

STRUCTURE DES PEUPELEMENTS BACTERIENS : APPROCHE METHODOLOGIQUE
ET PREMIERS RESULTATS EN MILIEUX LAGUNAIRES

M. TROUSSELLIER et B. BALEUX

Laboratoire d'Hydrobiologie Marine, Université des Sciences et
Techniques du Languedoc. F. 34050 - MONTPELLIER - Cédex.

SUMMARY

"STRUCTURE OF BACTERIAL COMMUNITIES : METHODOLOGICAL APPROACH AND PRELIMINARY RESULTS APPLIED TO COASTAL BRACKISH LAGOONS."

After the enumeration of heterotrophic bacteria from mediterranean and atlantic lagoons water and sediment by means of cultural methods, the qualitative study of each bacteria is carried on with the help of the API 20 B standardized microbiological method.

The distinctive characteristics of bacteria of each communities are coded so that to build matrix of binary data. The grouping of bacteria is realized by means of both linnean systematic and numerical taxonomy. The communities structure they constitute found expression in a systematic dominance index (D_2), a Shannon taxonomic regularity index (J) and a "fonctionnal" regularity index (E).

To have a better description and interpretation of the main ecological features of bacterial communities, it seems useful to associate to the simultaneous utilization of those three indexes, the parameters of systematic composition, metabolic potentiality and relative abundance of the communities.

Through the proposed methodology, a first description of bacterial communities structure in lagoon sediments allows to compare their demographic patterns to those of K type.

INTRODUCTION

Depuis quelques années, les recherches en écologie bactérienne essayent d'élargir la gamme des paramètres mesurant les caractéristiques des peuplements bactériens des milieux naturels. Rheinheimer (1977), Simidu *et al.*, (1977), Norkrans et Stehn (1978), Bianchi (1979), Martin (1980), Troussellier et Baleux (1981). Pour apprécier l'importance quantitative du compartiment bactérien et de ses interventions biogéochimiques dans les milieux naturels, on dispose actuellement de paramètres synthétiques relativement performants. Sieburth (1976), Fenchel et Jørgensen (1977), Krumbein (1978). Cependant, la définition des caractéristiques démographiques de ces peuplements en terme de composition et de structure nécessite, de notre point de vue, un effort supplémentaire de mise au point méthodologique avant de les intégrer dans une étude globale du compartiment bactérien dans les écosystèmes aquatiques.

Nous nous proposons de présenter dans cette note quelques éléments de réflexion sur la mesure de la structure, c'est à dire du degré d'organisation et d'équilibre des peuplements de bactéries hétérotrophes aérobies des milieux lagunaires.

MATERIEL ET METHODES

L'étude des peuplements des bactéries hétérotrophes aérobies est réalisée à partir d'individus-souches isolés lors de dénombrements par des méthodes culturales indirectes au moyen de la technique dilution-étalement. Deux milieux de culture sont utilisés, d'une part, le Bacto Nutrient Agar Difco et, d'autre part, le Bacto Marine Agar Difco 2216 E.

Le nombre total de souches bactériennes isolées des eaux et des sédiments du bassin d'Arcachon, des réservoirs de Certes (Atlantique) et de l'étang de l'Or (Méditerranée) est de 2218, divisé en 62 échantillons dont le nombre d'individus est compris entre 13 et 70.

Les caractères biochimiques et enzymatiques retenus et testés dans cette étude sont au nombre de 22 et sont réalisés à l'aide du dispositif microbiologique standardisé API 20 B. Ces caractères sont : recherche de la gélatinase, de la réduction des nitrates, de la présence d'O.N.P.G., acidification du saccharose, arabinose, mannitol, levulose, glucose, maltose, amidon, rhamnose, galactose, mannose, sorbitol, glycérol, de l'hydrolyse de l'urée, de la production d'indole, d' H_2S de l'acétyl méthyl carbinol, de l'utilisation du citrate, de la recherche d'une oxydase, d'une catalase. La recherche du type respiratoire et de l'oxydo-fermentation est pratiquée sur le milieu de Hugh-Leifson. Aux caractères biochimiques et enzymatiques sont jointes l'étude de la morphologie, la coloration de Gram, la recherche d'une spore, de la mobilité, soit au total 27 caractères. Dans chaque échantillon, les résultats obtenus pour chaque souche à partir des 27 tests sont codés d'une manière qualitative (0 : réaction négative, 1 : réaction positive) pour former une matrice de données binaires. Les méthodes de traitement mathématique des matrices des données ainsi obtenues sont schématisées sur la figure 1.

RESULTATS ET DISCUSSION

La définition de la structure d'un peuplement biologique consiste tout d'abord à rechercher des unités de référence systématique universellement acceptées, puis à intégrer en un indice synthétique la répartition hiérarchique des individus de ce peuplement dans les unités de référence retenues. Pour rechercher ces unités de référence au sein des peuplements bactériens, il existe deux méthodes distinctes : la systématique d'inspiration linnéenne et la taxonomie numérique (fig. 1).

Pour nommer les individus bactériens en terme de systématique, il est possible d'utiliser leurs réponses aux descripteurs étudiés dans des clefs dichotomiques. Cependant, du fait des limites actuelles de la systématique des bactéries hétérotrophes aérobies des milieux aquatiques, seules des déterminations au niveau de la famille ou du genre sont réalisables.

Pour décrire la structure des échantillons analysés par les voies de la systématique, nous avons utilisé un indice de dominance appelé D_2 (fig. 1) qui présente l'avantage

de ne tenir compte dans son calcul que des 2 premières unités systématiques les plus représentées dans les échantillons.

