



Étude préliminaire de communautés bactériennes hétérotrophes associées à des invertébrés des sources hydrothermales profondes

Bactéries hétérotrophes
Invertébrés
Alvinella pompejana
Bathymodiolus thermophilus
Sources hydrothermales

Heterotrophic bacteria
Invertebrates
Alvinella pompejana
Bathymodiolus thermophilus
Hydrothermal vents

Daniel PRIEUR

Laboratoire de Zoologie, Faculté des Sciences, Université de Bretagne Occidentale, avenue Le Gorgeu, 29287 Brest Cedex, France.

RÉSUMÉ

Au cours de la campagne *Biocyarise 1984*, des échantillons de *Alvinella pompejana* et de *Bathymodiolus thermophilus* ont été prélevés sur le site du 13° N (ride du Pacifique oriental), par le submersible Cyana, en vue de tenter la culture de bactéries associées à ces invertébrés. Soixante treize souches de bactéries hétérotrophes ont été isolées de divers fragments de ces invertébrés, et étudiées. Toutes les souches sont des bacilles Gram négatif, en majorité mobiles. La collection étudiée est caractérisée par l'absence de métabolisme fermentatif, le très faible pourcentage de souches protéolytiques ou amylolytiques, et le grand nombre de souches produisant de l'H₂S à partir de la cystéine. Les souches isolées de l'épiderme d'*Alvinella* montrent la plus grande affinité vis-à-vis des sucres et acides aminés. Les tolérances thermiques de ces bactéries sont en accord avec les températures des habitats des deux invertébrés étudiés, en particulier pour des souches isolées de l'épiderme d'*Alvinella* qui peuvent se développer à 50° C.

Le rôle possible de ces bactéries hétérotrophes dans l'écosystème hydrothermal est discuté.

Oceanol. Acta, 1988. Actes du Colloque Hydrothermalisme, Biologie et Écologie, Paris 4-7 novembre 1985, 139-145.

ABSTRACT

Preliminary study of heterotrophic bacterial communities associated with invertebrates of hydrothermal vents.

During the *Biocyarise 1984* cruise, individuals of *Alvinella pompejana* and *Bathymodiolus thermophilus* were sampled by the submersible Cyana, on the 13° N site (East Pacific Rise), invertebrates. Seventy-three heterotrophic bacterial strains were isolated from different parts of the invertebrates. All the strains are Gram negative rods, most of them being motile. The collection of strains is characterized by a lack of fermentative metabolism, low percentages of proteolytic and amylolytic strains, and a high percentage of bacteria producing H₂S from cysteine. The bacteria isolated from *Alvinella* epidermis showed the highest index of carbohydrate and amino-acid utilization as sole carbon source. The thermal tolerance of these bacteria is well correlated to the temperatures of the biotopes of these invertebrates. In particular, several strains isolated from the epidermis of *Alvinella* were able to grow at 50° C. The possible role of these heterotrophic bacteria in the hydrothermal ecosystem is discussed.

Oceanol. Acta, 1988. Hydrothermalism, Biology and Ecology Symposium, Paris, 4-7 November 1985, Proceedings, 139-145.

INTRODUCTION

Parmi les conditions nécessaires au développement des communautés animales des milieux abyssaux, la quantité de nourriture disponible est considérée comme l'une des conditions primordiales (Dayton, Hessler, 1972). Dans ces écosystèmes, l'essentiel des ressources trophiques est constitué par les apports de matériel particulaire provenant de la zone euphotique, et les densités et biomasses observées sont faibles (Grassle, 1977).

Aussi, pour expliquer la luxuriance des communautés animales rencontrées au voisinage des sites hydrothermaux actifs sur la ride du Pacifique oriental, Lonsdale (1977) avait avancé l'hypothèse d'un afflux de matériel particulaire sous l'influence de courants latéraux de fond. L'ingestion d'un tel matériel a été effectivement démontrée chez *Bathymodiolus thermophilus* (Le Pennec, Prieur, 1984). Cependant, à partir de l'analyse des isotopes stables du carbone, Williams *et al.* (1981) ont estimé que le carbone organique particulaire résultant de la photosynthèse ne représentait au plus que 25 % des besoins de ce bivalve. L'autre hypothèse avancée par Lonsdale (1977) est celle d'une intense chimiosynthèse bactérienne locale. Les premières estimations d'abondance et de biomasse bactérienne (Corliss *et al.*, 1979) ont fait état de 10^8 à 10^9 cellules / ml, soit de 0,1 à 1 g de matière organique bactérienne par litre d'eau de mer. Cependant les estimations ultérieures de Jannash et Wirsen (1979) se sont révélées inférieures ($5 \cdot 10^5$ à 10^6 cellules / ml) soit 0,5 à 1 mg de matière organique par litre. De plus, les mesures d'activités chimiolithotrophes et hétérotrophes de Tuttle *et al.* (1983) sur le site des Galapagos ont amené ces auteurs à conclure que l'activité bactérienne était trop faible pour assurer la croissance et le maintien des biomasses d'invertébrés.

