

MICROVIBRIONS MARINS PREDATEURS BACTERIENS DE L'OCEAN MONDIAL.

ETUDE COMPAREE DE SOUCHES NOUVELLES.

A. GUELIN*, L. SCHWARTZBROD**, I. MICHOUSTINA*** et C. FINANCE**

* Station Biologique, 29211 Roscoff - France.

** Laboratoire de Bactériologie et de Virologie, Faculté des Sciences
Pharmaceutiques et Biologiques, 54000 Nancy - France.

*** Institut de Microbiologie Ac, Sc. 117312 Moscou - SSSR.

SUMMARY

MARINE MICROVIBRIO BACTERIAL PREDATORS IN THE WORLD OCEAN.

A COMPARATIVE STUDY OF NEW STRAINS.

A comparative study was made on nine strains of microvibrio isolated and purified from sea water, from equator to polar regions. All strains showed bactericidal and predatory characters. They were incapable of development in the usual bacteriological culture media, but multiplied at the expense of other bacteria, and killed them. Quantitative variations of microvibrio closely follows the seasonal changes in chlorophyll, temperature and insolation. This suggests that the microvibrio are closely related to phytoplankton.

INTRODUCTION - La présence de minuscules vibrions prédateurs a été révélée dans les eaux de la Manche et deux souches ont déjà été étudiées (Guelin et al., 1974, 1976, 1977). Huit autres souches ont été isolées, par la suite, à partir d'eaux prélevées en différentes régions situées de l'Equateur au Cercle polaire, et l'étude comparée de ces souches fait l'objet de ce travail.

MATERIEL ET METHODES - Les microvibrions sont cultivés dans une suspension de *Escherichia coli* de 1 à 3.10^8 bacilles par ml préparée avec de l'eau de mer autoclavée à 105° C. Des milieux gélosés sont, par ailleurs, préparés avec ces mêmes bacilles : 40 ml d'une suspension titrée à 10^{10} *Escherichia coli* par ml sont mélangés avec 250 ml d'eau de mer gélosée à 1,5 % ; pH 7,5 ;

Les titrages d'*Escherichia coli* sont effectués, avec des dilutions, sur plaques de gélose nutritive et on utilise, pour les titrages de microvibrions, la méthode de MIQUEL, décrite par Appelman (1921).

Afin de tenter la séparation des corps bactériens de leurs éventuelles sécrétions, nous avons utilisé d'une part des filtrations et d'autre part la méthode de dialyse. Les filtrats de cultures sont préparés par une centrifugation préalable de celles-ci, 15 mn à 12.000 g (5.000 T/mn) afin d'éliminer les *Escherichia coli*. Le surnageant est ensuite recentrifugé 30 mn à 36.700 g (14.000 T/mn) pour éliminer les microvibrions puis passé sur filtres Millipore de porosité 0,65, 0,45, 0,30 et 0,22 μ m. Les sacs de dialyse utilisés (marque Wisking) ont une perméabilité de 24 Å qui permet de déceler la présence de substances dialysables d'un poids moléculaire inférieur à 10.000. On introduit 2 ml d'une suspension d'*Escherichia coli* dans un de ces sacs que l'on immerge dans 100 ml de jeune culture de microvibrions. Des sacs témoins demeurent dépourvus de bacilles.

Les observations sont effectuées sur le vivant à l'aide d'un microscope à contraste de phase (x 1.000).

Les centrifugations sont faites dans une centrifugeuse SORVALL RC 5B réfrigérée (rotor utilisé : SS.34). La teneur en chlorophylle a est évaluée à l'aide d'un fluorimètre TURNER et la température d'incubation utilisée est de 35° C.

Les noms et la provenance des souches étudiées sont les suivants :

Souche XM3 : La Manche, Roscoff; Souche PAINLEVE : La Manche, Côtes-du-Nord; Souche XMN : Océan Atlantique, Ouessant; Souche 1468 : Océan Pacifique, Equateur; Souche 1965 : Océan Pacifique, Equateur; Souche Détroit de Malacca : Océan Indien; Souche Antalya : Méditerranée;

Souche Ira : Mer Caspienne; Souche Kandalakcha : Mer Blanche.

