

ETUDE COMPARATIVE ENTRE LA MICROFLORE DE
L'APPAREIL DIGESTIF DE *TEREDO NAVALIS* L. (TEREDINIDAE-BIVALVIA)
ET LES POPULATIONS BACTERIENNES DE SON ENVIRONNEMENT

J.C. MARTINEZ

Laboratoire de Zoologie, Aquaculture et pollutions marines,
Faculté des Sciences et Techniques, 6 avenue Le Gorgeu, 29283 BREST CEDEX

SUMMARY

COMPARATIVE STUDY OF BACTERIAL POPULATIONS ISOLATED FROM THE DIGESTIVE-TRACT
OF *TEREDO NAVALIS* L. (TEREDINIDAE-BIVALVIA) AND THE SURROUNDING SEA WATER.

333 bacterial strains were isolated from the digestive tract of shipworms, their burrows and the surrounding sea water, using two culture media (2216E and T.C.B.S.). Samples were taken in the Bay of Brest in february, march and april 1980.

The bacterial isolates were described using 109 ecological, biochemical and nutritional tests in order to discuss the origin and function of the *Teredo navalis* L. gut microflora.

INTRODUCTION

Les tarets sont des Mollusques marins vivant dans les bois immergés où ils creusent leurs galeries. L'importance relative du bois et du plancton dans leur alimentation reste à préciser. Les études microbiologiques entreprises chez *Teredo navalis* L. ont montré l'existence de bactéries cellulolytiques dans le tractus digestif. Ceci tend à créditer une nutrition à base de bois, mais le phytoplancton peut être également dégradé par ces cellulases (Hidaka, 1953 ; Rosenberg et Breiter, 1969).

Aussi, il nous a paru intéressant de caractériser les bactéries du tractus digestif de ce mollusque et de les comparer avec celles des milieux marins environnants afin de tenter de préciser leur origine et leur rôle.

MATERIEL ET METHODES

Origine des microflores isolées :

Les *Teredo navalis* L. utilisés dans cette étude proviennent du Tinduff situé dans la rade de Brest. Trois prélèvements réalisés les 18.02.80, 19.03.80, 14.05.80 nous ont permis d'obtenir les différentes souches étudiées dans ce travail. Pour chacun de ces prélèvements, nous avons isolé les microflores de l'appareil digestif de deux tarets, de l'eau de mer contenue dans leurs galeries et celle du milieu extérieur.

Isolément des souches :

L'appareil digestif de ces mollusques est formé d'un oesophage, d'un estomac entouré de la glande digestive, d'un caecum et d'un intestin.

Après les avoir isolés par dissection, nous les avons broyés dans de l'eau de mer stérile. L'eau de mer de la galerie et celle du milieu extérieur sont prélevées directement en respectant les conditions d'aseptie.

Pour les ensemencements, nous avons utilisé deux milieux gélosés : le milieu 2216E (Oppenheimer et Zobell, 1952) et le milieu T.C.B.S. (Kobayashi *et al.*, 1963).

L'incubation a été réalisée à 20°C, température du laboratoire, et à l'obscurité pendant 8 jours. Par prélèvement sur chacun des milieux de culture, nous avons isolé 25 souches.

Techniques d'étude des bactéries :

109 tests (Prieur, 1976) ont permis de décrire les 333 souches isolées. Une eau de mer artificielle préparée selon la formule de Lyman et Fleming (1940) a été utilisée pour ces différents tests qui sont :

