

ETUDE EXPERIMENTALE DE L'INSTALLATION
D'UNE MICROFLORE ASSOCIEE AU TRACTUS DIGESTIF
DE LA MOULE, *MYTILUS EDULIS* (L.)

Daniel PRIEUR

Laboratoire de Zoologie, Université de Bretagne Occidentale
6 avenue Le Gorgeu, 29283 BREST CEDEX - FRANCE -

SUMMARY

EXPERIMENTAL STUDY OF THE BACTERIAL COLONIZATION
OF THE GUT OF THE MUSSEL, *MYTILUS EDULIS* (L.)

The bacterial colonization of the digestive tract of *Mytilus edulis* was studied, in the laboratory, using juvenile mussels. For these experiments, six bacterial strains belonging to four different taxonomic groups, were selected from the author's bacterial collection. The results were obtained by examination of histological sections of mussels using both light and scanning electron microscopy.

All the selected strains were ingested by the mussels, and observed at different levels of the digestive tract as early as 15 minutes after the distribution of the bacterial suspension. Some strains were able to form microcolonies (5 to 10 μm in diameter) and this probably made easier the ingestion.

The bacterial cells were also agglomerated by the bivalve's mucus, and this could be observed particularly in the stomach. Three hours after the beginning of the ingestion, lysed bacterial cells were observed in the stomach. In the hind gut, filled immediately after the ingestion, undamaged bacterial cells were observed until 20 hours after starting the experiments. These last results were particularly clear for two strains identified as *Vibrio*. The slowness of the intestinal transit could explain the survival or the proliferation of some bacteria, particularly adapted to the gut environment.

INTRODUCTION

Les mollusques bivalves sont en règle générale des comestibles appréciés dans de nombreux pays. Aussi, n'est-il pas étonnant que l'essentiel des travaux de bactériologie qui leur ont été consacrés, ait eu pour but d'y rechercher des germes pathogènes de l'homme, et des indicateurs de pollution d'origine fécale.

Quelques auteurs cependant ont recherché chez certaines espèces une microflore associée. C'est en particulier le cas de Colwel et Liston (1960) chez *Crassostrea gigas*, Lovelace *et al.* (1968), Murchelano et Brown (1968) chez *Crassostrea virginica*, Brisou *et al.*, (1962), Chakroun (1964), Rottini *et al.*, (1973), Martin (1976) chez *Mytilus galloprovincialis*.

Bien que tous ces travaux ne puissent être rigoureusement comparés en raison de différences de méthodologie, ils mettent néanmoins en évidence l'importance dans ces microflores associées des bactéries appartenant au genre *Vibrio*. Prieur (1980a) confirme ces résultats chez *Mytilus edulis* et montre que les moules hébergent régulièrement une microflore plus riche en bactéries Gram négatif à métabolisme fermentatif (essentiellement du genre *Vibrio*) que l'eau de mer environnante. Ces résultats ont été obtenus chez des animaux adultes, et divers stades larvaires et postlarvaires. Une analyse détaillée en taxonomie numérique (Prieur, 1981) montre en outre que les souches de *Vibrio* isolées des mollusques et de l'eau de mer au cours d'un même échantillonnage ne diffèrent pas sensiblement.

Ce travail expérimental a été entrepris afin de préciser les modalités d'installation de cette microflore associée chez la moule, *Mytilus edulis*. Des observations en microscopie électronique à balayage et des analyses bactériologiques ayant permis d'éliminer l'hypothèse d'une transmission de cette microflore par les gamètes (Prieur, 1980a), les expérimentations ont été conçues pour répondre aux questions suivantes :

L'ingestion et/ou la digestion sont-elles sélectives ?

A quel niveau du tractus digestif peut-on observer des bactéries vivantes ?

MATERIEL ET METHODES

Les animaux utilisés sont de jeunes individus de *Mytilus edulis*, d'une longueur moyenne de 8 mm, récoltés en rade de Brest une semaine avant l'expérience et maintenus en état de jeûne dans une salle thermostatée à 12°C. L'eau de mer filtrée à 0,2 µm est renouvelée quotidiennement pendant ce jeûne. Chaque expérience est réalisée dans un béccher de 500 ml contenant 250 ml d'eau de mer fraîchement filtrée à 0,2 µm. Les jeunes moules y sont placées une heure avant la distribution de la suspension bactérienne.