RESULTATS - L'étude comparée des souches en ce qui concerne les dimensions, la morphologie et le comportement, montre l'analogie de leurs caractères, indépendamment de leur origine. Ce sont de fins et courts vibrions, plus ou moins incurvés, dont les dimensions ne dépassent pas $0.5 \times 1.0 \mu\text{m}$. Aucune image de flagelle n'a encore pu être obtenue.

Aucune des souches n'est capable de se développer sur les milieux usuels de laboratoire. Elles se multiplient, par contre, aux dépens d'autres bactéries, telles que : *Achromobacter sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas psychrotrophus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Clostridium perfringens*. Toutes les souches se multiplient facilement dans une suspension de *Escherichia coli*. Le titre final donne, en général, des valeurs de l'ordre de 10^{10} vibrions par ml et à la surface de la gélose, la croissance des microvibrions est d'autant plus importante que la concentration en bacilles, introduits pour enrichir la gélose, est plus élevée. Ce milieu permet en outre d'avoir les microvibrions séparés des cellules-hôtes et en grande quantité. Les cultures se développent intensément à la température de 39°C et plus lentement à 20°C . Les expériences ont été effectuées à 35°C .

La survie des microvibrions dans le temps apparaît remarquablement longue. Ainsi, une souche (PAINLEVE) a été isolée à l'état pur, à partir d'un échantillon d'eau conservée au laboratoire depuis 26 ans. Cette eau ne contenait aucun autre micro-organisme. Un autre prélèvement de la Mer Blanche examiné après quatre, six, sept et huit ans, présente chaque fois un titre de l'ordre de 1.000 à 10.000 vibrions par ml.

Les *Escherichia coli* des cultures sur lesquelles les neuf souches de microvibrions sont entretenues sont tués sans être détruits. La suspension garde toujours son opacité; aucun contact n'est jamais observé entre l'agresseur et la proie.

Malgré l'analogie apparente de la morphologie et du comportement des souches étudiées, on note des différences de leur pouvoir bactéricide. Les souches provenant de régions polaire ou tempérée manifestent une activité bactéricide plus faible. Par contre, les souches isolées en Méditerranée, ou en Océan Indien se révèlent hautement actives et tuent les cellules d'*Escherichia coli* en 3 à 4 jours (Fig. 1).

La séparation des microvibrions de leur milieu de culture a été essayée par des méthodes de filtration et de dialyse et l'on a cherché à savoir si l'activité des microprédateurs peut s'expliquer par une sécrétion de substances actives dans le milieu de culture. En effet, les filtrats débarrassés de microvibrions gardent leur pouvoir bactéricide et tuent les *Escherichia coli* que l'on y introduit (Fig. 2).

Les sacs de dialyse contenant *Escherichia coli* et immergés dans les cultures de microvibrions ont été examinés 3 à 20 jours après le début de l'expérience. Sur cinquante six sacs examinés, cinquante cinq contenaient de nombreux microvibrions mélangés à *Escherichia coli*. Les microvibrions n'ont jamais pénétré dans les sacs témoins exempts d'*Escherichia coli*.

La quantité de microvibrions dans les eaux de l'Océan varie avec les saisons (Guelin, 1976). On a cherché à savoir à quels facteurs ces variations sont liées.

Pour certains échantillons d'eau de mer, prélevés au N.W. de l'Ile de Batz, nous avons pu disposer, en complément aux dénombrements de microvibrions, des mesures de concentration en chlorophylle a et des mesures de température et d'intensité solaire relevées par le Service Météorologique de l'Ile de Batz. Les résultats obtenus montrent une relation évidente entre les quatre facteurs étudiés (Fig. 3).

Les observations faites en collaboration avec P. CAMUS, montrent que l'injection de microvibrions dans l'hémolymphe de crabes (*Cancer pagurus*) provoque leur mort. Ces premières observations feront l'objet d'un développement ultérieur.

