - en bas, radioactivité incorporée sous forme d'ADN et de protéines en % de radioactivité ajoutée de ³H-thymidine, après incubation de 90 minutes.

I.3. Conclusion.

Le fait que les cultures d'*E.coli* ne répondent nettement à la 3Hmethylthymidine qu'après une période de 3-4 jours en eau douce ou en eau de mer, indique peut être que les expériences courtes (72 heures maximum) évoquées précédemment constituent des situations stressantes et de mise en place des cultures.

Sur le plan écologique, les observations faites sur la survie de ces bactéries placées en conditions in vitro à l'abri de la lumière ou en pénombre sont importantes. Elles viennent s'ajouter aux nombreuses données sur la survie naturelle de ces bactéries dans des situations à l'abri de la lumière(interface eau-sédiment -couvert végétal aquatique- intérieur des organismes animaux), toutes conditions où la matière organique est facilement disponible et permet à ces microorganismes de se maintenir ou se développer aisément.

**II. Devenir de cellules vivantes marquées
(type E.Coli) lors de leur capture par deux
bivalves: *Venus verrucosa* et *Mytilus
galloprovincialis*.**

Le suivi de cellules bactériennes type *E.coli* lors du transit digestif chez un organisme filtreur a été exposé dans un rapport précédent (IFREMER n° 27423) . Diverses questions avaient été soulevées. Il s'averait indispensable de compléter cette étude par la réalisation d'un modèle du système "bactéries-bivalves" afin de calculer la cinétiques des échanges intercompartimentaux et les taux d'ingestion, d'assimilation et d'excrétion des bivalves ayant filtré la suspension bactérienne d'*E. coli*.

II.1. Modélisation.

La modélisation permet de représenter de façon simplifiée le fonctionnement d'un phénomène ou d'un système biologique. Dans le cas présent, l'intérêt du modèle est:

- d'établir, par une solution mathématique, la continuité entre les points obtenus lors de l'expérimentation,
- d'accéder aux compartiments non mesurables expérimentalement,
- de permettre le calcul des taux de transferts de radioactivité entre les compartiments.

II.1.1.. Description du modèle

Il convient de limiter au maximum le nombre de paramètres du système afin de rendre possible sa modélisation. On distingue:

- les paramètres constants tels que la température, la salinité, la quantité de bactéries fournie.
- les paramètres considérés comme constants tels que l'homogénéité du milieu, la vitesse de filtration des Bivalves.
- les paramètres variables tels que la concentration en radioactivité des différents compartiments et la durée d'incubation.

Le système étudié comprend 5 compartiments: Bivalves, Dissous, CO₂ (tous 3 accessibles par l'expérimentation), Bactéries, et Biodépôts (qui ne sont accessibles que par le modèle). Les échanges de radioactivité à l'intérieur du système sont représentés à la figure 9. Le compartiment Bactéries produit du CO₂, produit et consomme du Dissous. Le compartiment Bivalves consomme les Bactéries, produit du CO₂, produit et consomme du Dissous, produit et recycle les Biodépôts. Seul le compartiment CO₂ ne peut être recyclé.

La variation de la radioactivité à l'intérieur d'un compartiment correspond à la somme algébrique des gains et des pertes de ce compartiment par unité de temps. La dynamique des échanges de matière, à l'intérieur du système, est simulée par un jeu d'équations différentielles:

$$\begin{aligned}d[\text{Bact}]/dt &= -K_1[\text{Bact}] - K_8[\text{Bact}] - K_7[\text{Bact}] + K_9[\text{Dis}] \\d[\text{Biv}]/dt &= -K_5[\text{Biv}] - K_4[\text{Biv}] - K_6[\text{Biv}] + K_1[\text{Bact}] + K_3[\text{Dis}] \\&\quad + K_2[\text{Biodép}] \\d[\text{Biodép}]/dt &= -K_2[\text{Biodép}] + K_4[\text{Biv}] \\d[\text{Dis}]/dt &= -K_3[\text{Dis}] - K_9[\text{Dis}] + K_8[\text{Bact}] + K_5[\text{Biv}] \\d[\text{CO}_2]/dt &= +K_7[\text{Bact}] + K_6[\text{Biv}]\end{aligned}$$

où [X] est la radioactivité contenue dans le compartiment X au temps t, et les K_i sont les coefficients d'intégration du système:

- K₁ filtration des bactéries par les bivalves.
- K₂ filtration des biodépôts par les bivalves.
- K₃ consommation des substances dissoutes par les bivalves.
- K₄ production de biodépôts par les bivalves.
- K₅ production de dissous par les bivalves.
- K₆ production de CO₂ par les bivalves.
- K₇ production de CO₂ par les bactéries
- K₈ production de dissous par les bactéries.
- K₉ consommation de dissous par les bactéries.

Dans ce type de modèle, les coefficients d'intégration sont en général constants (Amouroux 1982, Amouroux & Amouroux 1988). Cependant, K₂, K₄ et K₆ sont des coefficients d'intégration du système qui varient fonction du temps.

K₂, le coefficient de filtration des biodépôts par les bivalves, est introduit dans le modèle sous la forme d'une fonction du temps car les

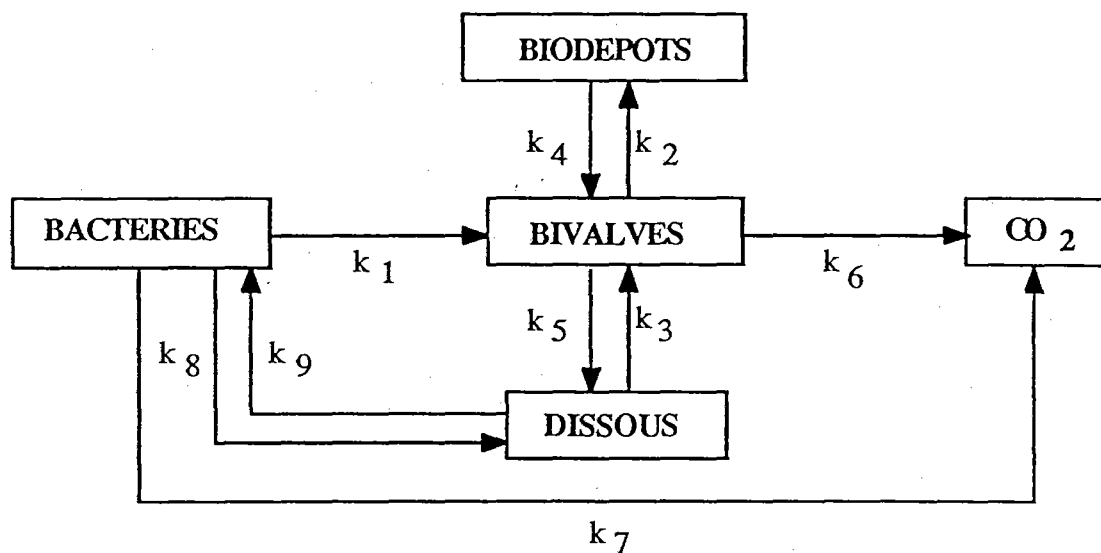


Figure 9 : Présentation des principaux processus envisagés lors de la modélisation des échanges de radioactivité dans les enceintes expérimentales.

biodépôts produits ne sont pas immédiatement disponibles pour les bivalves. Le décalage correspond au temps nécessaire à la remise en suspension des biodépôts produits .

K4 correspond au coefficient de production des biodépôts par les bivalves. Il est introduit dans le modèle sous la forme d'une fonction du temps car les biodépôts produits le sont, sous 2 formes: les pseudofèces, dès le début de la filtration, et les fèces, avec un décalage de temps correspondant à la durée du transit intestinal. La variation de K4 est destinée à rendre compte de l'apparition de ce deuxième phénomène.

K6 correspond au coefficient de production de CO₂ par les Bivalves. Il est introduit dans le modèle sous la forme d'une fonction du temps car: 1) il existe un décalage temporel nécessaire à la métabolisation, et 2) il se produit un changement de la source de nourriture au cours du temps. Le bivalve filtre d'abord des bactéries puis des biodépôts, ce qui peut engendrer des efficacités d'assimilation différentes.

La modélisation des échanges de radioactivité dans les enceintes expérimentales est réalisée sur microordinateur Macintosh SE, grâce au logiciel Stella®.