Dans le cas du vestimentifère *Riftia pachyptila*, l'hypothèse de l'ingestion d'une quantité suffisante de bactéries était irréaliste dans la mesure où cet invertébré est dépourvu d'appareil digestif (Jones, 1981). Chez cette espèce, la mise en évidence d'enzymes du cycle de Calvin-Benson (Felbeck, 1981), et de cellules procaryotiques en microscopie électronique (Cavanaugh *et al.*, 1981) ont amené à conclure à l'existence d'une symbiose bactérienne. Chez les autres consommateurs primaires des communautés hydrothermales et notamment chez les bivalves *Calymene magnifica* et *Bathymodiolus thermophilus*, l'annélide polychète *Alvinella pompejana*, le tube digestif est présent et même fonctionnel pour au moins les deux dernières espèces citées (Le Pennec, Prieur, 1984 ; Desbruyères *et al.*, 1983).

Cependant des associations bactériennes ont été également mises en évidence chez ces espèces, soit par des méthodes biochimiques (Felbeck *et al.*, 1981), soit par microscopie électronique (Fiala Medioni, 1984 ; Le Pennec, Hily, 1984 ; Gaill *et al.*, 1984).

Tous ces travaux ont suggéré que les bactéries devaient intervenir dans les processus nutritionnels des invertébrés hydrothermaux par des mécanismes plus complexes qu'une simple ingestion suivie de digestion. L'étude de ces mécanismes a pu être récemment abordée par des expérimentations *in situ* utilisant des traceurs radioactifs (Alayse-Danet *et al.*, 1986). En complément à cette approche, il a semblé utile de tenter la culture des bactéries associées à certains de ces invertébrés hydrothermaux, afin de préciser à la fois la physiologie de ces bactéries et la nature de leurs

relations avec les invertébrés hôtes. En ce qui concerne les invertébrés, le choix s'est porté sur *Alvinella pompejana* et *Bathymodiolus thermophilus* bien représentés sur le site du 13° N, et par ailleurs étudiés par plusieurs participants à la campagne *Biocyarise* 1984 sur ce même site. Les essais de cultures bactériennes ont porté sur les bactéries sulfoxydantes signalées prépondérantes dans les écosystèmes hydrothermaux (Ruby *et al.*, 1981), et sur les bactéries hétérotrophes, peu étudiées jusqu'à ce jour dans ces écosystèmes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les exemplaires d'*Alvinella pompejana* et *Bathymodiolus thermophilus* étudiés ont été prélevés lors de la campagne *Biocyarise*, en mars 1984, à l'aide de submersible Cyana, sur le site du 13° N (12° 49'N, 103° 56'O), à une profondeur d'environ 2630 m.

Dès leur remontée à bord du N O Nadir, les échantillons ont été retirés du panier de récolte et placés dans de l'eau de mer stérile filtrée à 0,2 μ m. Dans le cas d'*Alvinella pompejana*, trois types d'échantillons ont été analysés : un fragment du tube, un fragment d'épiderme et un exemplaire entier. Dans le cas de *Bathymodiolus thermophilus*, trois organes ont été analysés : la glande digestive, la branchie et le manteau. Après dissection, les échantillons ont été vigoureusement rincés dans cinq bains successifs d'eau de mer stérile filtrée à 0,2 μ m, puis broyés dans une eau de mer de mêmes caractéristiques à l'aide d'un broyeur "ultra-turrax", ou d'un broyeur de tissus en verre dans le cas du fragment d'épiderme d'*Alvinella pompejana*. Les suspensions obtenues ont été ensuite inoculées (1 ml de suspensions pour 20 ml de milieu de culture) dans quatre milieux de culture différentes. Les bactéries sulfoxydantes autotrophes ont été recherchées sur le milieu MA selon Baross *et al.*, (1984) : eau distillée : 1 l ; NaCl : 26 g ; KCl : 0,8 g ; MgCl₂ · 6H₂O : 5,6 g ; MgSO₄ · 7H₂O : 7,6 g ; CaCl₂ : 0,1 g ; K₂HPO₄ : 0,25 g ; FeSO₄ : 4,62 mg ; (NH₄)₂SO₄ : 0,1 g ; Na₂S₂O₃ · H₂O : 5 g ; MnSO₄ · H₂O : 0,03 g ; NaHCO₃ : 0,7 g. En vue de recherche des bactéries sulfoxydantes mixotrophes, le précédent milieu a été enrichi de matière organique selon Güde *et al.* (1981). MB = MA + acétate de sodium : 0,5 g ; asparagine : 0,5 g ; extrait de levure : 0,1 g. Ces deux milieux contiennent en outre une solution d'éléments traces selon Baross *et al.* (1984). Les bactéries hétérotrophes ont été recherchées sur le milieu 2216 E de Oppenheimer et Zobell (1952), dénommé ici ME : eau distillée : 250 ml ; eau de mer vieillie : 750 ml ; peptones : 4 g ; extrait de levure : 1 g ; phosphate ferrique : 0,1 g. Un second milieu pour bactéries hétérotrophes a été utilisé (MF). Il est identique au milieu ME, mais contient une concentration double de matière organique. L'incubation a été réalisée à une température voisine de 8° C pour les échantillons de *Bathymodiolus thermophilus* et à une température de 30° C pour les échantillons d'*Alvinella pompejana*, compte tenu de la température estimée des biotopes respectifs de ces deux espèces (Desbruyères *et al.*, 1982). Toutes les cultures ont été effectuées à la pression atmosphérique. Les cultures primaires ont fait l'objet de plusieurs subcultures à bord du NO Nadir. Dès le retour au laboratoire, les cultures positives ont été diluées, et les dilutions ensemencées sur le milieu de culture