L'évolution de l'indice de dominance systématique D_2 au cours du temps dans quelques séries d'échantillons est représentée sur la figure 2. ² Dans la plupart des cas, cet indice est supérieur à 50 % et souvent très élevé : > 70% dans 63% des échantillons étudiés. Il traduirait ainsi l'existence de structures élémentaires pour ces peuplements, composés en grande partie d'individus appartenant à une ou deux unités de référence systématique, telles le plus souvent le genre *Bacillus* ou le genre *Flavobacterium* dans les sédiments et les eaux et ponctuellement la famille des *Enterobacteriaceae* dans les eaux (Baleux et Baleux, 1979).

La structure des peuplements bactériens a été ensuite étudiée par l'autre voie, celle de la taxonomie numérique qui consiste à grouper les individus sur la base de leur ressemblance globale vis-à-vis de l'ensemble des descripteurs. Mais comme les méthodes de groupement sont presque aussi nombreuses et variées que le nombre de leur utilisateur, nous avons été amenés à faire un choix. Pour chaque échantillon, à partir du calcul d'une matrice de similarité entre les n individus (coefficient de similarité de simple concordance) (Sokal et Michener, 1958), nous avons utilisé simultanément la technique du groupement médian (W.P.G.M.C.) (Sneath et Sokal, 1973) et, du positionnement en espace réduit des individus d'un échantillon (Méthode des Coordonnées principales) (Gower, 1966).

Sur la figure 3 sont représentés les individus bactériens d'un des échantillons étudiés, positionnés par la méthode des coordonnées principales dans un espace à 2 dimensions. Superposés à cette ordination géométrique sont figurés, sous forme de courbes de niveaux, les résultats du groupement médian à différents seuils de synthèse : 95, 90, 85, 80% de similarité. On peut voir sur ce schéma, et ce fut le cas pour la majorité des échantillons, que c'est le seuil de 95% qui respecte le mieux les affinités géométriques des individus dans l'espace réduit. Ce niveau de similarité correspond donc à la création dans chaque échantillon d'un certain nombre de groupes ou taxa qui constituent en quelque sorte la richesse taxonomique des échantillons. Cette richesse taxonomique (nombre de taxa) obtenue au seuil de 95% de similarité peut être ou non fonction de la taille de l'échantillon.

Pour le vérifier, nous avons étudié l'évolution de la richesse taxonomique en fonction de la taille croissante simulée de 4 échantillons d'effectifs relativement élevés (entre 44 et 60 individus) et des différents seuils de synthèse (95, 90, 85% de similarité). La forme des courbes (fig. 4) est différente suivant le niveau de similarité choisi. Ainsi, à 95% de similarité, seuil qui impose à 2 individus pour être regroupés de ne différer que par 1,35 descripteur en moyenne, la richesse taxonomique obtenue reste, dans la plupart des cas, fonction de la taille des échantillons. Les courbes obtenues à 90% de similarité (2,7 descripteurs de différence en moyenne) et surtout celles obtenues à 85% de similarité (4 descripteurs de différence moyenne) tendent rapidement vers une asymptote. Ces seuils de similarité permettent donc une estimation satisfaisante de la richesse taxonomique dès la constitution d'un échantillon d'une trentaine d'individus.

Désirant rechercher la signification systématique des groupes taxonomiques formés aux différents seuils de similarité, nous avons constitué un échantillon de 55 souches bactériennes de référence internationale et nous lui avons appliqué les mêmes techniques de taxonomie numérique. Les résultats de cette analyse (fig. 5) montrent avant toute chose qu'il est possible avec 27 descripteurs de distinguer des espèces bactériennes différentes dans un échantillon donné. Le seuil de 95% de similarité regroupe presque exclusivement des individus appartenant à une même espèce (2 *Acinetobacter calcoaceticus*, 2 *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes* et *Klebsiella pneumoniae*). Celui de 90% occasionne des regroupements plus proches du genre que de l'espèce (*Klebsiella* n° 169, 5.698 et 381 ; 2 *Proteus vulgaris*). Enfin, à 85% de similarité se regroupent des individus appartenant essentiellement à une même famille (*Enterobacteriaceae*, *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*). Dès le seuil de 80% de similarité, les groupes taxonomiques formés deviennent trop hétérogènes du point de vue de leurs affiliations systématiques.

En calculant non pas un indice de diversité absolue, fonction du nombre de taxa qui peut, comme cela a été montré dans certains cas, être relié à l'effectif des échantillons, nous avons procédé à l'étude de la structure taxonomique des échantillons de bactéries hétérotrophes aérobies au moyen de l'indice de régularité de Shannon (fig. 1) traduisant la diversité relative de ces peuplements. Les résultats reportés sur la figure 6 montrent que la plupart des échantillons sont diversifiés et que d'autre part, bien que se situant à des niveaux différents, les fluctuations de diversité relative calculées aux différents seuils de similarité restent parallèles. L'image de la structure des peuplements obtenue par la taxonomie numérique est alors différente de celle fournie par la systématique linéenne qui décrivait la structure comme fortement dominée par une ou deux unités de référence (fig. 2).

Pour essayer de caractériser différemment la structure d'un peuplement bactérien, nous avons fait appel à une technique qui repose non plus sur l'analyse des individus à travers leur caractérisation par des descripteurs, tels que le font la systématique et la taxonomie numérique, mais sur l'analyse des descripteurs à travers leurs fréquences d'apparition

dans un échantillon d'individus bactériens.

Cette analyse inspirée des travaux de Williams et al., (1966) utilise un indice de régularité informatique, que nous avons appelé "indice de régularité fonctionnelle" (Troussellier, 1981). Cet indice est facile à utiliser, ne comprenant qu'une seule étape de calcul par rapport à la taxonomie numérique et ne demande pas la recherche d'un seuil de synthèse. Cet indice appliqué à quelques séries d'échantillons bactériens obtenus en milieu lagunaire (fig. 6) apporte des renseignements comparables à ceux fournis par les indices de régularité taxonomiques de Shannon puisque les variations de ces indices sont parallèles.