Tests morphologiques : morphologie cellulaire, mobilité et coloration de Gram. *Tests écologiques* : tolérance aux salinités (0, 40, 70 et 100‰) et croissance aux températures (5°C, 30°C, 37°C, 41°C) sur le milieu 2216E (Oppenheimer et Zobel, 1952). *Tests biochimiques* : recherche d'une catalase, recherche d'une oxydase, réduction des nitrates en nitrites, voie d'attaque du glucose, production d'indole à partir du tryptophane, production d'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine, recherche d'une protéase, d'une lipase, d'une uréase, d'une amylase, production de NH₃ à partir de peptone, utilisation du citrate, production d'acétoïne, réaction au rouge de méthyle, acidification du glucose, du mannitol, du sorbitol, de l'inositol, du saccharose et du lactose. *Tests nutritionnels* : nous avons étudié la possibilité de croissance sur 76 composés organiques (Prieur, 1976) fournis comme seule source de carbone et énergie, appartenant aux groupes suivants : sucres et dérivés, acides gras, acides dicarboxyliques, hydroxyacides, autres acides organiques, alcools, glycols, polyalcools, composés cycliques et aromatiques non azotés, acides aminés aliphatiques, acides aminés cycliques, amines et composés azotés divers.

RESULTATS

ETUDE COMPARATIVE DES TROIS MICROFLORES (Tableau I)

I - Résultats globaux par microflore et par milieu d'isolement

1° - Milieu d'isolement 2216E

La totalité des bactéries de l'appareil digestif et de la galerie sont des bâtonnets essentiellement Gram négatif (97 %). La proportion est de 98 % pour l'eau de mer, 2 % étant des cocci Gram positif.

Les 3/4 des bactéries des trois microflores nécessitent une concentration en chlorure de sodium de l'ordre de 40‰. Les souches se développent essentiellement à 5°C (78 %), le pourcentage est moindre à 30°C (68 %) et à 37°C (17 %).

Le nombre de bactéries possédant les exoenzymes étudiés est plus important dans l'appareil digestif que dans la galerie et l'eau de mer où il est plus variable, avec toutefois un pourcentage plus élevé en ce qui concerne la catalase et l'oxydase pour les souches isolées de la galerie. Celles réduisant les nitrates, produisant de l'indole et qui sont positives au teste du citrate, ont un pourcentage plus élevé dans l'appareil digestif que dans la galerie et que dans l'eau de mer. Les bactéries produisant de l'hydrogène sulfuré sont plus nombreuses dans la microflore de l'eau de mer (83 %) que dans celles de l'appareil digestif (70 %) et de la galerie (52 %). La fréquence d'utilisation des substrats est plus importante pour les bactéries de l'appareil digestif que pour celles de l'eau de mer. Elle est encore plus faible pour les bactéries de la galerie.

2° - Milieu d'isolement T.C.B.S.

Les microflores de l'appareil digestif et de la galerie sont constituées à 100 % de bâtonnets Gram négatif. Ce groupe ne constitue que 89 % de la microflore de l'eau de mer, relativement plus diversifiée, avec 9 % de cocci Gram négatif et 2 % de cocci Gram positif. Toutes les bactéries de la galerie se développent à une salinité de 40‰ en chlorure de sodium. Les pourcentages correspondants sont de 89 % pour celles de l'appareil digestif et de 53 % pour les bactéries de l'eau de mer. La fréquence de croissance optimale est obtenue à 5°C pour les trois microflores. Ainsi, 74 % des souches de l'appareil digestif, 100 % de celles de la galerie et 96 % de celles du milieu marin se développent à cette température.

Près des 3/4 des souches isolées de l'eau de mer font fermenter le glucose,

cette fonction est réalisée par toutes les souches isolées des galeries et par 97 % de celles du tractus digestif. La microflore de la galerie produit plus fréquemment les exoenzymes étudiés que celle de l'appareil digestif. Les bactéries de l'eau de mer en produisent encore moins. La galerie, l'appareil digestif et l'eau de mer présentent des proportions décroissantes de bactéries capables de réduire les nitrates, de produire de l'indole et de réagir positivement au test du citrate. Toutes les bactéries de l'eau de mer produisent de l'hydrogène sulfuré alors que seulement 82 % présentes dans l'appareil digestif et 78 % dans la galerie en sont capables.

Les possibilités d'utilisation des composés organiques par les bactéries de l'appareil digestif et de la galerie semblent identiques. Les bactéries de l'eau de mer ont une meilleure utilisation des acides gras, des acides dicarboxyliques, des alcools, des composés azotés.