d'enrichissement solidifié par de l'agar à la concentration de 15 g / l. Pour chaque milieu de culture, toutes les colonies présentant des caractéristiques différentes à l'examen macroscopique (taille, morphologie, pigmentation) ont été prélevées en vue de l'obtention de souches pures. Toutes les souches de la collection ont ensuite été caractérisées par les tests suivants : morphologie, mobilité, présence de spores, coloration de Gram. Croissance aux températures de 5°, 20°, 37°, 41°, 45°, 50° C. Détermination de la voie d'attaque (aérobie ou anaérobie) du glucose, présence d'oxydase, catalase, gélatinase, lipase, amylase ; réduction des nitrates en nitrites ; production d'H₂S à partir de la cystéine. Utilisation comme seule source de carbone de seize composés organiques (carbohydrates, alcools, acides aminés).

RÉSULTATS

Origine des souches isolées

Le nombre de souches isolées sur chacun des milieux de culture utilisés pour les différents échantillons analysés est indiqué dans le tableau 1.

Tableau 1
Nombre et origine des souches isolées des divers milieux de culture.
Number and origin of strains isolated from the different culture media.

Milieux	MA	MB	ME	MF
Origines				
Tubes <i>Alvinella</i>	2	5	6	6
Épiderme <i>Alvinella</i>	2	8	20	0
Broyat <i>Alvinella</i>	2	7	6	4
Branchie <i>Bathymodiolus</i>	0	0	0	3
Manteau <i>Bathymodiolus</i>	0	0	0	4
Glande digestive <i>Bathymodiolus</i>	0	0	0	4

A partir du milieu MA, six souches seulement ont été isolées, uniquement à partir d'échantillons d'*Alvinella*. Au cours des subcultures successives, ces souches se sont de moins en moins bien développées dans le milieu d'enrichissement (MA), dépourvu de matière organique. Des essais de culture de souches sur le milieu de Oppenheimer et Zobell (1952) se sont révélés positifs. Ces souches ne peuvent donc être considérées comme autotrophes strictes. Elles n'ont cependant pas été jointes à la collection dont l'étude est rapportée ici. Les pourcentages de réponses positives aux tests descriptifs pour les 73 souches étudiées sont donnés dans les tableaux 2 et 3.

Tableau 2

Caractéristiques morphologiques, biochimiques et écologiques des communautés bactériennes isolées d'*Alvinella pompejana* et *Bathymodiolus thermophilus*. Les résultats sont exprimés en pourcentage de réponses positives aux différents tests.
Morphological, biochemical and ecological features of the bacterial communities isolated from *Alvinella pompejana* and *Bathymodiolus thermophilus*. The results are expressed as percentages of positive responses to the different tests.

Origines	Tube <i>Alvinella</i>	Épiderme <i>Alvinella</i>	Broyat <i>Alvinella</i>	<i>Bathy-</i> <i>modiolus</i>
Caractères				
Bacilles	100	100	100	100
Mobilité	64,6	78,5	100	45,4
Gram	0	0	0	0
Fermentation	0	0	11,7	0
Oxydase	70,5	75	88,2	36,3
Catalase	88,2	100	82,3	72,7
NO ₃ - NO ₂	58,8	64,2	82,3	9
H ₂ S	82,3	100	64,7	54,5
Gélatinase	0,5	0	0	0
Lipase	52,9	78,5	70,5	63,6
Amylase	0,5	17,8	0,5	27,2
5° C	76,4	57,1	58,8	90,9
41° C	100	100	100	73
45° C	82,3	92,8	100	63,6
50° C	0	35,7	0,5	9

Caractéristiques des souches isolées du tube d'*Alvinella pompejana*

Dix sept souches ont été isolées de broyats de tubes d'*Alvinella pompejana* dont 6 sur le milieu ME, 6 sur le milieu MF et 5 sur le milieu MB. Toutes les souches sont des bacilles Gram négatif, dont un peu plus de la moitié (64,6 %) est mobile. Aucune souche ne présente de métabolisme fermentatif. Les nitrates sont réduits en nitrites par 58,8 % des souches et 82,3 % de la collection produit de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine. Une seule souche possède une lipase. Ces souches utilisent davantage les carbohydrates et alcools (indice moyen d'utilisation, IMU : 0,45) que les acides aminés (IMU : 0,31). Trois des composés testés (proline, mannitol et mannose) sont utilisés par plus de 50 % de ces souches. Les bactéries isolées semblent assez tolérantes du point de vue thermique. A 5° C, 76,4 % des souches peuvent se développer ; 82,3 % croissent à 45° C, température limite atteinte par les souches de cette origine.