Six souches bactériennes ont été sélectionnées dans une collection plus vaste (Prieur, 1981) pour réaliser ces expérimentations : souches ME 256, ME 283, ME 300 (identifiées au genre *Vibrio*), souche EM 556 (pseudomonade), souche ME 264 (Coque Gram positif, à métabolisme oxydatif, non identifiée), souche EM 142 (Bacille Gram positif, proche du genre *Kurthia*).

Toutes ces souches ont été maintenues en culture sur le milieu 2216E de Oppenheimer et Zobell (1952), et utilisées pour les expérimentations après 48 heures de culture sur boîte de Petri. Elles sont distribuées après la préparation suivante : suspension dense dans de l'eau de mer stérile, agitation, centrifugation 15 minutes à 3 000 r.p.m., rinçage à l'eau de mer stérile, nouvelle centrifugation, rinçage, reprise de la suspension dans de l'eau de mer stérile, agitation. Les suspensions sont alors distribuées de façon à obtenir dans les bécchers expérimentaux une concentration de 10⁷ cellules par ml.

Outre deux animaux témoins, prélevés avant la distribution de la suspension bactérienne, deux moules sont prélevées et fixées 1 heure, 3 heures, 6 heures et 20 heures après le début de l'expérience. Au cours d'une série expérimentale complémentaire utilisant la seule souche EM 142, les échantillons ont été fixés après 5, 15, 30 et 60 minutes d'expérimentation. Après fixation, les échantillons sont examinés en microscopie photonique et en microscopie électronique à balayage, selon la technique décrite par Prieur (1980b).

RESULTATS

- Le remplissage du tractus digestif :

Les premières phases de l'ingestion (5 minutes à 1 heure) ont été étudiées à l'aide de la souche EM 142 (Bacille Gram positif) facile à repérer sur les coupes histologiques après coloration de Gram. Le remplissage du tractus digestif est très rapide : cinq minutes après la distribution de la suspension bactérienne, des bactéries sont observées dans l'oesophage, l'estomac, et le début de l'intestin moyen. Dix minutes plus tard, l'estomac tubulaire, les diverticules digestifs et l'intestin postérieur contiennent également des bactéries, tandis que l'ingestion continue, A tous ces niveaux, malgré la présence de mucus qui englobe les particules alimentaires, principalement dans la partie antérieure du tractus digestif, on reconnaît nettement des cellules bactériennes intactes, en microscopie électronique à balayage. Cette technique permet également d'observer des bactéries intactes qui forment une couche épaisse à la surface de la tige cristalline et parfois même à l'intérieur de celle-ci.

Cette ingestion est vraisemblablement facilitée par le fait que certaines souches forment des micro-colonies d'un diamètre de 5 à 10 microns. Le mucus sécrété par les bivalves agglomère les bactéries en amas très denses que l'on peut observer en particulier au niveau de l'estomac.

- Ingestion des différentes souches bactériennes :

L'examen des animaux témoins, fixés avant la distribution des suspensions bactériennes, montre que les tractus digestifs sont vides, ou ne contiennent pas d'éléments identifiables à des bactéries. Les six souches bactériennes distribuées ont été retrouvées dans le tractus digestif des moules. Un léger doute pouvait en effet exister dans le cas des souches Gram négatif, normalement abondantes dans l'eau de mer. Par contre, le fait de retrouver dans les animaux étudiés des souches aussi peu abondantes dans l'eau de mer naturelle que des bacilles et coques Gram positif (souches ME 264 et EM 142) (photos 2 et 3), permet d'affirmer que ce sont bien les bactéries distribuées qui ont été observées.