Dans la limite actuelle de nos connaissances et de nos réflexions sur les différents indices de structure utilisés dans cette étude, et, au vu de leurs avantages et inconvénients respectifs, il nous paraît indispensable actuellement de les utiliser simultanément pour décrire la structure des peuplements bactériens, plutôt que de se limiter à l'utilisation exclusive de l'un d'entre eux. De plus, afin de mieux décrire et interpréter le comportement des peuplements de bactéries hétérotrophes aérobies dans les milieux lagunaires, il nous est apparu nécessaire de faire intervenir d'autres paramètres propres à ce compartiment bactérien tels leur composition systématique, leur activité métabolique potentielle (fig. 1) ou encore leur abondance relative.

En utilisant simultanément les indices de structure et ces paramètres, nous avons pu distinguer schématiquement dans les eaux (fig. 7) et les sédiments (fig. 8) de l'étang méditerranéen de l'Or, 2 types de peuplements bactériens. L'un qui apparaît comme globalement stable, caractérisé par des régularités taxonomiques et fonctionnelles élevées, par des abondances élevées et constantes, associées à des potentialités métaboliques peu fluctuantes se retrouve préférentiellement dans la couche superficielle des sédiments. Le genre bactérien le plus représenté est ici le genre *Bacillus*. L'autre type de peuplement, qui se retrouve dans les eaux, est caractérisé par de plus grandes fluctuations des différents paramètres estimés. A de fortes diversités relatives associées à de faibles abondances et à de faibles potentialités métaboliques, peuvent succéder de fortes dominances concomitantes ou non d'une augmentation de l'abondance et des potentialités métaboliques et ce suivant le genre bactérien dominant. Celui-ci peut appartenir au genre *Flavobacterium* ou encore à des genres de la famille des *Enterobacteriaceae*.

CONCLUSION

Il est possible de décrire les structures des peuplements bactériens des eaux et des sédiments d'écosystèmes lagunaires par l'utilisation simultanée de l'indice de dominance (D_2), de l'indice de régularité taxonomique de Shannon (J) et d'un indice de régularité "fonctionnelle" (E). Cependant, pour mieux décrire et interpréter les caractéristiques écologiques des peuplements bactériens, il paraît nécessaire d'associer, aux indices de structure, des paramètres de composition systématique, de potentialités métaboliques et d'abondance relative de ces peuplements.

Dans la couche superficielle des sédiments étudiés, les peuplements bactériens semblent s'organiser pour développer une diversité taxonomique et fonctionnelle importante et permanente leur permettant vraisemblablement d'utiliser au mieux les ressources nutritives pour aboutir à des abondances élevées et stables. En référence aux définitions proposées dans la littérature, notamment aux récents travaux de Blondel, (1979), ce type de peuplement bactérien présenterait un certain nombre de caractéristiques comparables à celles qui définissent une composition démographique en stratégies K. Par contre, le manque de connaissances sur la nature qualitative et quantitative des apports en bactéries allochtones dans ce milieu charnière et ouvert que sont les lagunes et sur leur impact dans la composition des peuplements bactériens de la phase aqueuse de l'écosystème lagunaire, rend très difficile leur rapprochement avec l'un des types démographiques décrit en écologie générale.

RESUME

Après le dénombrement des bactéries hétérotrophes aérobies des eaux et des sédiments des milieux lagunaires méditerranéens et atlantiques par des méthodes culturales, l'étude qualitative de chaque individu est réalisée à l'aide du dispositif microbiologique standardisé API 20 B.

Les profils caractéristiques des individus de chaque peuplement sont codés pour former des matrices de données binaires. Le groupement des individus est réalisé au moyen

des techniques de la systématique linéenne et de la taxonomie numérique. La structure des peuplements qu'ils constituent est traduite par un indice de dominance systématique (D_2), un indice de régularité taxonomique de Shannon (J) et un indice de régularité "fonctionnelle" (E).

Pour mieux décrire et interpréter les caractéristiques écologiques des peuplements bactériens, il paraît nécessaire d'associer à l'utilisation simultanée de ces trois indices de structure, les paramètres de composition systématique, de potentialités métaboliques et d'abondance relative de ces peuplements.

A travers la méthodologie proposée une première description des structures des peuplements bactériens des sédiments lagunaires permet de rapprocher leurs caractéristiques démographiques de celles de type K.

MOTS CLES

Bactéries hétérotrophes aérobies - Etangs saumâtres -
Taxonomie - Peuplements - Paramètres de structure.