Tableau 3

Caractéristiques nutritionnelles des communautés bactériennes isolées d'*Alvinella pompejana* et *Bathymodiolus thermophilus*. Les résultats sont exprimés en pourcentages d'utilisation des substrats organiques.

Nutritional features of the bacterial communities isolated from Alvinella pompejana and Bathymodiolus thermophilus. The results are expressed as percentages of organic compound utilization.

Origines	Tube <i>Alvinella</i>	Épiderme <i>Alvinella</i>	Broyat <i>Alvinella</i>	<i>Bathy- modiolus</i>
Caractères				
Saccharose	47	57,1	58,8	54,5
Arabinose	29,4	64,2	23,5	27,2
Glucose	47	71,4	47	9
Maltose	47	71,4	52,9	36,3
Galactose	41,1	64,2	29,4	36,3
Mannose	52,9	75	41,1	63,6
Mannitol	52,9	71,4	64,7	54,5
Sorbitol	47	64,2	70,5	72,7
Proline	70,5	64,2	94,1	0
Glycine	0	0	5,8	72,7
Leucine	41,1	78,5	76,4	27,2
Arginine	47	67,8	47	0
Sérine	0	0	0	73
Asparagine	47	60,7	47	36,3
Aspartate	41,1	50	58,8	36,3
Glutamate	5,8	14,2	11,7	18,1

Caractéristiques des souches isolées de l'épiderme d'*Alvinella pompejana*

Vingt huit souches ont été isolées de l'épiderme d'*Alvinella*, dont 20 sur le milieu ME et 8 sur le milieu MB. Toutes les souches isolées sont des bacilles Gram négatif dont 78,5 % sont mobiles. Toutes ces souches possèdent une catalase, 75 % une oxydase, mais aucune ne présente de métabolisme fermentatif. Les nitrates sont réduits en nitrites par 64,2 % des souches et toutes produisent de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine. Une seule souche possède une gélatinase, 17,8 % une amylase, mais 78,5 % une lipase. Ces bactéries utilisent davantage les carbohydrates et alcools (IMU : 0,67) que les acides aminés (IMU : 0,41). Tous les composés non azotés sont d'ailleurs utilisés par plus de 50 % des souches (plus de 70 % pour le mannose, le mannitol, le maltose et le glucose). En ce qui concerne les acides aminés, la glycine et la sérine ne sont pas utilisées (ceci a été constaté quelque soit l'origine des souches), tandis que la

leucine est utilisée par 78,5 % de la collection. A la température de 5° C, 57,1 % seulement des souches peuvent se développer. Par contre, 92,8 % de la collection pousse à 45° C et 37,5 % à 50° C. Les dix souches les plus thermophiles ont été isolées du milieu ME. Elles produisent toutes de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine, mais 3 seulement réduisent les nitrites en nitrates. Aucune souche ne possède de gélatinase, 4 possèdent une amylase et 9 une lipase. Les indices moyens d'utilisation des composés organiques sont plus élevés que pour l'ensemble de la collection avec respectivement 0,91 (carbohydrates et alcools) et 0,52 (acides aminés).

Caractéristiques des souches isolées d'un broyat d'*Alvinella pompejana*

Dix sept souches ont été isolées du broyat d'*Alvinella pompejana* dont 6 sur le milieu ME, 4 sur le milieu MF et 7 sur le milieu mixte. Toutes sont des bacilles Gram négatif mobiles. Deux souches, les seules sur l'ensemble de la collection, ont un métabolisme fermentatif. Les nitrates sont réduits en nitrites par 82,3 % de ces souches, et 64,7 % produisent de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine. Aucune souche ne possède de gélatinase, une seule une amylase, et 70,5 % possèdent une lipase. Les deux catégories de composés organiques testés sont utilisés de façon pratiquement identique, avec des indices moyens d'utilisation de 0,48 et 0,41. En ce qui concerne les composés non azotés, le plus utilisé est le sorbitol, alors que le saccharose, le maltose et le mannitol sont également utilisés par plus de 50 % des souches. Dans le cas des acides aminés, 3 d'entre eux sont utilisés par plus de 50 % des souches, et tout particulièrement la proline (94,1 %). A 5°C, 58,8 % des souches peuvent se développer. Toutes tolèrent une température de 45° C, et une seule croît à 50° C.