- Etat des bactéries observées dans le tractus digestif :

La souche ME 300 est apparue plusieurs fois sous forme de petites colonies d'un diamètre de l'ordre de 5 à 15 μm (photo 1). Mais dans la plupart des cas, les bactéries sont régulièrement enrobées de mucus, au point de rendre la reconnaissance de la morphologie cellulaire assez difficile. Dans tous les cas, le bol alimentaire se présente comme un amas très dense qui occupe la lumière du conduit digestif, mais certaines cellules bactériennes sont observées au contact des cils de la paroi de l'estomac ou de l'intestin.

Après l'observation de cellules intactes, une heure après l'ingestion, des cellules en cours de lyse ont été recherchées dans les prélèvements ultérieurs. Cette recherche a été délicate, car s'il est assez facile de reconnaître une bactérie intacte au microscope électronique à balayage, il est plus difficile de distinguer une cellule lysée d'un débris amorphe. Seules les observations au cours desquelles on pouvait reconnaître des cellules intactes, cotoyant des formes altérées de taille et morphologie comparables, ont été retenues. Pour cinq des six souches bactériennes utilisées, des cellules en cours de lyse ont été observées au niveau de l'estomac, 3 heures, 6 heures et 20 heures après l'ingestion (photo 4). Pour la sixième souche (ME 264) aucune observation semblable n'a été possible, en raison d'incidents survenus aux coupes histologiques. Toutefois, dans l'intestin, 20 heures après l'ingestion, figurent des débris qui peuvent résulter de la digestion des bactéries.

- Le séjour des bactéries dans l'intestin :

Dans les premières phases de l'ingestion, l'intestin postérieur contient des particules alimentaires. Une heure après l'ingestion, des cellules bien distinctes et intactes sont observées dans l'intestin postérieur pour toutes les souches, sauf la souche EM 556. Pour les prélèvements réalisés trois heures après l'ingestion, et au-delà, les résultats varient selon les souches bactériennes utilisées. Pour la souche ME 256, trois heures après le début de l'ingestion, l'oesophage, l'estomac et l'intestin moyen sont vides, ou contiennent des cellules en cours de digestion. Dans l'intestin postérieur, on peut reconnaître des cellules intactes. Au-delà de 3 heures, le tube digestif ne contient que des débris méconnaissables. Les observations sont identiques pour les souches ME 264 et EM 142. Pour les souches ME 300 et ME 283 (photos 5 et 6), de 3 heures à 20 heures après l'ingestion, l'intestin postérieur contient des cellules intactes tandis que les autres parties du tractus

digestif ne contiennent que des débris. Ces derniers pouvant être dûs à une seconde ingestion de bactéries, une expérience complémentaire a été réalisée. Trois heures après la distribution de la suspension bactérienne, les moules sont placées dans un autre récipient ne contenant que de l'eau de mer récemment filtrée. On constate également chez ces animaux que, 19 heures après le changement d'eau, l'intestin postérieur est la seule partie du tractus digestif contenant encore des cellules bactériennes intactes. Des débris seulement sont observés dans l'estomac.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Toutes les souches utilisées, appartenant à divers groupes taxonomiques, ont été ingérées et digérées par les mollusques. Une ingestion ou une digestion sélective ne semble donc pas pouvoir expliquer la présence des *Vibrio* dans le tractus digestif (Prieur, 1980a). Par contre, un fait marquant est l'observation dans l'intestin postérieur, de 6 à 20 heures après l'ingestion, de bactéries intactes, observations particulièrement nettes pour deux souches appartenant au genre *Vibrio*.

Cabelli et Heffernan (1970 ; 1971) ont expérimenté sur l'accumulation et l'élimination de bactéries coliformes sur *Mercenaria mercenaria* et *Mya arenaria*. La contamination maximale est obtenue six heures après le début de l'expérience. Avec des résultats variables selon les espèces et les individus, la dépuración complète est obtenue en 48 à 72 heures. Ce résultat est identique à celui cité par Allen (1962) : après ingestion de *Phaeodactylum tricornutum*, *Venus striatula* et *Mercenaria mercenaria* éliminent la plus grande partie des fèces en trois jours.