II - Résultats par prélèvement, par microflore et par milieu d'isolement

1° Milieu d'isolement 2216E

Premier prélèvement :

La proportion de bâtonnets est de 100 % parmi les bactéries de l'appareil digestif et de la galerie ; elle est de 94 % dans l'eau de mer. Il y a 10 % de bactéries Gram positif dans l'appareil digestif et 5 % de cocci Gram positif dans l'eau de mer.

En présence de chlorure de sodium à 40‰, 30 % des souches de la galerie se développent. Ce pourcentage passe à 72 % pour celles de l'eau de mer et à 73 % pour les souches du tractus digestif. Toutes les bactéries de l'appareil digestif et de la galerie ont un développement à 30°C. Pour les bactéries de l'eau de mer, c'est à 5°C. Le pourcentage de souches fermentant le glucose est faible. Il est de 16 % pour l'eau de mer, de 5 % pour la galerie et nul pour l'appareil digestif. Les souches isolées de l'eau de mer produisent plus fréquemment des exoenzymes que celles isolées de la galerie, dépourvues de protéase et lipase. Le pourcentage de souches libérant de l'hydrogène sulfuré à partir de la cystéine est de 89 % pour l'eau de mer, de 58 % pour l'appareil digestif et de 20 % pour la galerie.

La versatilité nutritionnelle est légèrement meilleure pour la microflore du tractus digestif que pour celle du milieu marin. Elle est particulièrement limitée pour les bactéries de la galerie.

Deuxième prélèvement :

Les trois microflores sont constituées exclusivement de bâtonnets Gram négatif. Leurs fréquences de réponses positives sont optimales à 40‰ pour la salinité et à 5°C pour la température. Le pourcentage de bactéries fermentant le glucose est beaucoup plus important dans l'appareil digestif (100 %) et la galerie (87 %) que dans l'eau de mer (40 %). Il en est de même pour la fréquence de production des exoenzymes étudiés, pour la capacité de réduire les nitrates et pour la production d'indole. Inversement, c'est l'eau de mer qui présente la plus grande proportion de bactéries produisant de l'hydrogène sulfuré (80 %). La fréquence d'utilisation des composés organiques est plus grande pour la microflore de l'appareil digestif, plus faible pour celle de la galerie.

Troisième prélèvement :

Comme pour le prélèvement précédent, les trois microflores sont constituées exclusivement de bâtonnets Gram négatif.

En présence d'une concentration de chlorure de sodium à 40‰, 91 % des bactéries de l'appareil digestif, 89 % de celles de la galerie et 53 % des bactéries de l'eau de mer se développent. Le meilleur développement est obtenu à 5°C pour 91 % des bactéries de l'appareil digestif et 76 % de celles de l'eau de mer. Il se situe à 30°C pour 94 % des souches de la galerie.

Les pourcentages de bactéries fermentant le glucose vont en décroissant depuis l'appareil digestif (87 %) et la galerie (63 %) jusqu'à l'eau de mer (41 %). Il en est de même pour les bactéries productrices de lipase et amylase. Par contre ce taux est décroissant depuis le milieu marin et la galerie jusqu'à l'appareil digestif pour les bactéries productrices de catalase, oxydase ou protéase. Les pourcentages de bactéries réduisant les nitrates, produisant de l'indole, décroissent depuis l'appareil digestif jusqu'à l'eau de mer. Pour les trois microflores, la proportion de bactéries libérant de l'hydrogène sulfuré est supérieure à 80 %.

L'utilisation des composés organiques est variable. Les bactéries de l'appareil digestif utilisent mieux les acides dicarboxyliques et les alcools. Celles de la galerie dégradent mieux les acides organiques, les acides aminés aliphatiques, cycliques et les composés azotés. La microflore de l'eau de mer utilise mieux les sucres, les acides gras, les hydroxyacides.

2° Milieu d'isolement T.C.B.S.

Premier prélèvement :

Aucune bactérie n'a pu être isolée sur ce milieu pour l'appareil digestif et la galerie, ce qui est en accord avec le très faible pourcentage de souches fermentatives isolées pour ces échantillons sur le milieu 2216E.