Caractéristiques des souches isolées de *Bathymodiolus thermophilus*

Onze souches ont au total été isolées, de la branchie (3), du manteau (4) et de la glande digestive (4) de *Bathymodiolus thermophilus*. Cependant, en raison de ce petit nombre de souches, les résultats seront présentés globalement. Toutes ces souches proviennent du milieu MF. Il s'agit de bacilles Gram négatif dont 45,4 % sont mobiles. Aucune souche n'a de métabolisme fermentatif, et 36,3 % seulement ont une oxydase. Une seule souche réduit les nitrates en nitrites et 54,5 % produisent de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine. Aucune souche ne possède de gélatinase, 27,2 % possèdent une amylase, 63,6 % une lipase. Ces souches utilisent un peu plus les carbohydrates et alcools (IMU : 0,43) que les acides aminés (IMU : 0,32). Parmi les composés non azotés, 4 sont utilisés par plus de la moitié des souches, et notamment le mannose et le mannitol. Il faut noter qu'une seule souche utilise le glucose. Deux acides aminés sont utilisés par plus de la moitié des souches (72,7 %), la proline et la leucine. Ces souches semblent bien adaptées aux basses températures, et 90,9 % d'entre elles se développent à 5° C. Par contre, 73 % seulement se développent à 41° C, et 63,6 % à 45° C. Une souche cependant, isolée du manteau, peut croître à 50° C.

DISCUSSION ET CONCLUSION

La présence de communautés bactériennes associées à pratiquement tous les invertébrés consommateurs primaires des milieux hydrothermaux est une caractéristique essentielle de ces écosystèmes. La signification de ces associations est relativement claire dans le cas du vestimentifère *Riftia pachyptila* (Felbeck, 1981), qui est dépourvu de tractus digestif. Par contre, en ce qui concerne le bivalve *Bathymodiolus thermophilus* et le polychète *Alvinella pompejana*, le rôle des bactéries associées est plus énigmatique dans la mesure où ces espèces possèdent un tractus digestif fonctionnel (Desbruyères *et al.*, 1983 ; Le Pennec, Prieur, 1984).

Pour ces espèces, les informations actuellement disponibles sur les associations bactériennes sont de trois types. L'analyse des isotopes stables du carbone (Rau, Hedge, 1979 ; Desbruyères *et al.*, 1983), indique l'origine non photosynthétique du matériel nutritif utilisé par ces invertébrés, et sa nature bactérienne. La mise en évidence d'enzymes spécifiques du cycle de Calvin-Benson (ribulose biphosphate carboxylase, ribulose 5 phosphate kinase) dans les tissus de plusieurs de ces invertébrés (Felbeck 1981 ; Felbeck *et al.*, 1981) indique la présence de microorganismes autotrophes, vraisemblablement sulfoxydants (Felbeck, Somero, 1982). Enfin, les études de microscopie électronique à balayage et en transmission, mettent en évidence la nature procaryotique de ces microorganismes, leur abondance, leur répartition épibionte ou endobionte, ainsi que leur variété morphologique (Cavanaugh *et al.*, 1981 ; Le Pennec, Prieur, 1984 ; Le Pennec, Hily, 1984 ; Gaill *et al.*, 1984). Cependant, ces résultats ne permettent pas de comprendre complètement les interrelations entre bactéries et invertébrés. Aussi, des expérimentations *in situ*, utilisant des traceurs radio-actifs, ont été développés lors de la campagne *Biocyarise*, afin de préciser la nature de ces relations et le transfert éventuel d'éléments des bactéries vers les invertébrés hôtes (Alayse-Danet *et al.*, 1985). En complément à ces expérimentations, la culture des bactéries associées est apparue comme un moyen de mieux appréhender ces relations, dans la mesure où la disposition de souches bactériennes permet de mieux en étudier la physiologie, et même d'envisager de nouvelles expérimentations.

Le choix des milieux de culture utilisés a été limité aux principaux métabolismes bactériens mis en évidence dans divers échantillons d'eaux hydrothermales (Ruby *et al.*, 1981 ; Tuttle *et al.*, 1983). Bien que six souches aient été isolées du milieu MA, dépourvu de matière organique, elles ne peuvent être considérées comme autotrophes. En effet, au cours de repiquage successifs à partir de la culture originale, ces souches se sont de moins en moins bien développées. Ceci peut être dû à au moins deux causes. D'une part, la purification des souches entraîne, par définition, une séparation des divers types d'organismes constituant la communauté bactérienne originale, et la croissance d'une souche isolée peut en être perturbée, voire s'avérer impossible. D'autre part, l'inoculum constitué de bactéries, mais aussi de tissus des invertébrés, contient de la matière organique qui s'épuise au fur-et-à-mesure des repiquages successifs. Après plusieurs subcultures sur le milieu dépourvu de matière organique, ces souches ont été

ensemencées sur le milieu de Oppenheimer et Zobell (1952), où elles se sont bien développées. Il s'agirait donc plutôt de bactéries hétérotrophes, bien qu'un métabolisme mixotrophe ne puisse être exclu. En effet, selon Rittenberg (1969) et Nelly (1971), une très grande partie des microorganismes autotrophes étudiés à ce jour sont en effet capables, à divers degrés, d'assimiler ou de métaboliser des substances organiques. Ainsi un métabolisme mixotrophe a été mis en évidence chez la bactérie filamenteuse sulfo-oxydante *Beggiatoa* (Güde *et al.*, 1981). Dans le cas des six souches isolées du milieu MA, ce terme ne pourra être employé qu'après vérification de leur aptitude à oxyder divers composés sulfurés, de préférence en pression hydrostatique *in situ* reconstituée. Cette vérification devra également être effectuée sur les souches isolées du milieu MB qui contient matière organique et thiosulfate.