L'étude des rythmes de digestion chez les bivalves est également intéressante. Pour Langton et Gabbott (1974) *Ostrea edulis*, originaire de peuplements exondables, présente un rythme tidal de digestion extracellulaire. Langton (1977) observe un rythme identique chez *Mytilus edulis*. Morton (1977) décrit également un rythme tidal d'alimentation et de digestion chez *Crassostrea gigas*. Chez *Pecten maximum*, espèce toujours immergée, Mathers (1976) montre un cycle de digestion de 24 heures.

Dans tous les cas rapportés ici, la digestion demande au moins 6 heures, tandis que l'élimination des déchets peut nécessiter 2 à 3 jours. Dans ces conditions, les bactéries viables qui ont été observées dans l'intestin postérieur des bivalves, peuvent se multiplier pour peu que l'environnement leur soit favorable.

Parmi les facteurs qui régissent la vie microbienne dans le tractus digestif, l'anaérobiose, probable, joue en faveur des bactéries vibrioïdes. Un autre facteur important est le pH. Selon Mathers (1974) le pH peut varier de 6,2 à 6,5 dans le rectum d'*Ostrea edulis* et de *Crassostrea angulata*. Les conditions de milieu, bien plus acides que l'eau de mer, conviennent aux bactéries vibrioïdes. Gilmour *et al.* (1976) ont recherché le pH optimal des milieux de culture destinés à l'isolement des *Vibrio*. Ils rapportent les travaux de Sera *et al.* (1972) qui ont montré que les *Vibrio* peuvent se développer à pH 5 dans le tube digestif de poissons, et attribuent à ce facteur un rôle dans la sélection de la microflore. Cette hypothèse est renforcée par la proposition inverse de Scholes et Shewan (1964) selon laquelle l'augmentation du pH favorise plutôt le développement des *Pseudomonas*.

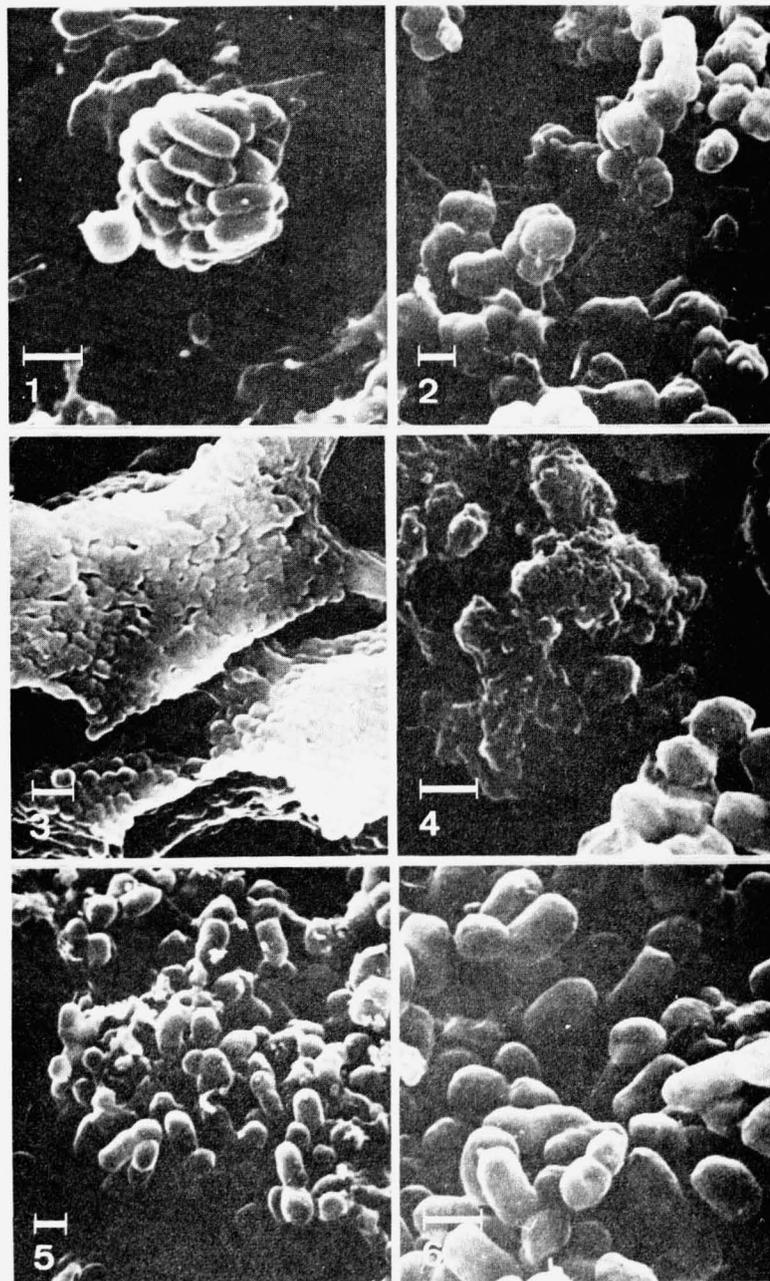
La microflore du tractus digestif des bivalves marins serait donc due à la conjonction de plusieurs facteurs : présence de bactéries vibrioïdes dans l'eau de mer ; lent transit dans l'intestin postérieur de bivalve (6 à 48 heures) ; existence dans ce tractus de conditions favorisant le développement des germes à métabolisme fermentatif.