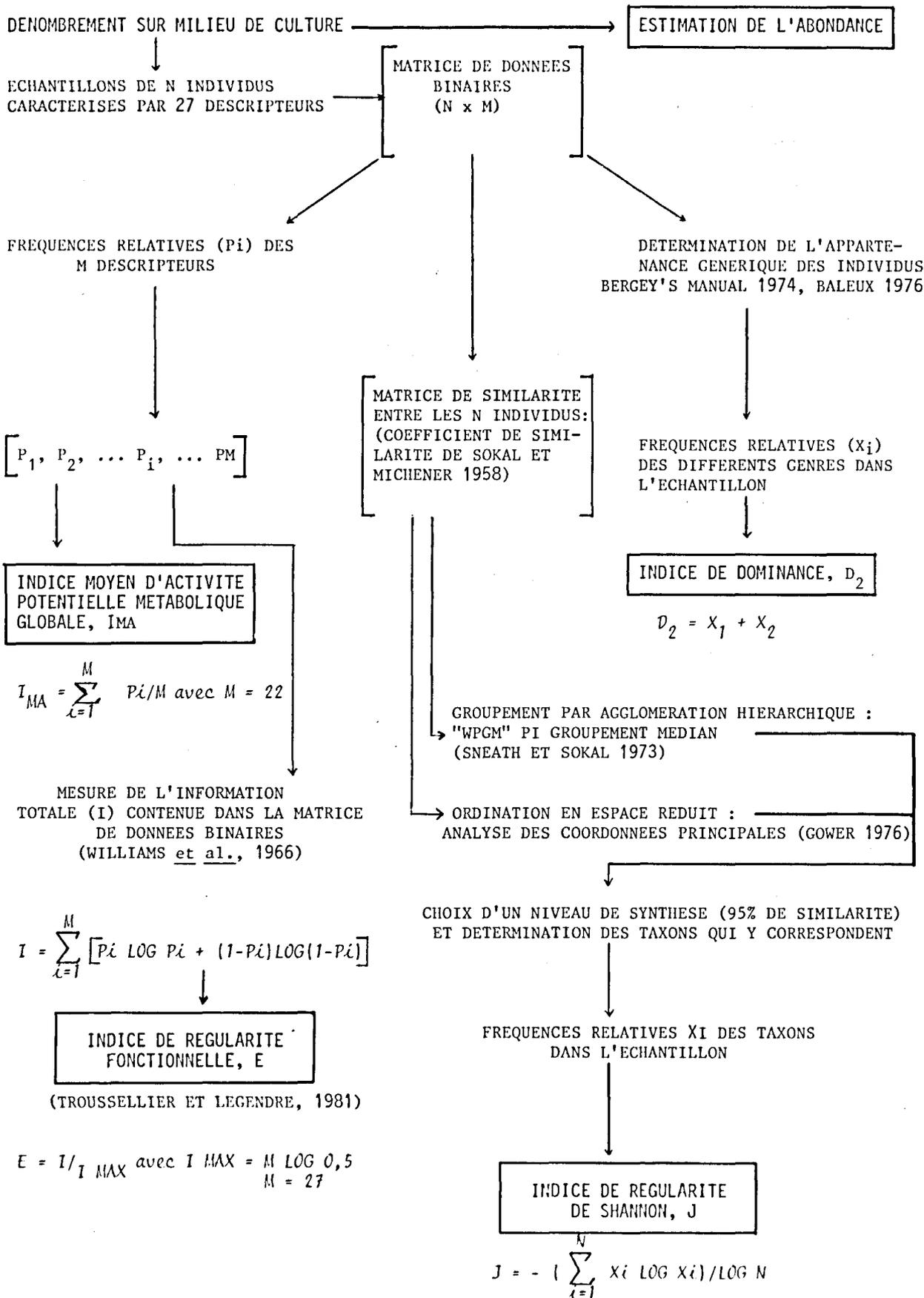


Fig. 1 - Représentation schématique des méthodes utilisées pour l'étude des échantillons de bactéries hétérotrophes aérobies. (Troussellier et Baleux, 1981).