Dans l'eau de mer, toutes les bactéries sont des bâtonnets Gram négatif et 87 % d'entre elles se développent en présence de chlorure de sodium. Le meilleur développement se situe à 5°C pour 93 % de ces souches. 60 % des bactéries fermentent le glucose. Les fréquences de production des exoenzymes étudiés sont élevées (70-80 %) sauf pour la lipase (53 %). La réduction du nitrate est réalisée par 93 % des souches ; l'hydrogène sulfuré est produit par la totalité des cultures étudiées.

Les taux d'utilisation des différents composés organiques varient entre 23 et 50 %. Les composés les plus fréquemment utilisés sont les hydroxy-acides, les acides organiques et les alcools.

Deuxième prélèvement :

Les bactéries isolées de l'appareil digestif et de la galerie sont toutes des bâtonnets Gram négatif. Dans l'eau de mer ce groupe est encore dominant (71 %), avec des cocci Gram négatif (24 %) et Gram positif (5 %). Les bactéries qui se développent à une salinité de 40 ‰ sont 100 % dans la galerie, 95 % dans l'appareil digestif et 81 % dans l'eau de mer. Le développement maximum est à 5°C (98 % des souches).

Toutes les bactéries isolées de l'appareil digestif et de la galerie sont fermentatives. Dans l'eau de mer, seulement 66 % sont de ce type. Les bactéries de la galerie produisent plus fréquemment les enzymes étudiés que celles de l'appareil digestif. La microflore de l'eau de mer en est encore bien moins pourvue, surtout en bactéries lipolytiques (33 %). Toutes les bactéries des trois microflores sont capables de réduire les nitrates. Toutes celles de l'appareil digestif et de la galerie produisent de l'indole. Toutes les souches de la galerie et 95 % de celles de l'appareil digestif réagissent positivement au test du citrate.

Le pourcentage de bactéries produisant de l'hydrogène sulfuré est de 100 % dans l'eau de mer, de 77 % dans l'appareil digestif et de 58 % dans la galerie.

Les fréquences d'utilisation des différents composés organiques sont plus élevées pour les souches isolées de l'eau de mer, à l'exception des acides organiques (62 %) et des acides aminés aliphatiques (37 %). Elles sont sensiblement identiques pour les microflores de l'appareil digestif et de la galerie.

Troisième prélèvement :

Les trois microflores sont constituées uniquement par des bâtonnets Gram négatif. 83 % des bactéries de l'appareil digestif et 100 % de celles de la galerie se développent en présence de chlorure de sodium à 40 ‰, contre 37 % des souches de l'eau de mer. C'est à 5°C que toutes les souches de la galerie, 94 % de celles de l'eau de mer et 54 % de celles de l'appareil digestif se développent.

Toutes les bactéries de la galerie sont fermentatives, dans l'appareil digestif et dans l'eau de mer, les pourcentages sont respectivement de 96 et 89 %. La microflore de la galerie produit plus fréquemment les exoenzymes étudiés, à l'exception des protéases plus souvent produites dans l'eau de mer (89 %). D'une manière générale, les souches isolées de l'eau de mer produisent plus fréquemment des exoenzymes que celles de l'appareil digestif, à l'exception des lipolytiques et amylolytiques. Toutes les bactéries de la galerie sont capables de réduire les nitrates et de produire de l'hydrogène sulfuré et de l'indole.

Pour l'utilisation des composés organiques, les pourcentages de bactéries utilisant les sucres, les acides gras, les acides dicarboxyliques, les alcools, les composés azotés sont plus grands dans l'eau de mer ; ceux concernant les acides organiques, les acides aminés aliphatiques, les acides aminés cycliques sont plus importants dans la galerie. Par contre, le plus fort pourcentage d'utilisation des hydroxyacides est obtenu avec les souches isolées de l'appareil digestif des tarets.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats exposés montrent que les caractéristiques des trois microflores peuvent varier selon leur nature, le milieu d'isolement et la période de leur prélèvement. Certaines d'entre elles sont communes et d'autres spécifiques. Nous pouvons les définir à partir de l'étude globale par milieu d'isolement et par microflore.