DISCUSSION - Nous n'avons jusqu'ici trouvé aucune eau marine d'où les microvibrions seraient absents. Isolés dans des régions très différentes, toutes les souches de microvibrions possèdent un caractère commun à tout ce groupe de micro-organismes : une absence totale de croissance sur les milieux usuels, ce qui a jusqu'à présent rendu impossible toute étude biochimique du prédateur. La mise au point d'une gélose enrichie de cellules bactériennes devrait permettre de lever cette difficulté.

La suspension bactérienne utilisée pour la croissance des microvibrions apparaît comme un milieu de choix pour l'isolement de micro-organismes marins encore inconnus. Une prolifération de multiples formes de bactéries est observée dès le premier jour.

D'autres faits caractérisent les souches étudiées : leur survie prolongée dans le temps et la large gamme de températures auxquelles ils sont capables de se multiplier. L'accélération de la croissance à des températures de plus en plus élevées est fréquente chez les bactéries de l'homme ou des animaux à sang chaud, le phénomène apparaît par contre plus singulier dans le cas d'un micro-organisme faisant partie intégrante de la flore océanique.

La survie prolongée de ces microvibrions, qui peut atteindre des années, dépasse

les limites admises, en général, pour des bactéries non sporulées et la forme de résistance de ce prédateur demeure une énigme.

La multiplication des microvibrions aux dépens de cellules bactériennes se fait en l'absence de tout contact direct entre l'agresseur et la bactérie. Il s'agit probablement, de la part du vibrion, d'une sécrétion de substances actives diffusées dans le milieu environnant. Cette hypothèse est confirmée, en partie, par le fait que les filtrats de cultures, débarrassés de tous vibrions, continuent à tuer les bacilles introduits dans ce filtrat. De même, le prédateur pénètre dans des sacs à dialyse de porosité inférieure à sa taille. Il reste à supposer la production, par le microvibrion, d'une sécrétion lytique, lui ouvrant un passage à travers la paroi.

Une sécrétion lytique a été également mise en évidence chez un microprédateur des eaux douces, *Bdellovibrio bacteriovorus* de STOLP et STARR (1963). Les petites dimensions de *Bdellovibrio*, sa forme vibroïde et son agressivité vis-à-vis des bactéries rappellent certains des caractères des microvibrions marins, mais le comportement des deux prédateurs a cependant peu de points communs. Le *Bdellovibrio* ne se rencontre jamais dans les eaux marines du large, mais toujours dans les eaux côtières et dans toutes les eaux douces. Il agresse la bactérie, pénètre sous la membrane et commence à se multiplier aux dépens du cytoplasme, détruisant complètement la cellule bactérienne. La suspension devient transparente, rappelant un lysat bactériophage : Starr et Huang (1972), Varon et Levisohn (1972), Stolp (1973), Shilo (1973), Lambina et al., (1974), Rittenberg et Hespell (1975), Schwartzbrod et al., (1977), Finance et Schwartzbrod (1977).

L'habitat des microvibrions, par contre, se situe au large. Ils tuent les bactéries à distance, sans pénétrer à l'intérieur ni provoquer leur dislocation; la suspension reste toujours opaque. Ceci n'exclut aucunement l'existence d'une parenté éventuelle entre les deux prédateurs, comme le révèle leur ressemblance biochimique (Andreev, 1979).

La présence dans toutes les mers du globe de microvibrions pose éventuellement la question de leur origine, de leurs limites de distribution géographique, ainsi que des facteurs de leur évolution. Les variations quantitatives de microvibrions qu'on observe dans l'Océan semblent en rapport direct avec les variations d'autres facteurs observés. Les fortes luminosités ainsi que les augmentations de la température stimulent la poussée du phytoplancton, qui se traduit par l'augmentation de la chlorophylle. Cette dernière est suivie de près par une brusque prolifération des microvibrions que l'on peut alors supposer en étroite relation avec le phytoplancton.

RESUME - L'isolement et la purification de souches nouvelles de microvibrions marins, *Microvibrio marinus*, en différentes régions du globe (de l'Equateur au Cercle Polaire) ont permis une étude comparée de ce groupe de micro-organismes.

Toutes les souches sont bactéricides et prédatrices. Incapables de se développer en milieux usuels de laboratoire, elles se multiplient aux dépens d'autres bactéries et les tuent.