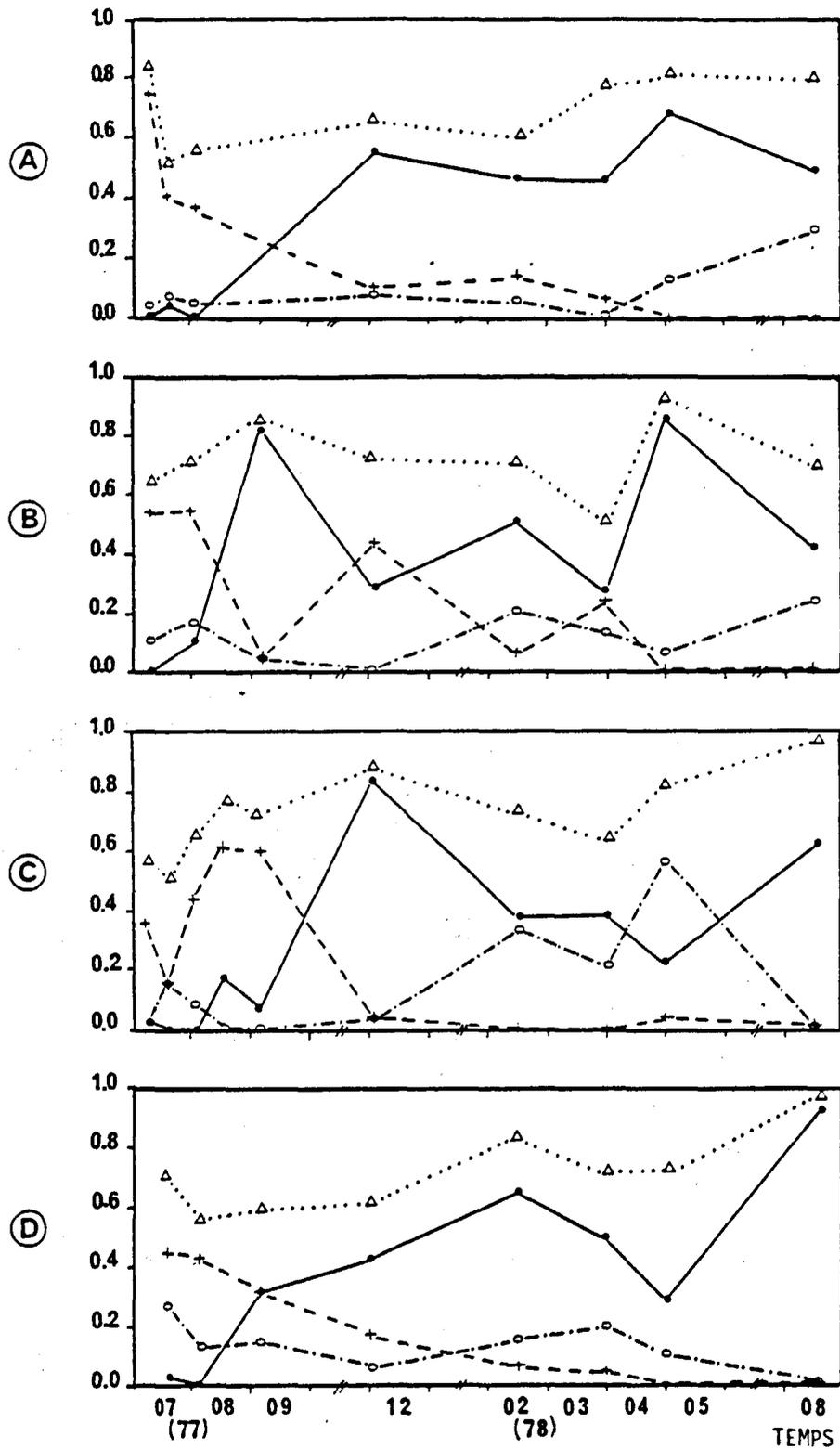


Fig. 2 - Evolution au cours du temps de l'indice de dominance D_2 (Δ) et du pourcentage de souches appartenant aux 3 unités systématiques dominantes (*Bacillaceae* : ●—● ; *Flavobacterium* : +---+ ; *Coryneformes* : ○-·-·-○) dans 4 séries d'échantillons A, B, C, D, issus des sédiments des lagunes de Certes.

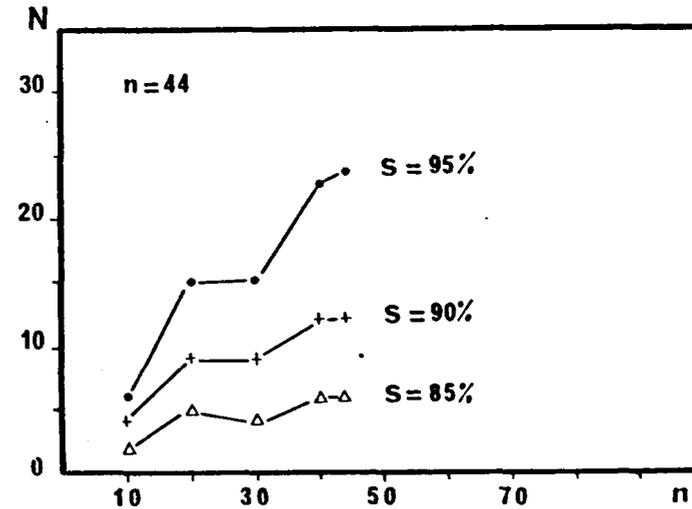
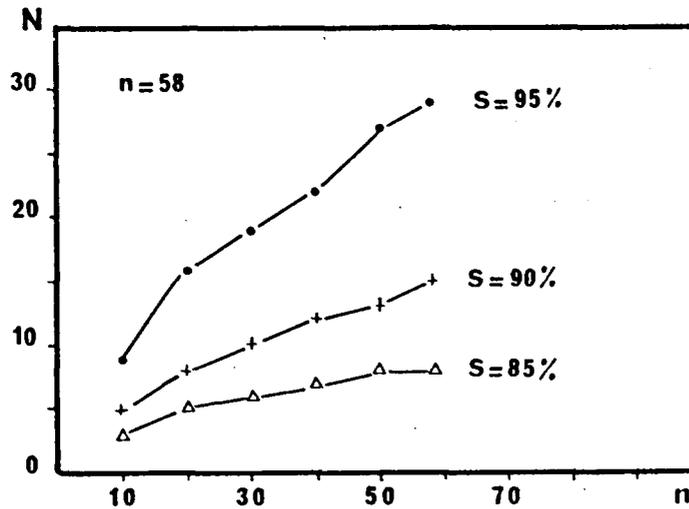
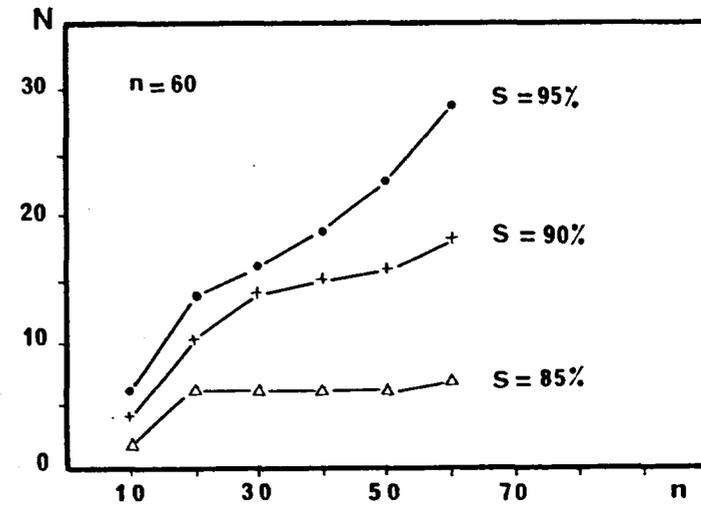
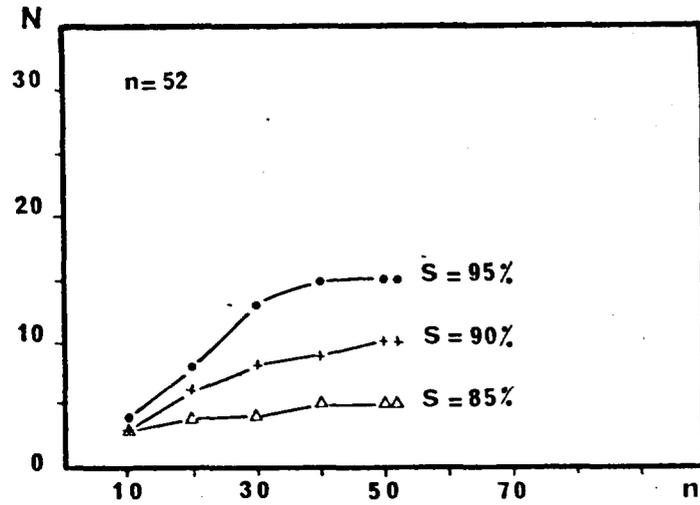