Les résultats des travaux de bactériologie sur les sources hydrothermales publiées à ce jour ont mis en évidence le rôle primordial des microorganismes autotrophes. Cependant, Jannasch et Wirsén (1979) mentionnent la culture d'hétérotrophes isolés de l'eau et Ruby *et al.*, (1981) démontrent l'existence dans l'eau d'une activité hétérotrophe. Au cours de la campagne *Biocyarise*, des dénombrements de bactéries hétérotrophes sur les échantillons d'eau prélevés sur le site du 13° N indiquent la présence de ces bactéries à un niveau parfois moins de dix fois inférieur à la microflore totale dénombrée en épifluorescence (Prieur, non publiée). Chez les deux invertébrés étudiés lors de cette campagne, et sans que cela mette en cause l'existence de bactéries autotrophes associées, les résultats obtenus indiquent qu'une partie de la microflore associée est de nature hétérotrophe. Il ne semble pas en effet que ces souches puissent être des contaminants. Cette question doit être envisagée, car l'ensemble des échantillons est rincé dans la colonne d'eau (2600 m) pendant la remontée et demeure dans le même panier jusqu'à la période de tri. Différentes raisons conduisent cependant à penser que cette contamination doit être négligeable.

Parallèlement aux échantillons dont l'analyse est rapportée ici, un exemplaire de *Paralvinella grasslei* a été broyé et analysé selon un même protocole. La plus grande partie des cultures s'est révélée négative ; or cette espèce ne semble pas posséder de microflore associée comme chez *Alvinella pompejana* (Desbruyères, Laubier, 1982). De plus, les caractéristiques des souches isolées d'*Alvinella* et *Bathymodiolus* sont différentes, alors que les causes de contamination éventuelle sont identiques. Ce point est confirmé par l'analyse des résultats par des méthodes de taxonomie numérique (Prieur, non publié) qui aboutissent à un dendrogramme dans lequel les groupes individualisés sont bien homogènes quant à l'origine des souches qui les composent. Enfin, il convient de remarquer que les températures permettant la croissance de ces différentes souches sont en rapport avec les températures des sites où vivent les deux espèces étudiées.

Certes, l'incubation initiale des cultures (8° C pour les échantillons de *Bathymodiolus*, 30° C pour les échantillons d'*Alvinella*) a pu jouer un rôle dans la sélection des microflore. Néanmoins, 90,9 % des souches isolées de *Bathymodiolus* croissent à 5° C, 100 % à 30 et 37° C, et ce pourcentage diminue ensuite pour les

températures supérieures, avec cependant une souche capable de se développer à 50° C. En contre partie, pour les souches isolées de l'épiderme d'*Alvinella*, 57,1 % seulement (pourcentage le plus faible) de la collection se développe à 5° C, tandis que 35,7 % supportent une température de 50° C. Les bactéries étudiées apparaissent donc assez bien adaptées aux températures différentes de ce milieu dans lequel les gradients thermiques sont brusques. Ce résultat est quelque peu différent de ceux obtenus par Ralijaona et Bianchi (1982) sur des holothuries abyssales dont les bactéries de tractus digestif se développent relativement moins bien à 4° C qu'à 44° C, alors que la température de leur biotope est basse.

La morphologie des souches isolées est très homogène, et composée uniquement de bacilles. Les formes sphériques, spiralées ou filamenteuses n'ont pas été observées dans les cultures. Ceci peut être dû au fait que ces microorganismes aux morphologies particulières n'ont pas été isolés, ou que les conditions de cultures choisies n'ont pas permis l'expression de ces morphologies en raison de l'absence de support (beaucoup de ces bactéries sont fixées), et aussi de pression hydrostatique. Il faut également noter (Prieur, non publié) que chez certaines souches cultivées à 50° C, les cellules restent groupées en chaînes et ne se séparent pas.

En ce qui concerne le nombre de souches isolées, les résultats diffèrent selon l'espèce d'invertébré considéré : 11 souches pour *Bathymodiolus* et 62 pour les différents échantillons d'*Alvinella*. Ces résultats doivent être rapprochés des observations microscopiques effectuées chez ces deux espèces. Les bactéries associées à *Bathymodiolus thermophilus* ont été localisées dans le tractus digestif parmi les particules ingérées, à l'extérieur et à l'intérieur des filaments branchiaux (Le Pennec, Prieur, 1984 ; Le Pennec, Hily, 1984). Aucune bactérie n'a été observée au niveau du manteau et les souches isolées peuvent provenir de l'eau de la cavité palléale. Peu de souches ont été isolées de la glande digestive, et cela pourrait indiquer que la digestion des bactéries ingérées commence effectivement à ce niveau. Enfin, le peu de souches isolées de la branchie peut correspondre à la faible viabilité des cellules bactériennes situées à l'intérieur des filaments branchiaux. En effet, Le Pennec (1987) observe peu de formes en division chez ces bactéries qui semblent captées par la branchie et lysées à l'intérieur du filament. Par contre, chez *Alvinella pompejana*, les souches isolées sont plus observées sur l'animal (Gaill *et al.*, 1984). En effet, le tube d'*Alvinella* est tapissé intérieurement de bactéries, l'épiderme est couvert de formes variées de microorganismes, et l'animal entier broyé contient au moins les mêmes formes que l'épiderme.