II.1.2. Résultats: *Venus verrucosa*

Les valeurs des coefficients d'intégration sont présentées au tableau annexe II. Les résultats des simulations sont présentés à la figure 10.

Dans un premier temps (de 0 à 10h), *Venus verrucosa* filtre la suspension d'*Escherichia coli*, ce qui provoque la chute de la radioactivité contenue dans le compartiment Particulaire et, l'augmentation rapide de la radioactivité contenue dans le compartiment Bivalves. *Venus verrucosa* commence ensuite à produire des biodépôts de façon intensive à partir de 10h, ce qui provoque une augmentation de la radioactivité dans le compartiment Particulaire jusqu'à 40h. Dans un troisième temps, les biodépôts sont remis progressivement en suspension, et deviennent disponibles pour les bivalves. Ces biodépôts sont mieux assimilés et la quantité de radioactivité contenue dans le compartiment CO₂ augmente de façon marquée. Ce transfert de radioactivité sous forme de CO₂ non recyclable se traduit par un amortissement des échanges entre Particulaire et Bivalves. En fait, on assiste à la succession de trois phénomènes: filtration des bactéries, biodéposition et recyclage des biodépôts.

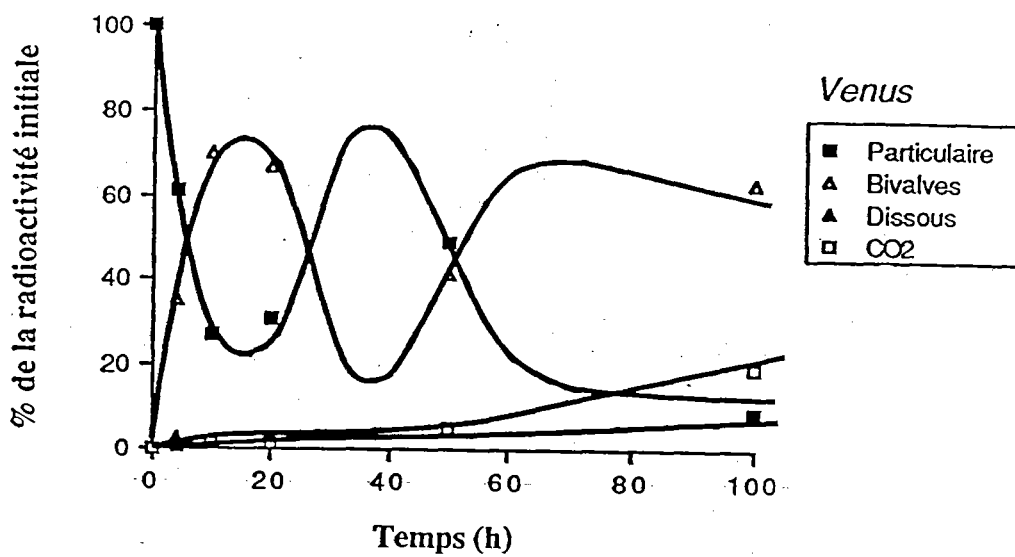


Figure 10 : Modélisation des échanges de radioactivité. Ajustement du modèle aux données expérimentales obtenues pour *Venus verrucosa*.

La modélisation permet d'accéder aux compartiments Bactéries et Biodépôts et de calculer les quantités ayant transité par le compartiment Bivalves sous forme de:

- Bactéries consommées
- Biodépôts consommés
- Dissous consommé
- Biodépôts produits
- Dissous produit
- CO₂ produit

Les quantités cumulées, correspondant à la consommation de matière organique par *Venus verrucosa*, sont présentées à la figure 11. La radioactivité consommée par les bivalves, sous forme dissoute, est pratiquement nulle (1,24 % après 100h). La radioactivité consommée sous forme de bactéries atteint pratiquement 100% après 10h. La quantité de Biodépôts consommés augmente régulièrement à partir de 40h et atteint 12% après 100h.

Les quantités cumulées, correspondant à la production de matière organique par *Venus verrucosa*, sont présentées à la figure 12. La radioactivité produite sous forme dissoute et sous forme de CO₂ est faible (7,9 et 17,4% respectivement après 100h). La radioactivité correspondant aux biodépôts produits augmente régulièrement à partir de 10h pour atteindre 624% à 100h.

Les quantités de matière consommée, ingérée et assimilée peuvent être calculées à partir des quantités cumulées (Amouroux et al. 1988, Grémare et al. 1989). La quantité consommée par les bivalves correspond à la somme des quantités consommées sous forme de bactéries, sous forme de biodépôts et sous forme dissoute. Elle est de 708% après 100h. La quantité ingérée correspond à la somme des Bactéries consommées et des Biodépôts consommés, dans le cas présent elle est équivalente à la quantité consommée, du fait, de la très faible absorption de matériel dissous.

Le taux d'assimilation correspond au rapport entre la quantité de matière assimilée et la quantité de matière consommée. La quantité de matière assimilée peut être estimée de 2 façons, on considère qu'elle est égale soit à la différence entre la quantité de matière consommée et la quantité de biodépôts produits, soit à la somme des quantités de CO₂ et de Dissous produits. La première option conduit à une surestimation du taux d'assimilation, car on considère que toute la radioactivité contenue dans

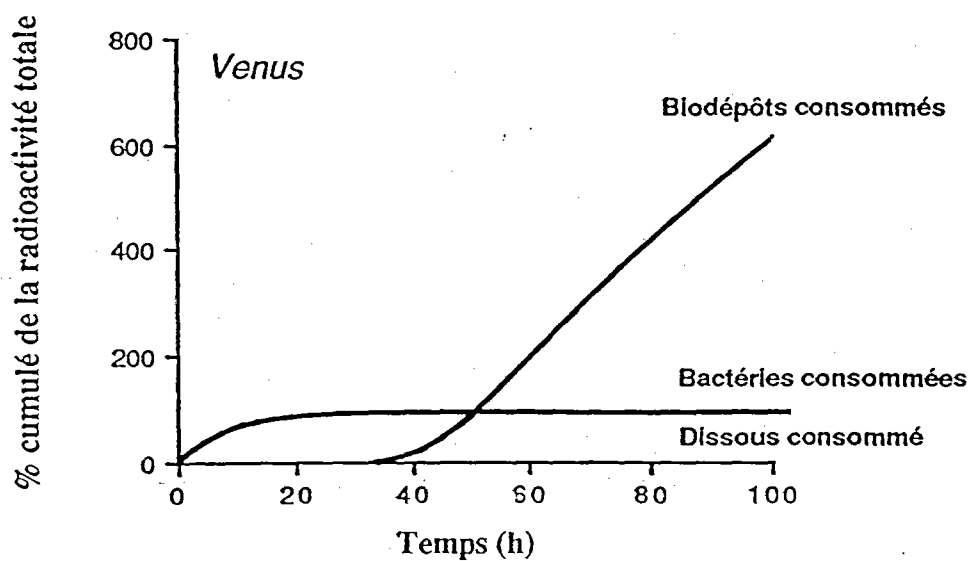


Figure 11 : Modélisation des échanges de radioactivité entre *Escherichia coli* et *Venus verrucosa*. Evolution des quantités cumulées correspondant à la consommation de radioactivité par les bivalves.