Les bactéries sont essentiellement des bâtonnets Gram négatif (97 %), et seule la microflore de l'eau de mer présente des cocci Gram positif ou négatif. Leur développement

optimum s'effectue en présence de chlorure de sodium à 40‰ et en général à une température de 5°C.

La microflore de l'appareil digestif possède le plus grand pourcentage de bactéries fermentant le glucose. Dans l'ensemble elle est la mieux pourvue en bactéries productrices de nitrate réductase, catalase, oxydase, lipase et amylase. Par ces caractères biochimiques, cette microflore de l'appareil digestif des tarets est plus proche de celle isolée de leurs galeries que de celle de l'eau de mer environnante.

Les résultats des testes nutritionnels sont moins significatifs. Pour les isolements effectués sur milieu 2216E, la versatilité nutritionnelle de la microflore isolée de l'appareil digestif est presque équivalente à celle de la microflore de l'eau de mer ; pour les bactéries isolées sur milieu T.C.B.S., elle est plus proche de celle originaire de la galerie.

Certains caractères des microflores varient en fonction du prélèvement. C'est le cas de la fermentation, généralement dominante dans la microflore des tractus digestifs par rapport à la respiration, et totalement absente dans le premier prélèvement.

Dans une même récolte, on note qu'il y a correspondance entre les trois microflores pour les pourcentages de réponses positives aux tests biochimiques et nutritionnels. Ainsi, au cours du premier prélèvement sur milieu 2216E, les résultats sont faibles pour les trois microflores.

Les résultats obtenus ne permettent qu'une approche des relations existant entre les trois microflores ; ils permettent toutefois d'envisager pour la microflore digestive une origine marine avec une sélection progressive des différents types de bactéries à partir de ce milieu (Prieur, 1980). Il semblerait que ce phénomène sélectif dépende des conditions physico-chimiques du milieu marin et de la physiologie du mollusque.

L'utilisation de la taxonomie numérique permettra de mieux définir les rapports entre les bactéries constituant les trois microflores étudiées.

RESUME

L'utilisation des deux milieux de culture (2216E et T.C.B.S.) a permis d'isoler 333 souches bactériennes provenant des appareils digestifs de tarets, des galeries servant d'habitat dans les bois et de l'eau de mer environnante. Les échantillonnages ont été réalisés dans la rade de Brest en trois périodes, de février à avril 1980. La description de ces souches par 109 caractères écologiques, biochimiques et nutritionnels, permet de définir les caractéristiques essentielles des constituants de chacune de ces microflores.

MOTS-CLES

Teredo navalis L., Bactéries, Appareil digestif.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons toute notre reconnaissance à D. Prieur, dont l'expérience et les conseils ont permis la réalisation de ce travail, et à A. Marhic pour son aide dévouée et efficace.

BIBLIOGRAPHIE

- HIDAKA T., 1953 - On the cellulose decomposing bacteria found in the digestive organs of *Teredo* (*Teredo navalis* sp.). *Mem. Fac. Fish., Kogoshima University*, 3 : 149-157.
- KOBAYASHI T., ENOMOTO S., SAKAZAKI R. and KUWAHARA S., 1963 - A new selective isolation medium for pathogenic vibrios T.C.B.S. Agar. *Japanese Journal of Bacteriology*, 18 : 387-391.
- LYMAN J. and FLEMING R.H., 1940 - Composition of sea water. *J. Mar. Res.*, 3 : 134-146.
- OPPENHEIMER C.H. and 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., 1976 - Etude de bactéries associées aux élevages de larves de Bivalves marins. *Aquaculture*, 8 : 225-240.
- PRIEUR D., 1980 - La microflore du tractus digestif des Bivalves marins : étude expérimentale chez la moule, *Mytilus edulis*. *Haliotis*, 10 : 119.
- ROSENBERG F.A. and BREITER H., 1969 - The role of cellulolytic bacteria in the digestive processes of the Shipworm. I. Isolation of some cellulolytic microorganisms from the digestive system of Teredine Borers and associated waters. *Material organism*, 4 : 147-159.