Fig. 4 - Evolution de la richesse taxonomique (N) en fonction du nombre croissant de souches (n) (obtenu par tirage au sort de lots successifs) et du seuil de synthèse (S) retenu pour 4 échantillons de taille relativement élevée.

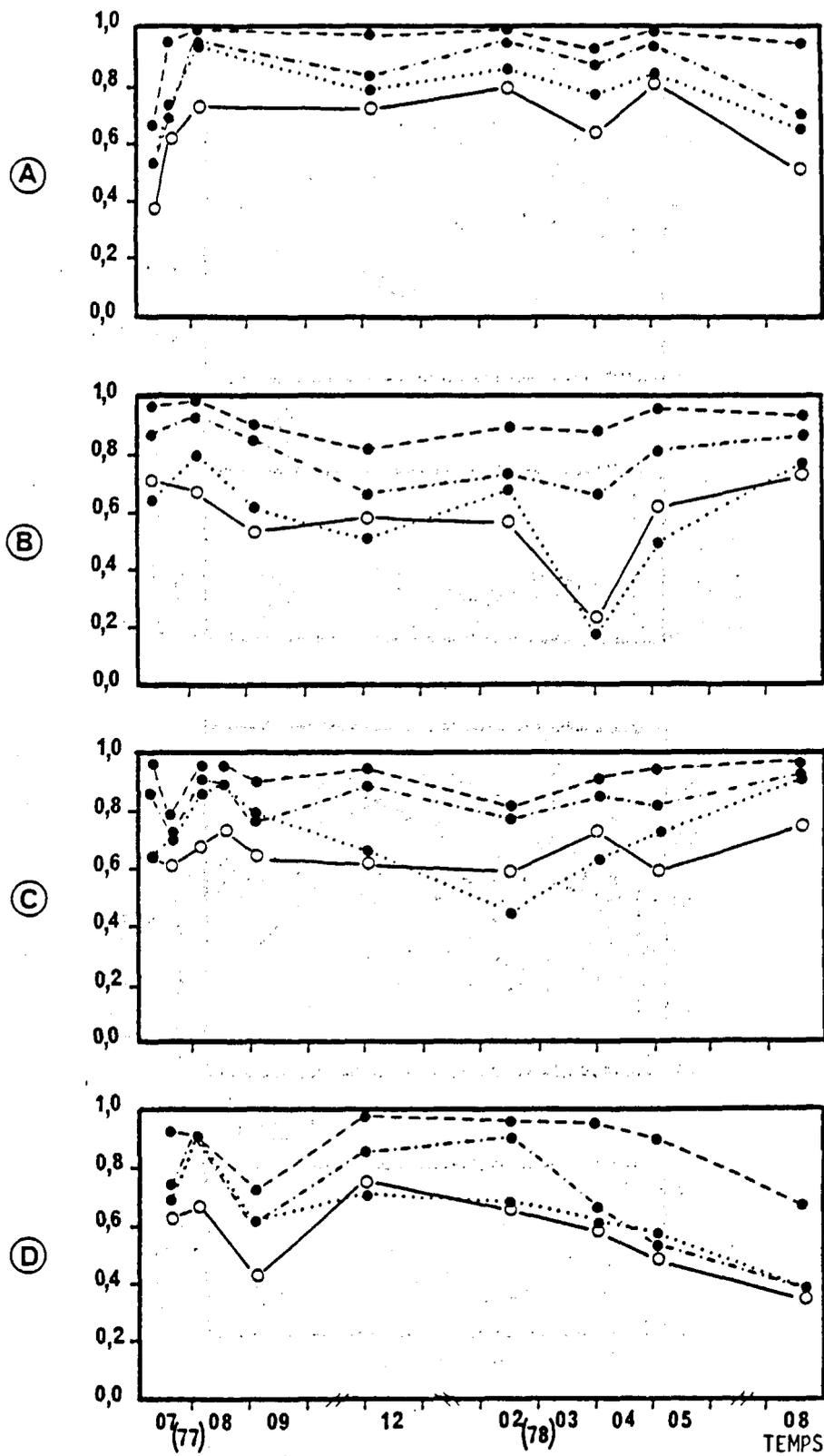


Fig. 6 - Valeurs de l'indice de régularité taxonomique (J) obtenues à différents seuils de similarité (95% : ●- - - ● ; 90% : ●- · - · - · ● ; 85% : ● · · · · · ●) et de l'indice de régularité "fonctionnelle" (E) (○—○) dans 4 séries d'échantillons A, B, C, D, issus des sédiments des lagunes de Certes.