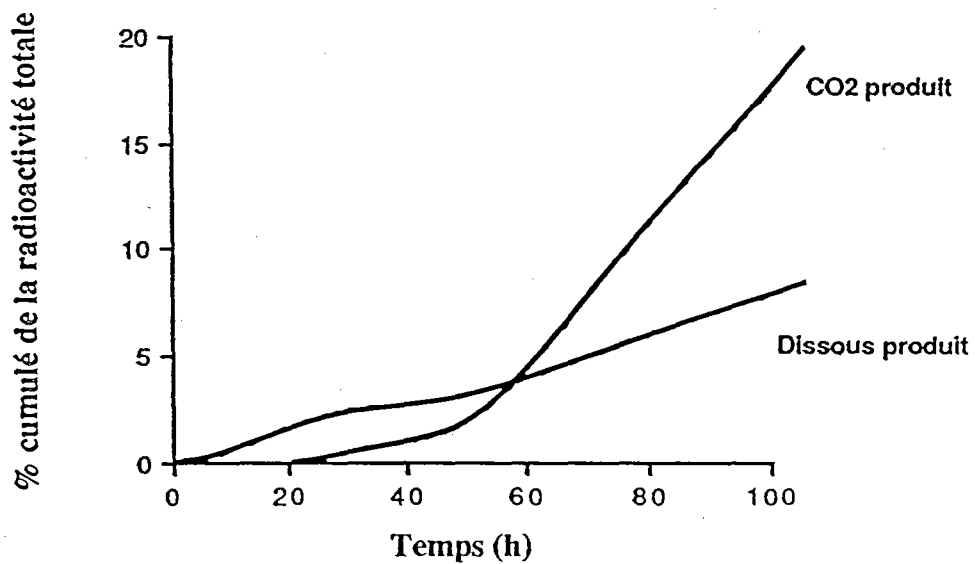
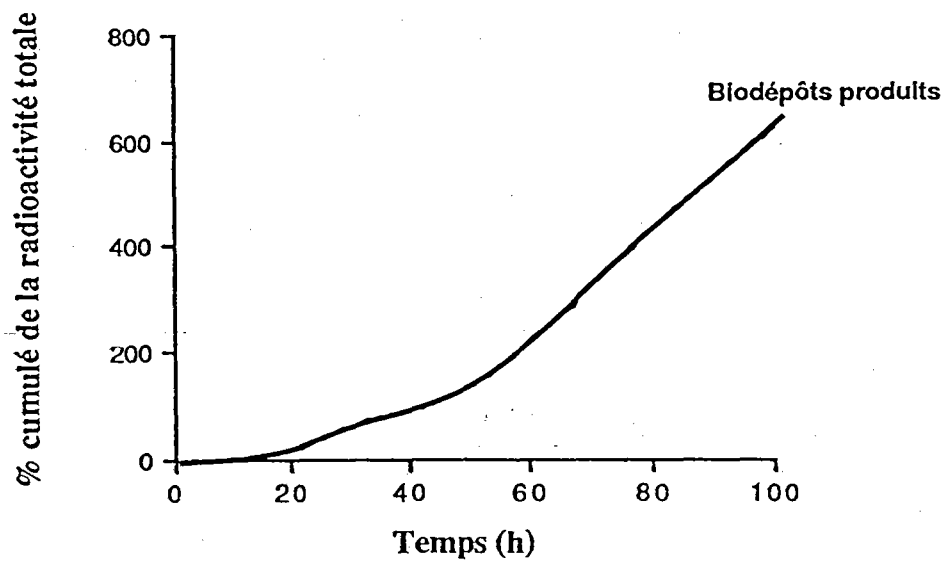


Figure12 : Modélisation des échanges de radioactivité entre *Escherichia coli* et *Venus verrucosa*. Evolution des quantités cumulées correspondant à la production de radioactivité par les bivalves.

les bivalves est assimilée. Au contraire la seconde option sous-estime le taux d'assimilation, car on considère que la radioactivité contenue dans les bivalves n'est pas assimilée. Il est possible de calculer le taux d'assimilation à chaque instant. Ces deux estimations du taux d'assimilation convergent quand la durée d'incubation augmente (fig. 13). Après 100h, les estimations sont de 12 et de 3,5%. Le coefficient d'assimilation réel est compris entre ces deux valeurs.

II.1.3. Résultats: *Mytilus galloprovincialis*

Les valeurs des coefficients d'intégration sont présentées au tableau annexe III. Les résultats des simulations sont présentés à la figure 14.

Comme dans le cas de *Venus verrucosa*, on observe la succession de trois phénomènes: la filtration de la suspension bactérienne, la biodéposition, et le recyclage des biodépôts produits. Cependant, ces phénomènes se produisent plus rapidement. La filtration est terminée en 4h, la biodéposition commence à 4h, le recyclage des biodépôts débute vers 10h.

Les quantités cumulées, correspondant à la consommation de matière organique par *Mytilus galloprovincialis*, sont présentées à la figure 15. La radioactivité consommée sous forme dissoute est pratiquement nulle (0,6 % après 100h). La radioactivité consommée sous forme de bactéries atteint pratiquement 100% après 4h. La quantité de Biodépôts consommés augmente régulièrement à partir de 20h et atteint 532% après 100h.

Les quantités cumulées, correspondant à la production de matière organique par *Mytilus galloprovincialis*, sont présentées à la figure 16. Les radioactivités produites sous forme dissoute et sous forme de CO₂ sont faibles (7,5 et 33,7% respectivement après 100h). La radioactivité correspondant aux biodépôts produits augmente régulièrement à partir de 4h pour atteindre 533% à 100h.

La consommation totale est de 608% après 100h. Les deux estimations du taux d'assimilation convergent quand la durée d'incubation augmente (fig.17). Après 100h, les estimations sont de 12,4 et de 6,8%. Le coefficient d'assimilation réel est compris entre ces deux valeurs.

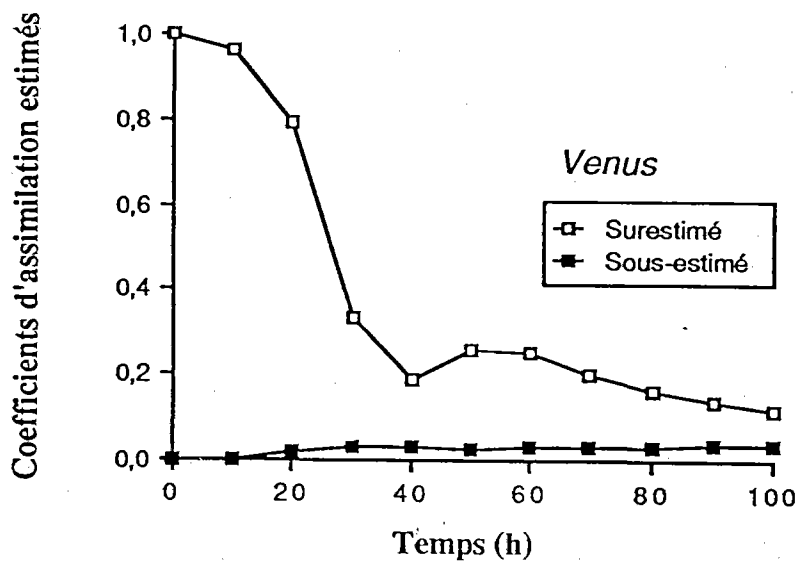


Figure 13: Modélisation des échanges de radioactivité. Evolution des deux estimations du coefficient d'assimilation de *Escherichia coli* par *Venus verrucosa*. Les deux estimations convergent vers la valeur réelle du coefficient d'assimilation (cf texte). Cette courbe montre la nécessité d'incuber pendant de longues périodes de temps afin d'accéder à une valeur exacte du coefficient d'assimilation.

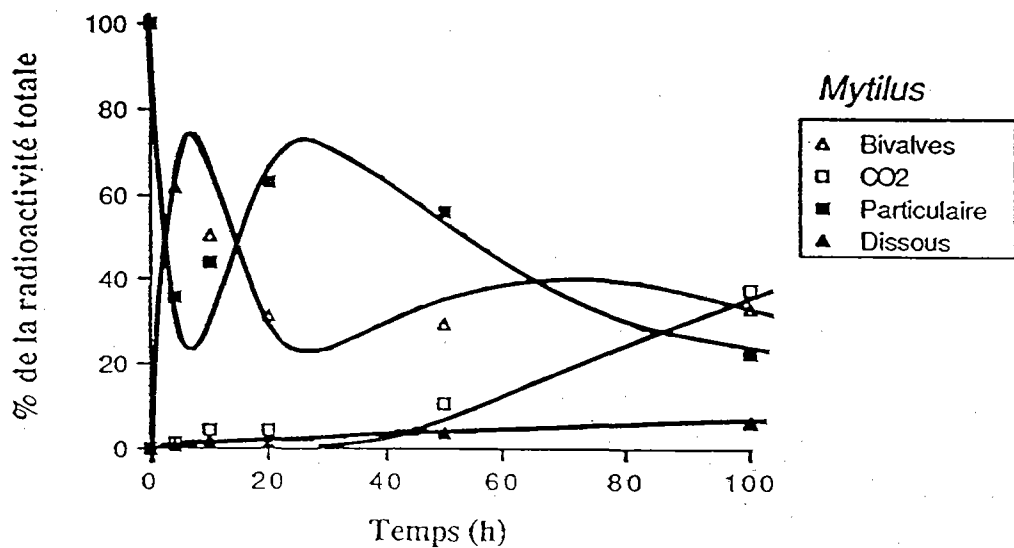


Figure 14 : Modélisation des échanges de radioactivité. Ajustement du modèle aux données expérimentales obtenues pour *Mytilus galloprovincialis*.