Les variations quantitatives des microvibrions dans l'Océan suivent de près celles de la chlorophylle *a*, de la température et de l'insolation. Il est possible de considérer les microvibrions comme faisant partie de la flore océanique en relation étroite avec le phytoplancton.

REMERCIEMENTS - Le professeur PAINLEVE nous a confié un échantillon d'eau de mer datant de vingt-six ans.

Le professeur Abdülkadir YUCEL a participé à l'isolement d'une souche des eaux de Méditerranée orientale.

Madame Claude GUERRIER a participé aux expériences de dialyse.

Messieurs Michel LEGLISE et Gérard RAGUENES, de l'Institut des Pêches Maritimes, ont réalisé des prélèvements d'eau et le dosage de teneur de ces eaux en chlorophylle.

Madame Anne CUEFF, Mesdemoiselles Annie CHESNEAU, Sylvie RINQUIN; Chui-Kam WONG, Dominique LEPAGE et Monsieur Stéphane LE FLOCH ont pris une grande part dans ces recherches.

MOTS CLES

Microvibrio marinus; Prédateurs bactériens; Pouvoir auto-épurateur;
Relations bactéries-Phytoplancton; Pouvoir bactéricide.

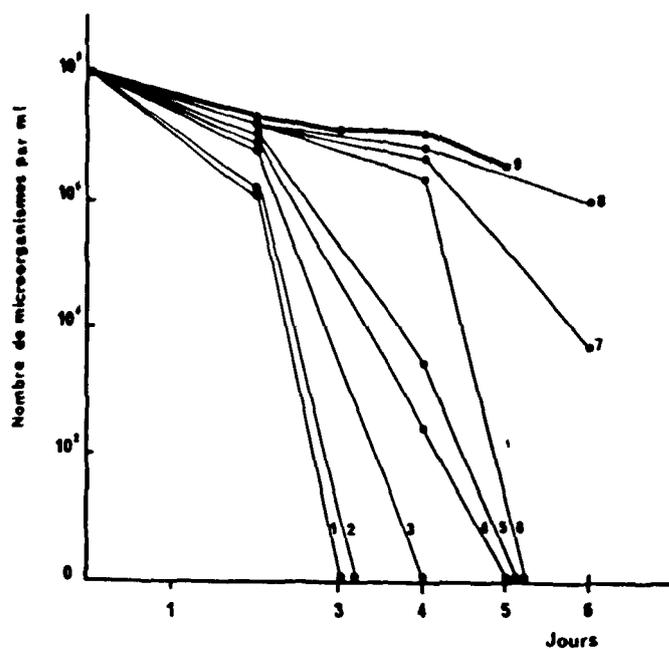


Fig. 1 - Survie comparée de *Escherichia coli* mis en présence de souches de microvibrions, isolées dans des eaux différentes. 1 : Méditerranée; 2 : Océan Pacifique 1468; 3 : Océan Indien; 4 : Océan Pacifique 1965; 5 : Mer Caspienne; 6 : Manche, XM3; 7 : Mer Blanche; 8 : Manche, Côtes-du-Nord; 9 : témoin sans microvibrions. Les souches isolées dans la Méditerranée (1) ou la région équatoriale (2,3) semblent être plus bactéricides que les souches de régions polaire (7) ou tempérée (5,6). La souche isolée d'une eau très ancienne (8) ne semble pas être bactéricide.