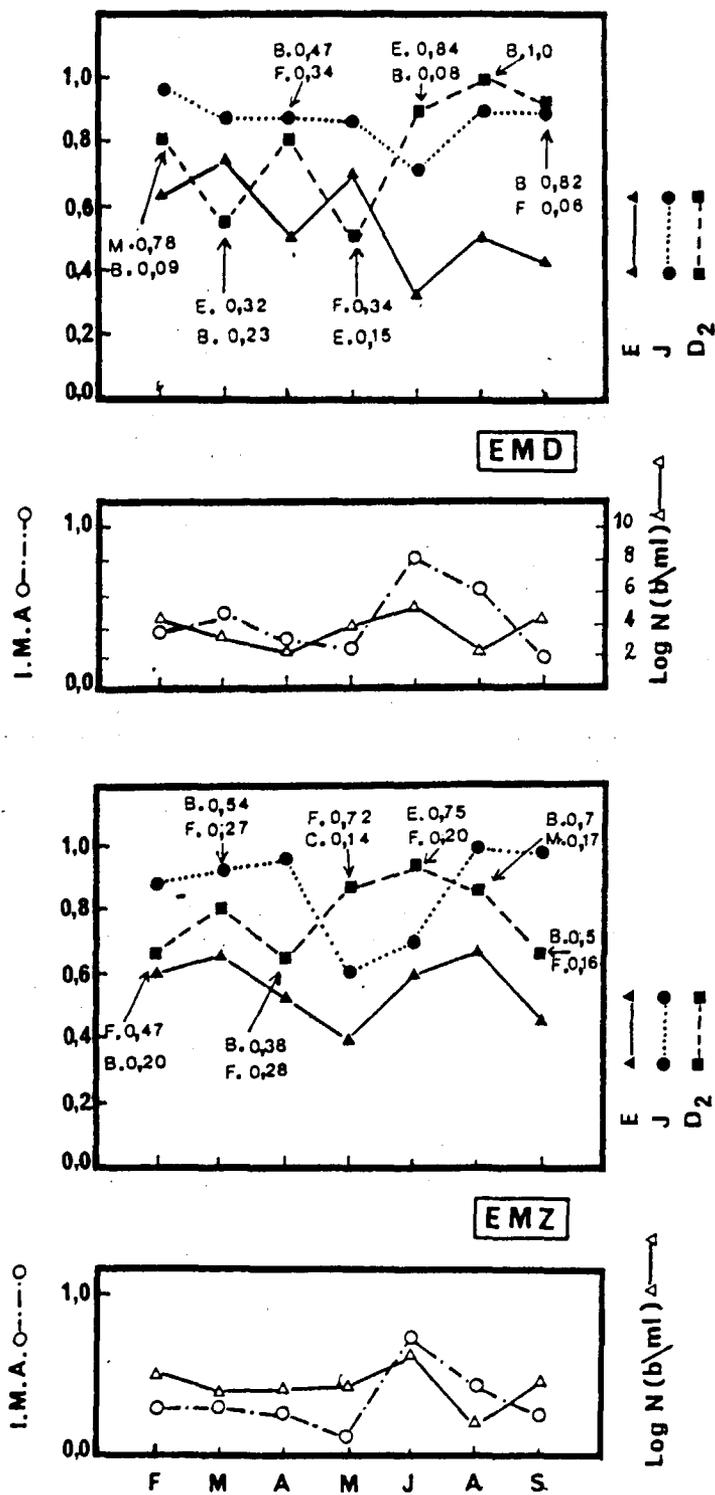


Fig. 7 - Paramètres de structures (E, J, D₂), de composition systématique (B : *Bacillus* ; C : groupe des coryneformes ; E² : famille des *Enterobacteriaceae* ; F : *Flavobacterium* ; M : *Micrococcus*), d'abondance ($\log_{10} N$ (bactéries/ml) et d'activité métabolique potentielle (I.M.A.) calculés sur les échantillons de bactéries issus de l'eau de l'étang de l'Or. EMZ : milieu Bacto Marine Agar ; EMD : milieu Bacto Nutrient Agar.