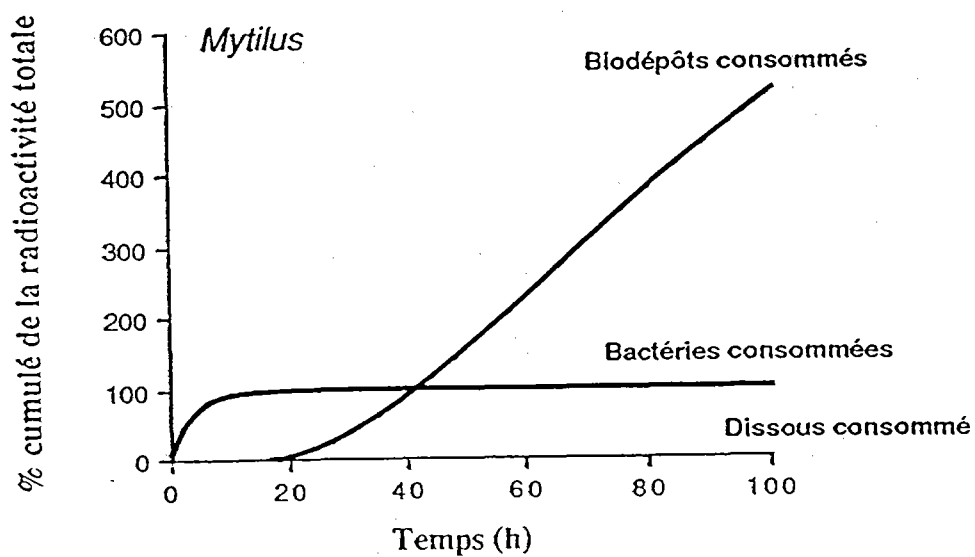


Figure 15 : Modélisation des échanges de radioactivité entre *Escherichia coli* et *Mytilus galloprovincialis*. Evolution des quantités cumulées correspondant à la consommation de radioactivité par les bivalves.

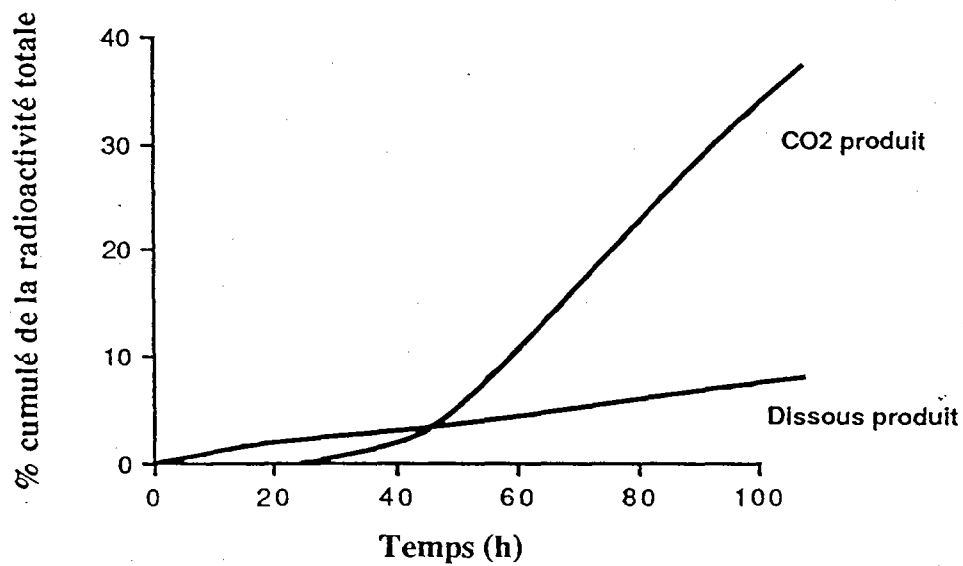
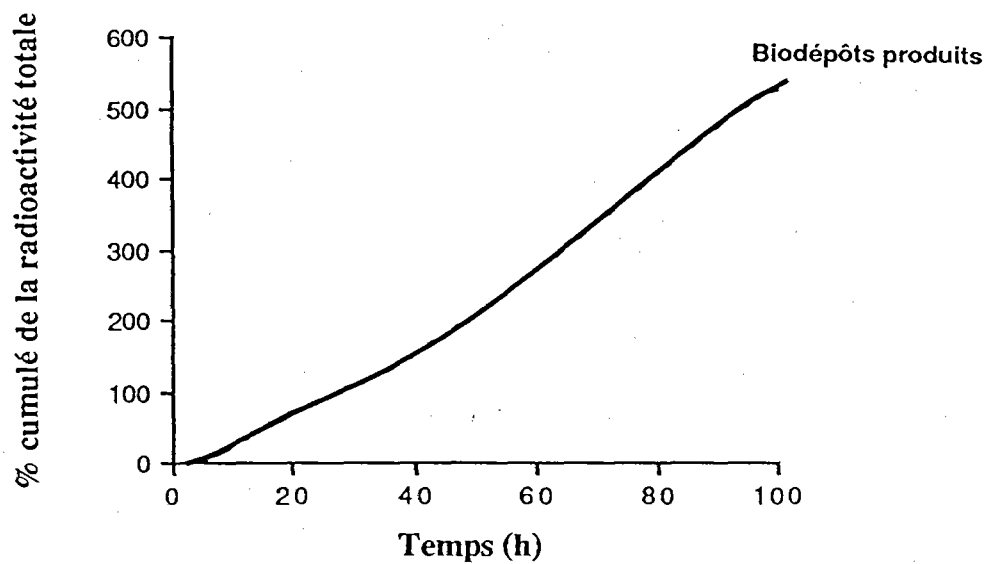


Figure 16 : Modélisation des échanges de radioactivité entre *Escherichia coli* et *Mytilus galloprovincialis*. Evolution des quantités cumulées correspondant à la production de radioactivité par les bivalves.

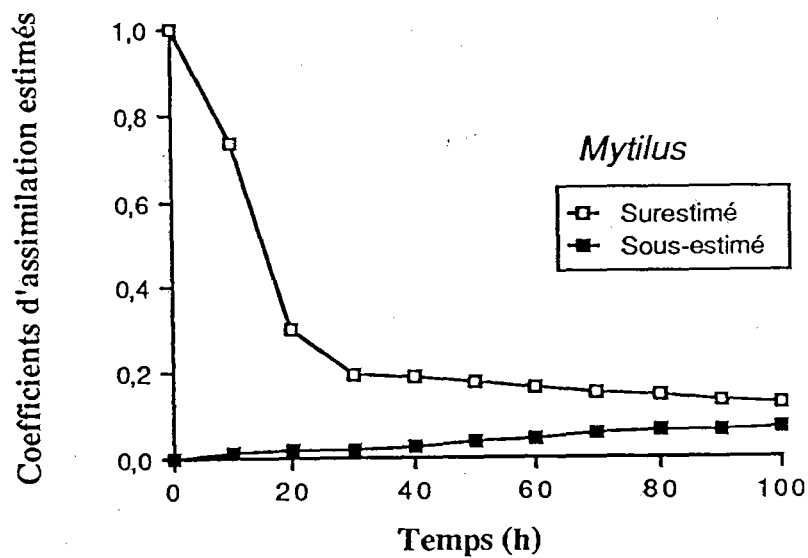


Figure 17 : Modélisation des échanges de radioactivité. Evolution des deux estimations du coefficient d'assimilation de *Escherichia coli* par *Mytilus galloprovincialis*. Les deux estimations convergent vers la valeur réelle du coefficient d'assimilation (cf texte). Cette courbe montre la nécessité d'incuber pendant de longues périodes de temps afin d'accéder à une valeur exacte du coefficient d'assimilation.

II.2. Deuxième série d'expériences: influence du transit digestif sur *E.coli* .

Les résultats de la première série d'expériences ont montré que *E.coli* est filtrée de façon efficace par *Venus verrucosa* et par *Mytilus galloprovincialis*. Cependant dans les deux cas les taux d'assimilation estimés sont faibles. Cette deuxième série d'expériences vise à déterminer si les bactéries ayant transité par le tube digestif des bivalves sont encore viables.