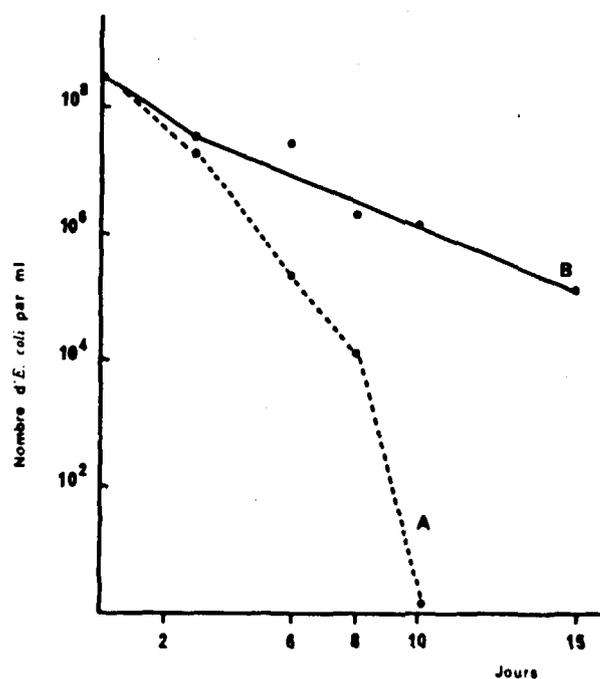


Fig. 2 - Survie de *Escherichia coli* dans un filtrat de microvibrions. Filtrat -----; Témoin -----
Les cellules d'*Escherichia coli* introduites dans un filtrat (0.22 µm) de deux cultures (Méditerranée et Océan Indien) sont tuées entre 5 et 10 jours.