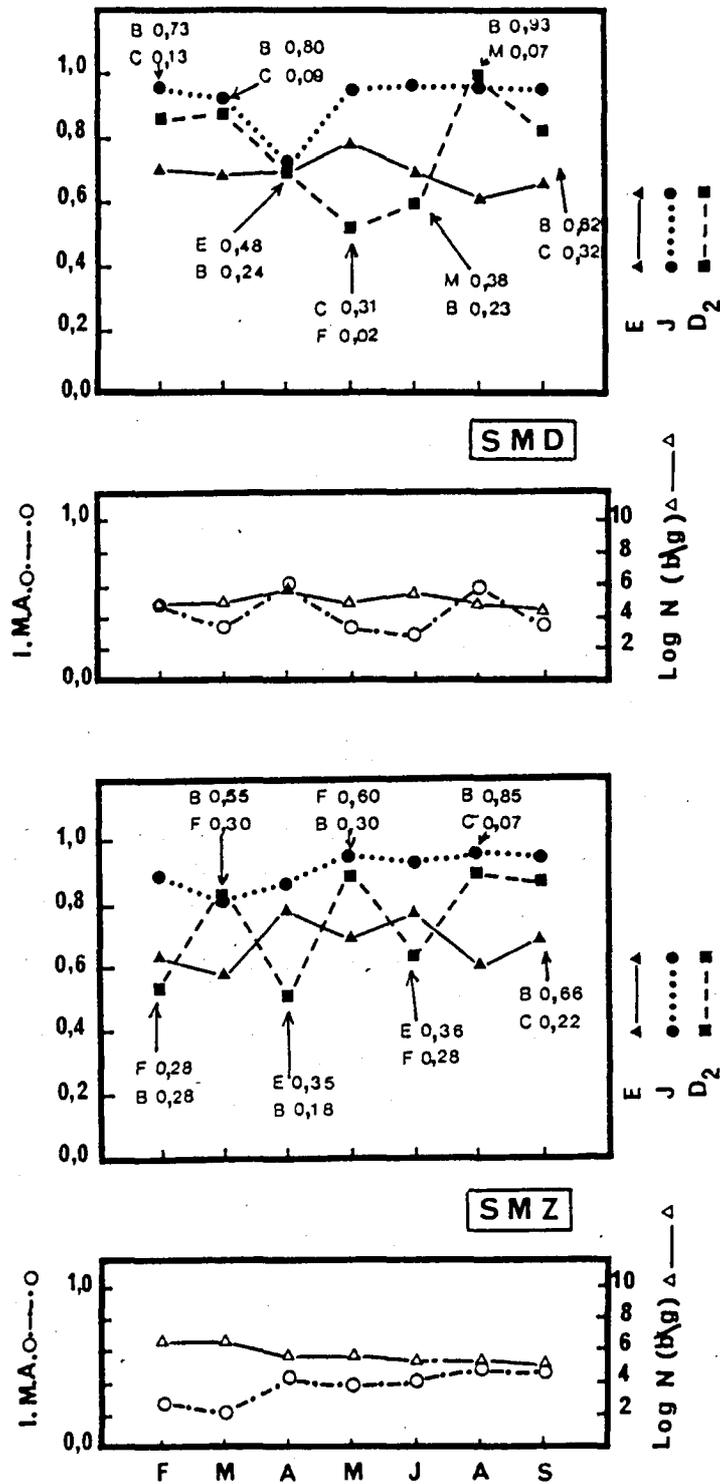


Fig. 8 - Paramètres de structure (E, J, D₂), de composition systématique (B : *Bacillus* ; C : groupe de coryneformes ; E : famille des *Enterobacteriaceae* ; F : *Flavobacterium* ; M : *Micrococcus*) d'abondance (log₁₀ N (bactéries/g) et d'activité métabolique potentielle (I.M.A.) calculés sur les échantillons de bactéries issus des sédiments de l'étang de l'Or. SMZ : milieu Bacto Marine Agar ; SMD : milieu Bacto Nutrient Agar.

BIBLIOGRAPHIE

- BALEUX, B., 1976 - Dégradation biologique des agents de surface, étude chimique et microbiologique. Thèse de Doctorat d'Etat ès-Sciences naturelles. Université de Montpellier, rég. C.N.R.S. 12384.
- BALEUX B. et BALEUX M., 1979 - Numération et approche qualitative des populations bactériennes des étangs languedociens (Prévost et Mauguio). I bactéries hétérotrophes aérobies et bactéries témoins de contamination fécale. C.R. scient. Action concertée D.G.R.S.T. "Etangs littoraux méditerranéens" Janvier 1979. Montpellier : 65-90.
- BIANCHI A., 1979 - Distribution quantitative et qualitative des populations bactériennes à l'interface eau-sédiment. Coll. internat. CNRS "Biogéochimie de la matière organique à l'interface eau-sédiment marin" Marseille, 25-27 avril 1979.
- BLONDEL J., 1979 - "Biogéographie et Ecologie". Masson, Paris.
- FENCHEL T.M. and JØRGENSEN B.B., 1977 - Détritit Food Chains of aquatic ecosystems : the role of bacteria, in "Advances in Microbial Ecology". 1. M. ALEXANDER Ed., Plenum Press New York.
- GOWER J.C., 1966 - Some distance properties of latent root and vector methods in multivariate analysis. Biometrika 53 : 325-338.
- KRUMBEIN W.E., 1978 - "Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology". volume 1 : The Aquatic Environment. W.E. KRUMBEIN Ed., Ann Arbor Science Publishers - Ann Arbor.
- MARTIN Y., 1980 - Communautés bactériennes hétérotrophes associées à des cultures continues de phytoplancton marin naturel. Vie marine hors série n° 1.
- NORKRANS B. and STHEN B.O., 1978 - Sediment Bacteria in the Deep Norwegian Sea. Mar. Biol. 47 : 201-209.
- RHEINHEIMER G., 1977 - "Microbial Ecology of a Brackish Water Environment". G. RHEINHEIMER Ed., Springer-Verlag Berlin.
- SIEBURTH J. Mc. N., 1976 - Bacterial substrates and productivity in marine ecosystems. Ann. Rev. Ecol. Syst. 7 : 259-285.
- SIMIDU U., KANEKO E. and TAGA N., 1977 - Microbiological Studies of Tokyo Bay. Microb. Ecol. 3 : 173-191.
- SNEATH P.H.A. and SOKAL R.R., 1973 - "Numerical Taxonomy. The principles and practice of numerical classification". W.H. Freeman Ed. San Francisco.
- SOKAL R.R. and MICHENER C.D., 1958 - A statistical method for evaluating systematic relationship. Univ. Kansas Sci. Bull. 38 : 1409-1438.
- TROUSSELLIER M., 1981 - Approche expérimentale et méthodologique pour l'étude des peuplements bactériens d'un milieu lagunaire atlantique (Domaine de Certes-Arcachon). Thèse 3ème cycle. Université des Sciences et Techniques. Montpellier.
- TROUSSELLIER M. et BALEUX B., 1981 - Approche méthodologique pour l'analyse des peuplements bactériens hétérotrophes des étangs littoraux. Acta Oecologica. Oecol. Gener. 2,1 : 63-74.
- TROUSSELLIER M. et LEGENDRE P., 1981 - A functional Evenness Index for Microbial Ecology. Microb. Ecol. 7 - sous presse.
- WILLIAMS W.T., LAMBERT J.M. and LANCE G.N., 1966 - Multivariate methods in plant ecology. V similarity analyses and information analysis. J. ecol. 54 : 427-445.