II.2.1. Mode opératoire

5 bivalves sont placés dans les mêmes conditions que lors de la première série d'expériences, mais dans ce cas les bactéries introduites ne sont pas radioactives. Les premières fécès produites sont prélevées délicatement, l'eau résiduelle est retirée, et les fécès sont mises en suspension dans 9ml d'eau distillée stérile. Une gamme de dilution de cette nouvelle suspension est effectuée afin de réaliser une numération des *E.coli* viables.

Le nombre de bactéries marines présentes dans l'eau de mer filtrée sur 5 μ m est de l'ordre de 10^2 à 10^3 /ml. Ces bactéries ainsi que celles qui sont commensales des bivalves se développent lentement (il faut 2 à 3 jours pour pouvoir compter le nombre de colonies auxquelles elles ont donné naissance). Les comptages effectués sur gélose après 24h d'incubation à 40°C et à l'obscurité sont donc bien spécifiques de *Escherichia coli*.

II.2.2. Résultats

II.2.2.1. *Venus verrucosa*

L'étalement sur gélose indique une concentration de $26,8 \cdot 10^6$ bactéries/ml pour la suspension bactérienne à T_0 . A T_1 , les 2 échantillons contiennent 64 à $69 \cdot 10^8$ bactéries viables.

Les *Escherichia coli* ne sont donc pas toutes rendues inactives par un passage dans le tube digestif de *Venus verrucosa*. Cet organisme semble donc, dans un premier temps au moins, uniquement faciliter la sédimentation de *Escherichia coli* par le phénomène de biodéposition.

II.2.2.2. *Mytilus galloprovincialis*

L'étalement sur gélose indique une concentration bactérienne de $25,5 \cdot 10^6$ bactéries/ml de suspension bactérienne à T_0 . A T_1 , les 2 échantillons contiennent 21 à $40 \cdot 10^8$ bactéries viables.

Comme pour *Venus verrucosa*, Les bactéries ne sont pas toutes rendues inactives par un passage dans le tube digestif de *Mytilus galloprovincialis*. Dans un premier temps, cet organisme facilite uniquement la sédimentation de *Escherichia coli*.

II.3. Troisième série d'expériences: décontamination des bivalves

La troisième série d'expériences consiste à déterminer la cinétique de décontamination des bivalves ayant ingéré des *Escherichia coli* radioactives.

II.3.1. Mode opératoire

15 bivalves sont placés dans les mêmes conditions que lors de la première série d'expériences. La durée de l'incubation est déterminée par le maximum de radioactivité incorporée par les bivalves lors de l'expérience 1, soit 10h. Les bivalves sont ensuite transférés dans un aquarium en circuit ouvert. Ils sont disséqués, par lots de 3, à différents intervalles de temps: T_0 instant où ils sont transférés en milieu froid, T_0+24h , T_0+48h , T_0+72h et T_0+120h . Les différentes parties du bivalve sont traitées comme lors de la première série d'expérience.

II.3.2. Résultats

II.3.2.1. *Venus verrucosa*

Les résultats sont présentés à la figure 18. La variation de la radioactivité contenue dans les praires *in toto* est significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,02 < p < 0,05$). Après 120h, les praires ont perdu 75% de la radioactivité qu'elles contenaient à To.

L'analyse de la décontamination organe par organe au cours du temps est présentée à la figure 19.

La radioactivité contenue dans la Branchie n'évolue pas de façon significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,3 < p < 0,5$).

La radioactivité du manteau semble diminuer pour ne plus représenter que 20% de la radioactivité contenue dans le bivalve à 120h. Cette évolution n'est cependant pas statistiquement significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,2 < p < 0,3$). Ceci s'explique par la forte variabilité rencontrée lors de la mesure de la radioactivité contenue dans cet organe à To. Plus généralement, le fait de ne travailler que sur 3 animaux, rend tributaire de la variabilité individuelle lors du processus de filtration.

La radioactivité contenue dans le pied semble rester constante 79% après 120h (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,95 < p < 0,98$).

La plus grande partie de la radioactivité se trouve dans la masse viscérale. L'évolution de la radioactivité contenue dans cet organe est significative au cours du temps (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,02 < p < 0,05$). Après 120h, la masse viscérale ne contient plus que 19% de la radioactivité qu'elle contenait à To.

L'évolution de la radioactivité contenue dans le muscle semble indiquer une diminution (53% après 120h), cependant la variabilité rencontrée dans les mesures rend cette diminution non significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,5 < p < 0,7$).

L'évolution de la radioactivité du Résiduel, bien que laissant supposer une perte de radioactivité au cours du temps (25% après 120h), n'est pas statistiquement significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,1 < p < 0,2$). Les difficultés rencontrées lors de certaines dissection peuvent expliquer les variations observées pour cet organe.

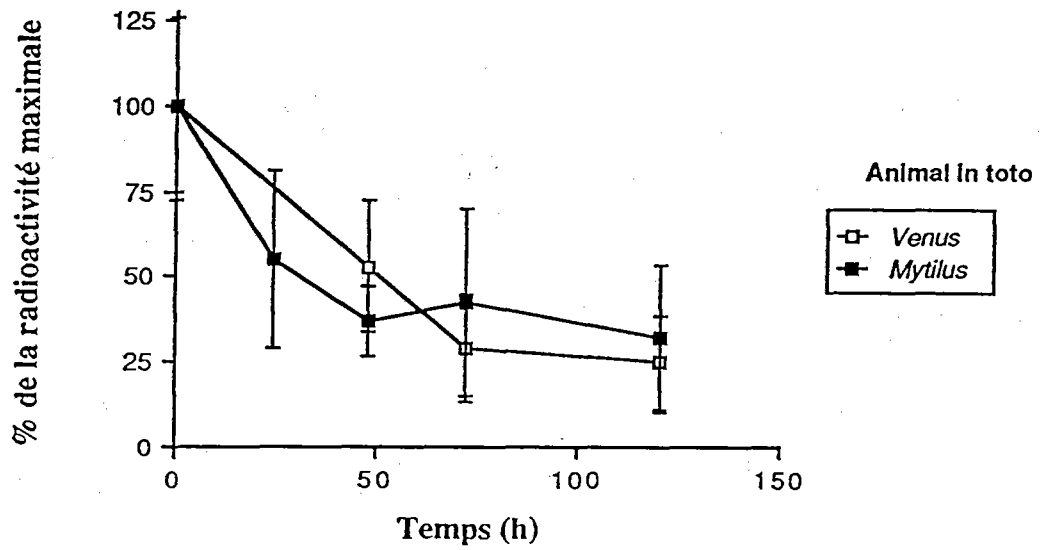
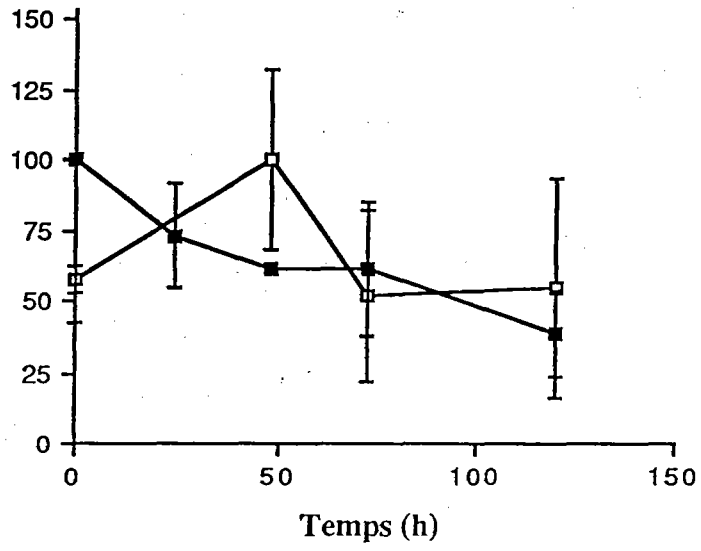


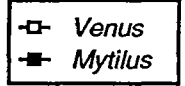
Figure 18 : Décontamination de *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis*. Evolution de la radioactivité contenue dans les bivalves *in toto*. Les barres verticales correspondent aux écart-types des mesures expérimentales.

Figure 19): Décontamination de *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis*. Evolution de la radioactivité contenue dans les différents organes. Les barres verticales correspondent aux écart-types des mesures expérimentales.