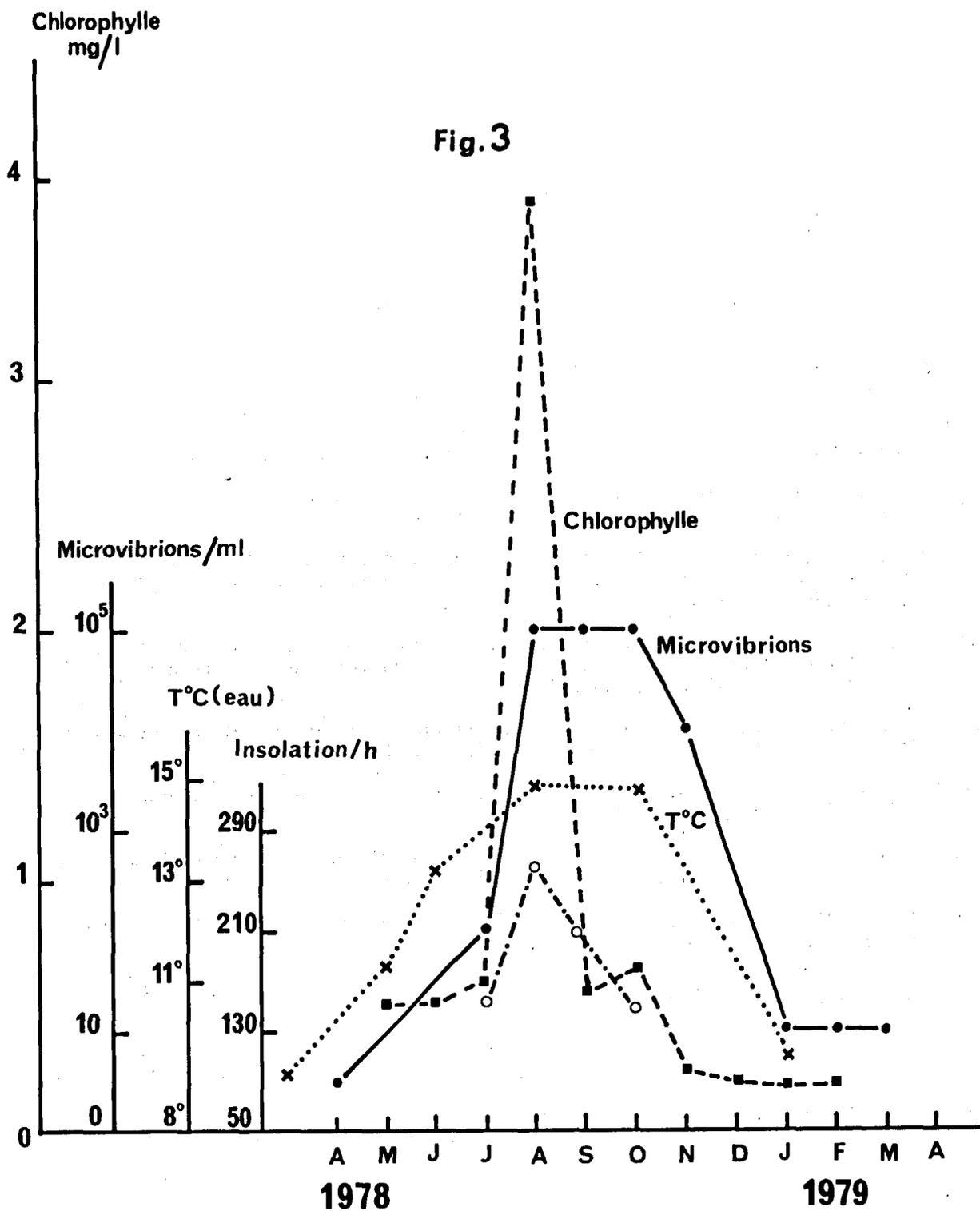


Fig. 3 - Etude comparée : de la quantité de microvibrions, de chlorophylle a, ainsi que de la température et de l'insolation dans les prélèvements d'eau de la Manche (N.O. Ile de Batz).
L'insolation plus intense et la température plus élevée se traduisent par une augmentation de chlorophylle a et la prolifération de microvibrions dans cette eau.

BIBLIOGRAPHIE

- ANDREEV L.V., BOBYK M.A. & GUELIN A., 1979. - Sur la composition en acides gras des microvibrions marins. *C.R. Ac. Sc., Paris*, 288, 173-175.
- APPELMAN R., 1921. - Le dosage de bactériophages. *C.R. Soc. Biol.*, 85, 1098-1099; 1922, 86, 508-509.
- FINANCE C. & SCHWARTZBROD L., 1977. - Corrélation entre l'intensité de la bactériolyse spontanée et la pollution bactérienne dans les eaux superficielles. *C.R. Ac. Sc., Paris*, 284, 1227-1230.
- GUELIN A., 1974. - Sur le pouvoir bactéricide de l'eau de mer. *C.R. Ac. Sc., Paris*, 279, 871-874.
- GUELIN A., LEPINE P. & CABIOCH L., 1974. - Microprédateurs bactériens dans la défense des eaux marines et douces. *Journal Français d'Hydrologie*, n° 15, 11-18.
- GUELIN A., 1976. - L'intensité du pouvoir bactéricide des eaux marines et leur teneur en microvibrions. *C.R. Ac. Sc., Paris*, 282, 397-400.
- GUELIN A., MICHOUSTINA I.E., GOULEVSKAJA S.A., PETCHNIKOV N.V. & LEDOVA L.A., 1977. - Etude sur les microvibrions marins de Roscoff (*Microvibrio marinus roscoffensis*). *C.R. Ac. Sc., Paris*, 284, 2171-2174.
- LAMBINA V.A., AFINOGENOVA A.V., KONOVALOVA S.M. & SAMOJENKO V.A., 1974. - Particularité physiologique d'interaction de *Bdellovibrio bacteriovorus* avec son hôte. *Izvestia de l'Ac. de Sc. URSS*, n° 2, 204-210.
- RITTENBERG S.C. & HESPELL R.B., 1975. - Energy efficiency of intraperiplasmic growth of *Bdellovibrio bacteriovorus*. *J. of Bacteriology*, 109, 432-433.
- SHILO M., 1973. - Rapports entre *Bdellovibrio* et ses hôtes. Nature de la dépendance. *Bul. Inst. Pasteur*, 71, 21-31.
- SCHWARTZBROD L., FINANCE C. & DIXNEUF P., 1977. - Essai d'expression du pouvoir bactériolytique spontané global d'une eau. *C.R. Ac. Sc., Paris*, 284, 1115-1118.
- STARR M.P. & HUANG C.C., 1972. - Physiology of the *Bdellovibrio*. *Adv. in Microb. Physiol.*, 8, 215-261.
- STOLP H., 1973. - The *Bdellovibrio* : bacterial parasites of bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 11, 53-76.
- STOLP H. & STARR M.P., 1963. - *Bdellovibrio bacteriovorus* gen. et sp. n., a predatory, ectoparasitic and bacteriolytic microorganism. *Antonie van Leeuwenhoek*, 29, 217-248.
- VARON M. & LEVISOHN R., 1972. - Three membered parasitic system : a bacteriophage, *Bdellovibrio bacteriovorus* and *Echerichia coli*. *J. of Virology*, 9, 519-525.