Les caractères biochimiques des souches isolées sont plus difficiles à apprécier, en raison notamment de la quasi

absence de travaux de ce type sur des invertébrés abyssaux. De plus, dans l'une de ces études, Ralijaona et Bianchi (1982) observent des caractéristiques différentes pour les microflore de deux espèces d'holothuries et pour une espèce donnée, des différences selon le niveau du tractus digestif étudié. Deux caractères semblent particulièrement importants. Tout d'abord, le nombre de souches possédant un métabolisme fermentatif est extrêmement réduit : 2 sur 73. Pourtant des portions de tractus digestifs ont été analysés, et l'on y rencontre habituellement des bactéries de ce type (Prieur, 1981 ; Ralijaona, Bianchi, 1982). Ceci n'exclut pas d'ailleurs la possibilité d'un métabolisme anaérobie facultatif dans la mesure où le pourcentage de souches réduisant les nitrates en nitrites (métabolisme anaérobie) est élevé. Il faut également noter que les tests de caractérisation ont été effectués à la pression atmosphérique, ce qui peut modifier les possibilités des bactéries barotolérantes. De plus, il semble que ce type de métabolisme (fermentatif) disparaisse dès la deuxième subculture à la pression atmosphérique (Chamroux, comm. pers.).

Le deuxième caractère important est le très fort pourcentage de bactéries produisant de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine. Bien que l'on ne puisse se prononcer sur l'existence de ce caractère *in situ*, il est possible d'envisager un certain nombre d'interactions entre ces communautés hétérotrophes et les communautés autotrophes sulfoxydantes.

Les résultats obtenus à la suite de la campagne *Biocyarise* sur les bactéries associées à deux invertébrés des sources hydrothermales profondes, sont encore trop fragmentaires pour améliorer la compréhension des relations entre ces invertébrés et leurs cortèges de bactéries associées. Cependant, la disposition de souches pures et la connaissance de certains de leur caractères sont des éléments importants au niveau de la conception de futures expérimentations. Bien que les résultats obtenus n'excluent absolument pas la présence de microorganismes autotrophes, ils mettent en évidence l'existence de communautés hétérotrophes, particulièrement dans le cas d'*Alvinella pompejana*. La présence de ce type de microorganismes, sans doute sous-estimés à ce jour, apparaît à la réflexion assez normale dans la mesure où une biomasse animale importante produit de la matière organique susceptible d'être dégradée. Mais en outre, compte tenu de la densité de certaines communautés bactériennes associées, des échanges entre bactéries doivent être envisagés, en compléments des interactions entre bactéries et hôtes sur lesquelles repose le développement de ces écosystèmes particuliers que sont les milieux hydrothermaux.

RÉFÉRENCES

- Alayse-Danet A.M., Gaill F., Desbruyères D., 1985. Preliminary studies on the relationship between the Pompei worm, *Alvinella pompejana* (Polychaeta Ampharetidae) and its epibiotic bacteria, *Proc. 19th European Marine Biology Symposium*, edited by P.E. Gibbs, Cambridge, Univ. Press, 167-172.
- Baross J.A., Deming J.W., Becker R.R., 1984. Evidence for microbial growth in high pressure, high temperature environments, in : *Current perspectives in microbial ecology*, edited by Clugg et Reddy, 186-195.

- Cavanaugh C.M., Gardiner S.L., Jones M.L., Jannasch H.W., Waterbury J.B., 1981. Prokaryotic cells in the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones : possible chemoautotrophic symbionts, *Science* 213, 340-341.
- Corliss J.B., Dymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., Von Herzen R.P., Balla R.D., Green K., Williams D., Baimbridge A., Crane K., Van Andel T.H., 1979. Submarine thermal springs on the galapagos rift, *Science*, 203, 1073-1083.