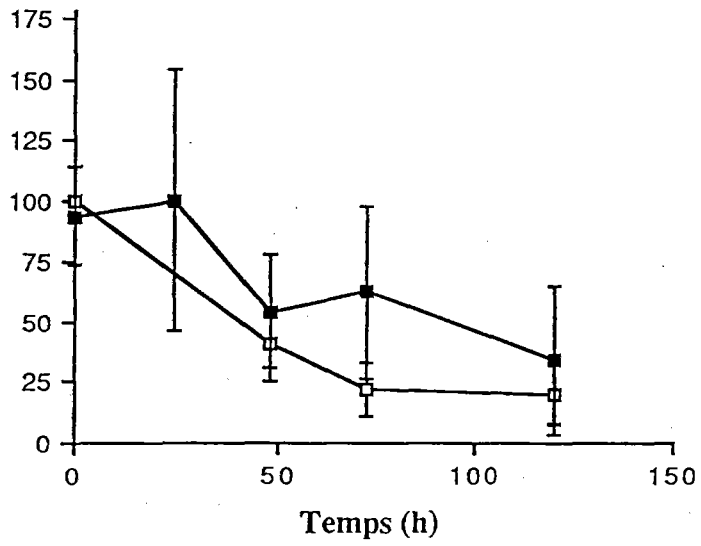
% de la radioactivité maximale de l'organe



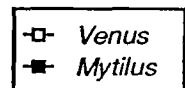
Branchies



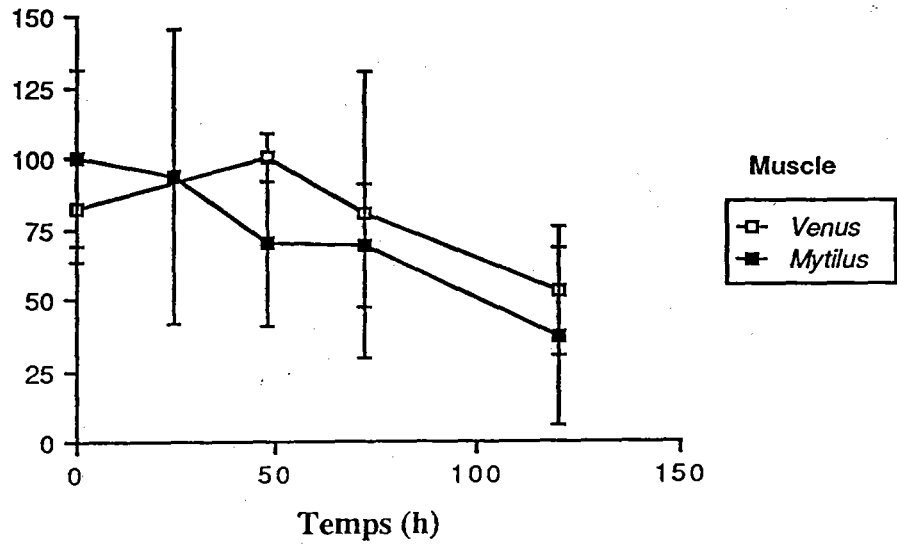
% de la radioactivité maximale dans l'organe



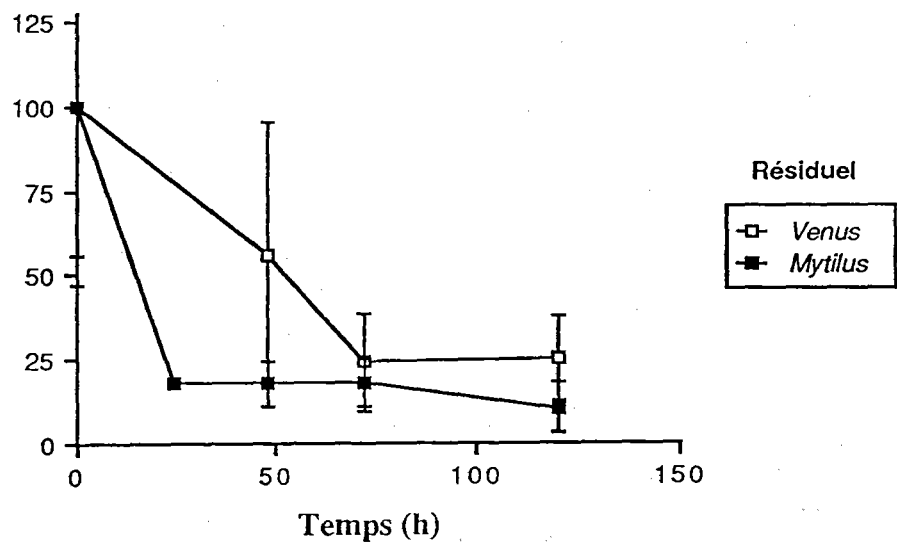
Manteau



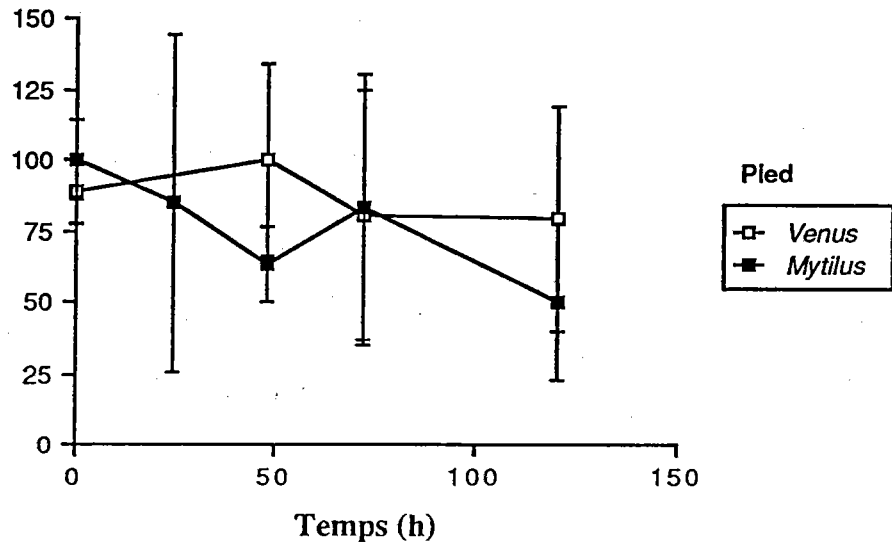
% de la radioactivité maximale dans l'organe



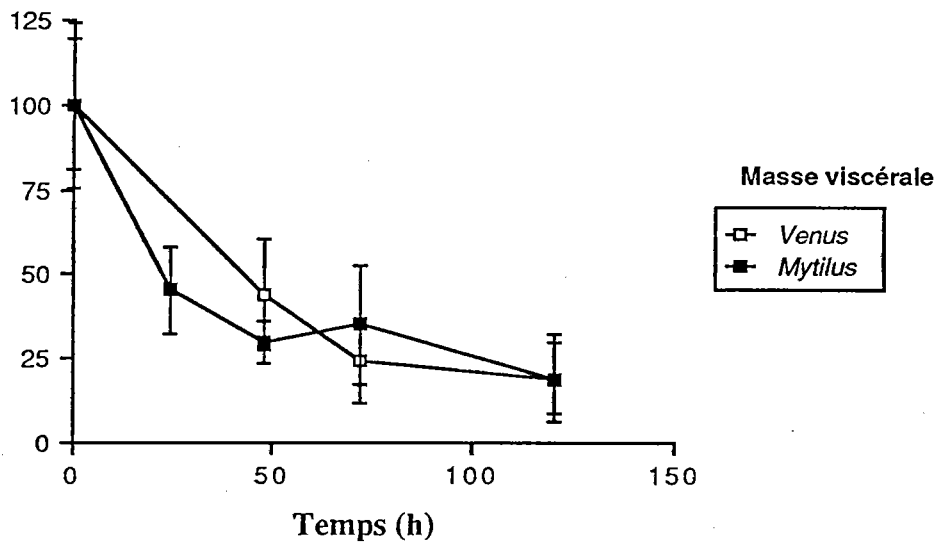
% de la radioactivité maximale dans l'organe



% de la radioactivité maximale dans l'organe



% de la radioactivité maximale dans l'organe



II.3.2.2. *Mytilus galloprovincialis*

Les résultats sont présentés à la figure 18. La variation de la radioactivité contenue dans les moules est significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,02 < p < 0,05$). Après 120h, les moules ont perdu 70% de la radioactivité qu'elles contenaient à To.

L'analyse de la décontamination organe par organe au cours du temps est présentée à la figure 19.

La radioactivité contenue dans la Branchie n'évolue pas de façon significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,2 < p < 0,3$).

La radioactivité du manteau semble diminuer pour ne plus représenter que 34,2% à 120h. Cependant, l'évolution de la décontamination du manteau n'est pas statistiquement significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,2 < p < 0,3$), ceci s'explique de la même manière que pour la praire.

La radioactivité contenue dans le Pied n'évolue pas de façon significative (50,3% après 120h, ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,5 < p < 0,7$).

La plus grande partie de la radioactivité se trouve dans la Masse viscérale et évolue de façon significative au cours du temps (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,02 < p < 0,05$). Après 120h, la Masse viscérale ne contient plus que 19,2% de la radioactivité qu'elle contenait à To.

L'évolution de la radioactivité contenue dans le Muscle semble indiquer une diminution (53% après 120h), cependant la variabilité rencontrée dans les mesures rend cette diminution, statistiquement non significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,5 < p < 0,7$).

Le Résiduel (10,6% après 120h), présente une évolution statistiquement significative (ANOVA de Kruskal-Wallis; $0,02 < p < 0,05$).

II.4. Discussion.

Les vitesses de filtration de *Escherichia coli* par *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis* sont différentes. *Mytilus galloprovincialis* filtre les bactéries de façon plus efficace. La suspension est filtrée en moins de 4h contre 10h pour *Venus verrucosa*. Au niveau du modèle, cette différence se traduit par la valeur du coefficient de filtration: $0,25 \text{ h}^{-1}$ pour *Mytilus galloprovincialis* contre $0,125 \text{ h}^{-1}$ pour *Venus verrucosa*. Cette différence confirme l'observation faite par Bernard (1989). Cet auteur a comparé les vitesses de filtration d'*Escherichia coli* par 4 bivalves: *Mytilus edulis*, *Crassostrea gigas*, *Protothaca staminea* et *Mya arenaria*. Il a démontré que *Mytilus edulis* présentait la meilleure efficacité de filtration de *Escherichia coli*.

Après remise en suspension, les biodépôts produits par *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis* sont recyclés. Ce recyclage est plus important dans le cas de *Venus verrucosa* (figure 20) que dans le cas de *Mytilus galloprovincialis* (figure 21) (valeur maximale du coefficient de filtration des biodépôts: $0,745 \text{ h}^{-1}$ pour *Venus verrucosa*, $0,245 \text{ h}^{-1}$ pour *Mytilus galloprovincialis*). Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène: 1) *Venus verrucosa* produit des biodépôts moins compacts que ceux de *Mytilus galloprovincialis*. Ces biodépôts sont aisément remis en suspension et par conséquent facilement consommables, 2) les biodépôts remis en suspension sont constitués d'amas de particules dont la taille globale est supérieure à celle des *Escherichia coli* libres. L'efficacité de filtration de ces plus grosses particules serait supérieure pour *Venus verrucosa*.

Les biodépôts recyclés sont mieux assimilés que les bactéries libres. Après le recyclage, on observe une augmentation de la quantité de radioactivité du compartiment CO_2 (respectivement 37% et 20% de la radioactivité totale, à 50h, pour *Mytilus galloprovincialis* et *Venus verrucosa*). La fourchette de l'estimation du coefficient d'assimilation de *Escherichia coli* par *Venus verrucosa* est de 0,04 à 0,12; et de 0,08 à 0,12 pour *Mytilus galloprovincialis*. Les valeurs supérieures sont identiques pour les deux bivalves. Ceci est dû au fait: 1) que la quantité de radioactivité présente dans le corps de

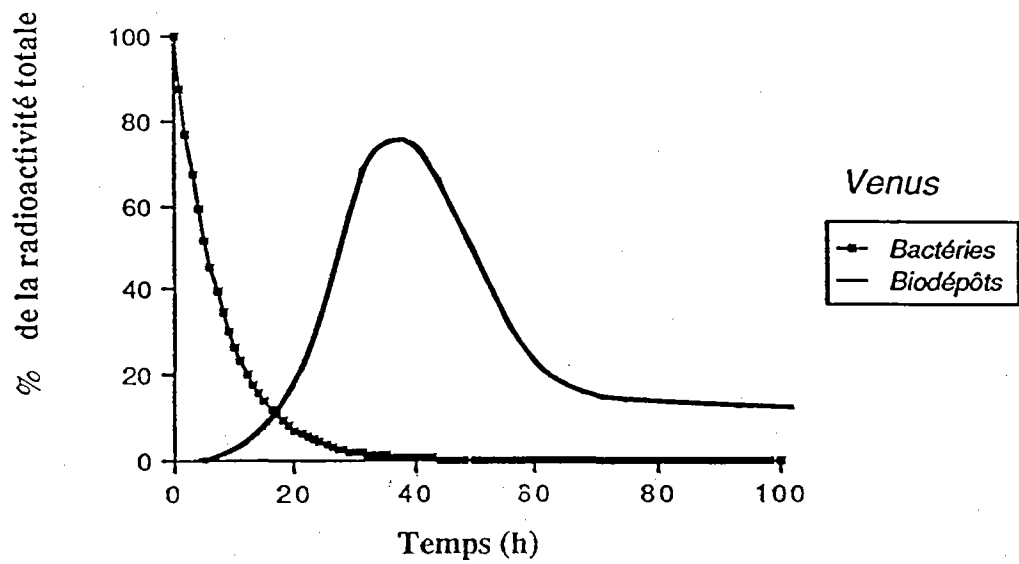


Figure 20 : Modélisation des échanges de radioactivité entre *Escherichia coli* et *Venus verrucosa*. Evolution de la radioactivité dans les compartiments non mesurables expérimentalement.

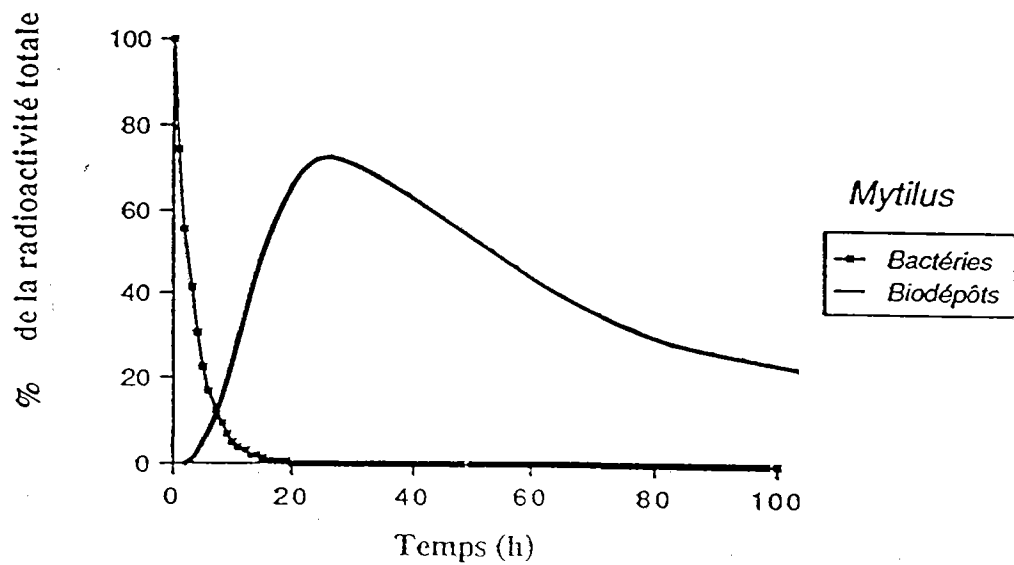


Figure 21 : Modélisation des échanges de radioactivité entre *Escherichia coli* et *Mytilus galloprovincialis*. Evolution de la radioactivité dans les compartiments non mesurables expérimentalement.