- Dayton P.K., Hessler R.R., 1972. Role of biological disturbance in maintaining diversity in the deep sea, *Deep-sea Res.*, 19, 199-208.
- Desbruyères D., Laubier L., 1982. *Paralvinella grasslei*, new genus, new species of Alvinellinae (Polychaeta Ampharetidae) from the Galapagos rift geothermal vents, *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 95, 3, 482-492.
- Desbruyères D., Crassous P., Grassle J., Khripounoff A., Reyss D., Rio M., Van Praët M., 1982. Données écologiques sur un nouveau site hydrothermalisme actif de la ride du Pacifique oriental, *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III*, 295, 489-494.
- Desbruyères D., Gaill F., Laubier L., Prieur D., Rau G.H., 1983. Unusual nutrition of the "Pompeiworm" *Alvinella pompejana* (Polychaetous annelid) from a hydrothermal vent environment SEM, TEM, ^{13}C and ^{15}N evidence, *Mar. Biol.*, 75, 201-205.
- Felbeck H., 1981. Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm *Riftia pachyptila* Jones (Vestimentifera), *Science*, 213, 336-338.
- Felbeck H., Somero G.N., 1982. Primary production in deep-sea hydrothermal vents organisms : role of sulfide-oxidizing bacteria, *Trend. Biochem. Sci.*, 7, 6, 201-204.
- Felbeck H., Childress J.J., Somero G.N., 1981. Calvin-Benson cycle and sulfide oxydation enzymes in animals from sulfide rich habitats, *Nature*, 293, 291-293.
- Fiata-Medioni A., 1984. Mise en évidence par la microscopie électronique à transmission de l'abondance des bactéries symbiotiques dans la branchie des mollusques bivalves de sources hydrothermales profondes, *C.R. Acad. Sci. Paris*, 298, 487-492.
- Gaill F., Desbruyères D., Prieur D., Gourret J.P., 1984. Mise en évidence de communautés bactériennes épibiontes du "ver de Pompéi" (*Alvinella pompejana*), *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III*, 298, 19, 553-558.
- Grassle J.F., 1977. Slow colonization of deep-sea sediment, *Nature* 256, 618-619.
- Güde H., Strohl W.R., Larkin J.M., 1981. Mixotrophic and hetetrophic growth of *Beggiatoa alba* in continuous culture, *Arch. Microbiol.*, 129, 357-360.
- Jannasch H.W., Wirsen C.O., 1979. Chemosynthetic primary production at east Pacific sea-floor spreading center, *Bio Science*, 29, 10, 592-598.
- Jones M.L., 1981. *Riftia pachyptila*, new genus, new species, the vestimentiferan worm from the Galapagos rift geothermal vents (Pogonophora), *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 93, 4, 1295-1313.
- Kelly D.P., 1971. Autotrophy : concepts of lithotrophic bacteria and their organic metabolism, *Ann. Rev. Microbiol.*, 25, 177-210.
- Le Pennec M., 1987. Alimentation et reproduction d'un mytilidae des sources hydrothermales du Pacifique oriental, *Hydrothermalism, Biology and Ecology Symposium, Paris, 4-7 november 1985, Proceedings Oceanol. Acta, n° sp.*, 181-190 (this vol.).
- Le Pennec M., Hily A., 1984. Anatomie, structure et ultrastructure de la branchie d'un Mytilidae profond, hôte des sites d'hydrothermalisme actif du Pacifique oriental, *Oceanol. Acta.*, 7, 4, 517-523.
- Le Pennec M., Prieur D., 1984. Observations sur la nutrition d'un Mytilidae d'un site hydrothermal actif de la dorsale du Pacifique oriental, *C.R. Acad. Sci. Paris, Sér. III*, 298, 17, 493-498.
- Lonsdale P., 1977. Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centers, *Deep-Sea Res.*, 24, 857-863.
- Oppenheimer C.H., Zobell C.E., 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure, *J. Mar. Res.*, 11, 10-18.
- Prieur D., 1981. Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Étude analytique et expérimentale, *Thèse Doct. État, Univ. Brest, France*, 266 p.
- Raijoana C., Bianchi A., 1982. Comparaison de la structure et des potentialités métaboliques des communautés bactériennes du contenu du tractus digestif d'holothuries abyssales et du sédiment environnant, *Bull. Cent. Étud. Rech. Sci. Biarritz*, 14, 2, 199-214.
- Rau G.H., 1981. Hydrothermal vent clam and tube worm $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$: further evidence of non photosynthetic food sources, *Science*, 213, 338-340.
- Rau G.H., Hedge J.L., 1979. Carbon 13 depletion in a hydrothermal vent mussel: suggestion of a chemosynthetic food source, *Science*, 203, 648-649.
- Rittenberg S.C., 1969. The role of exogenous organic matter in the physiology of chemolithotrophic bacteria, *Adv. Microbiol. Physiol.*, 3, 159-196.
- Ruby E.G., Wirsen C.O., Jannasch H.W., 1981. Chemolithotrophic sulfur oxidizing bacteria from the Galapagos rift hydrothermal vents, *Appl. Environ. Microbiol.* 42, 2, 317-324.
- Tuttle J.H., Wirsen C.O., Jannasch H.W., 1983. Microbial activities in the emitted hydrothermal waters of the Galapagos rift vents, *Mar. Biol.*, 73, 293-299.
- Williams P.M., Smith K.L., Druffel E.M., Limick T.W., 1981. Dietary carbon sources of mussels and tube worms from Galapagos hydrothermal vents determined from tissue ^{14}C activity, *Nature*, 292, 448-449.