Venus verrucosa à 100h est supérieure à celle de *Mytilus galloprovincialis*, et 2) que cette radioactivité est considérée comme entièrement assimilée. Les valeurs inférieures de la fourchette sont supérieures d'un facteur 2 pour *Mytilus galloprovincialis*. Elles sont plus en accord avec les quantités de CO₂ produites par les 2 bivalves. Quelque soit l'estimation considérée, le coefficient d'assimilation d'*Escherichia coli* reste faible. Ceci est en accord: 1) avec le fait que la plus grande partie de la radioactivité contenue dans les bivalves, se trouve dans la masse viscérale, et 2) avec les résultats de la deuxième série d'expériences montrant que les biodépôts produits par les bivalves contenaient de nombreuses entérobactéries viables. Par contre ces faibles valeurs de coefficient d'assimilation sont en légère contradiction avec les résultats de la troisième série d'expériences. Après 120h, les bivalves contenaient encore 20% de leur radioactivité initiale. Lorsque la nourriture est rare, les bivalves filtreurs ont la faculté de retenir la matière particulaire ingérée (Hildreth 1980, Foster-Smith 1975). L'aquarium de décontamination en circuit ouvert apportait une eau de mer déjà décantée; les ressources de nourriture particulaire des bivalves étaient alors limitées. *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis* ont donc probablement conservé, par rétention, la matière particulaire ingérée lors de la phase de nutrition.

II.5. Conclusion.

L'objectif de cette étude était d'évaluer:

- l'aptitude de deux bivalves (la praire, *Venus verrucosa* et la moule, *Mytilus galloprovincialis*) à épurer une eau de mer contenant *Escherichia coli*.
- le gain énergétique découlant de l'ingestion de *Escherichia coli* par ces deux bivalves.

Les résultats ont montré que *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis* filtrent efficacement *Escherichia coli*. Cependant, aucun de ces deux bivalves n'est capable de les assimiler efficacement. Les biodépôts produits contiennent un grand nombre de bactéries viables qui sont facilement remises en suspension. Dans le milieu naturel, *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis* ne sont donc probablement pas de bons agents épurateurs pour les eaux domestiques chargées en *Escherichia coli*. Les faibles coefficients d'assimilation observés suggèrent que le gain énergétique découlant de l'ingestion d'*Escherichia coli* par ces deux bivalves est quasiment nul.

L'homogénéité des résultats obtenus pour *Venus verrucosa* et *Mytilus galloprovincialis* permet de supposer que d'autres bivalves filtreurs auraient une action identique. Il serait par contre intéressant d'adjoindre au système un nouveau maillon trophique constitué par des dépositivores. Ces organismes présentent en effet des taux d'assimilation très élevés et ont une aptitude particulière à utiliser la matière organique réfractaire (Lopez et Levinton 1987). Ils pourraient collecter et digérer les biodépôts produits par les filtreurs et ainsi contribuer à augmenter l'efficacité d'épuration.

REFERENCES CITEES

AMOUREUX, J.M. 1982. Ethologie, Nutrition, Bilan énergétique de *Venus verrucosa* Linné (Bivalves). Thèse de Doctorat d'état. Univ. Pierre et Marie Curie. 185 pages.

AMOUREUX, J.M. et J. AMOUREUX . 1988. Comparative study of the carbon cycle in *Venus verrucosa* fed on bacteria and phytoplankton: III comparison of the models. **Marine Biology**, 97:339-347.

AMOUREUX, J.M., J. AMOUREUX et A. GREMARE. 1988. Nutrition of a deposit feeder: comparative study of *Abra alba* (Mollusca, Bivalvia) fed on three species of diatoms. Calculation of the consumption and assimilation by modelisation. **Mar. Ecol. Prog.Ser.** 51: 87-97.

BARCINA, I., J.M. GONZALEZ, J. IRRIBERRI et L. EGEEA. 1990. Survival strategy of *E.coli* and *Enterococcus faecalis* in illuminated fresh and marine systems. **J.Appl.Bact.** 68 : 189-198.

BERNARD, F.R. 1989. Uptake of coliform bacteria by four marine bivalve molluscs. **Can.J.Fish.Aquat.Sci.** 46 : 1592-1599.

FOSTER-SMITH, R.L. 1975. The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofecal production for *Mytilus edulis* (L.), *Cerastoderma edule* (L) and *Venerupis pullestra* (Montagu). **J.Exp.Mar.Biol.Ecol.** 17 : 1-22.

HILDRETH, D.I. 1980. The passage of two species of microalgae through the gut of *Mytilus edulis* (L.). **J.Exp.Mar.Biol.Ecol.** 48 : 17-22.

LOPEZ, G.R. et J.S. LEVINTON. 1987. Ecology of deposit-feeding animals in marine sediments. **Quart.Rev.Biol.** 62 : 235-260.

MORIARTY, D.J.W. 1986. Measurement of bacterial growth rates in aquatic systems from rates of nucleic acid synthesis. **Adv.Microb.Ecol.** 9 : 245-292.

GREMARE A., J.M. AMOUROUX et J.AMOUROUX. ,1989. Modelling of consumption and assimilation in *Eupolymnia nebulosa* (Annelida, Polychaeta). **Mar. Ecol. Prog. Ser.** 54: 239-248.

ROBARTS, R.D. , WICKS, R.J. et L.M. SEPHTON. 1986. Spatial and temporal variations in bacterial macromolecule labeling with (methyl-3H) thymidine in a hypertrophic lake. **Appl.Environ.Microbiol.** 52 : 1363-1368.

14C-leucine eau-douce	Exp.lumière total incorp.%	Exp.lux macro molécules %	14C-leucine eau de mer	Exp. lumière total incorp.%	Exp.lux macro molécules %
T0	1,02	0,37		0,37	0
T24	0	0		0	0
T48	0	0		0	0
T72	0	0		0	0
14C-leucine eau-douce	Exp.obscurité total incorp.%	Exp.obs.macro molécules %	14C-leucine eau de mer	Exp. obscurité total incorp.%	Exp.obs.macro molécules %
T0	1,75	0,75		0,75	0
T24	0	0		0	0
T48	0	0		0	0
T72	0	0		0	0
3H-leucine eau douce	Exp.lumière total incorp.%	Exp.lux macro molécules%	3H-leucine eau de mer	Exp. lumière total incorp.%	Exp.lux macro molécules %
T0	2,09	1,41		0	0
T24	0	0		0	0
T48	0	0		0	0
T72	0	0		0	0
3H-leucine eau douce	Exp.obscurité total incorp.%	Exp.obs.macro molécules%	3H-leucine eau de mer	Exp.obscurité total incorp.%	Exp.obs.macro molécules %
T0	2,73	1,18		1,13	0,24
T24	0,82	0,2		0	0
T48	0	0		0	0
T72	0	0		0	0

Tableau annexe I Incorporation de la leucine marquée (14C ou 3H, en % dpm du total ajouté) en eau douce et en eau de mer, en lumière et à l'obscurité.

Tableau II: Modélisation des échanges de radioactivité entre *Escherichia coli* et *Venus verrucosa*. Valeur des coefficients d'intégration.

Escherichia Venus verrucosa

K1	0,1250
K3	0,0035
K5	0,0015
K7	0,0050
K8	0,0005
K9	0,0003

Temps	K2
0	0,0000
10	0,0000
20	0,0000
30	0,0000
40	0,0500
50	0,1850
60	0,5050
70	0,7450
80	0,7450
90	0,7450
100	0,7450

Temps	K4
0	0,0000
10	0,0100
20	0,0350
30	0,1550
40	0,1550
50	0,1550
60	0,1550
70	0,1550
80	0,1550
90	0,1550
100	0,1550

Temps	K6
0	0,0000
10	0,0000
20	0,0000
30	0,0025
40	0,0025
50	0,0040
60	0,0050
70	0,0050
80	0,0050
90	0,0050
100	0,0050

Tableau III: Modélisation des échanges de radioactivité entre *Escherichia coli* et *Mytilus galloprovincialis*. Valeur des coefficients d'intégration.

Escherichia coli-Mytilus galloprovincialis

K1	0,2500
K3	0,0015
K5	0,0020
K7	0,0050
K8	0,0005
K9	0,0003

Temps	K2
0	0,0000
10	0,0000
20	0,0250
30	0,0650
40	0,0950
50	0,1300
60	0,1700
70	0,2050
80	0,2450
90	0,2450
100	0,2450

Temps	K4
0	0,0000
10	0,0800
20	0,1300
30	0,1700
40	0,1700
50	0,1700
60	0,1700
70	0,1700
80	0,1700
90	0,1700
100	0,1700

Temps	K6
0	0,0000
10	0,0000
20	0,0000
30	0,0050
40	0,0050
50	0,0150
60	0,0150
70	0,0150
80	0,0150
90	0,0150
100	0,0150