RESUME

Les modalités d'acquisition de la microflore associée au tractus digestif de bivalves marins a été étudiée expérimentalement chez des juvéniles de *Mytilus edulis*.

Les tractus digestifs ont été examinés sur coupes histologiques, en microscopie électronique à balayage, selon une technique originale. Six souches bactériennes appartenant à quatre groupes taxonomiques différents ont été utilisés pour les expérimentations.

Toutes ces souches ont été ingérées par les mollusques et observées à différents niveaux du tractus digestif. Le remplissage du tractus est très rapide, et, quinze minutes après la distribution de la suspension bactérienne, les bactéries sont observées dans l'oesophage, l'estomac, le caecum du stylet, la glande digestive, l'intestin moyen et l'intestin postérieur.



- 1) - Souche ME 300 - Formation de microcolonies au niveau de l'estomac.
- 2) - Souche ME 264 - Observation au niveau de l'estomac une heure après le début de l'ingestion.
- 3) - Souche EM 142 - Observation entre l'estomac tubulaire et l'intestin moyen quinze minutes après le début de l'ingestion.
- 4) - Souche ME 256 - Observation de cellules lysées, au voisinage de cellules intactes, au niveau de l'estomac.
- 5) - Souche ME 283 - Observation de cellules intactes au niveau de l'intestin postérieur une heure après le début de l'ingestion.
- 6) - Souche ME 283 - Observation de cellules intactes au niveau de l'intestin postérieur six heures après le début de l'ingestion.

Echelle des photographies : le trait représente 1 µm.

Trois heures après le début de l'ingestion, des bactéries lysées sont observées au niveau de l'estomac, pour toutes les souches bactériennes utilisées.

Dans l'intestin postérieur, rempli dès le début de l'ingestion, des cellules intactes sont observées, six heures et 20 heures plus tard. Ces résultats sont particulièrement nets pour deux souches de *Vibrio* utilisées. Des expérimentations complémentaires ont montré que le séjour du bol alimentaire dans l'intestin pouvait durer au moins 20 heures.

Les souches bactériennes n'étant pas sélectionnées par les bivalves, ni digérées différemment, la lenteur du transit intestinal pourrait expliquer la dominance dans la microflore associée aux mollusques, de bactéries particulièrement adaptées à un tel milieu, comme le sont les *Vibrio*.

MOTS CLES

Mytilus edulis - Moules - Microflore du tube digestif - Microscopie électronique à balayage.

BIBLIOGRAPHIE :

- ALLEN J.A., 1962 - Preliminary experiments on the feeding and excretion of bivalves using *Phaeodactylum* labelled with ^{32}P . *J. mar. biol. Ass. U.K.*, 42 : 609-623.
- BRISOU J., TYSSET C., MAILLOUX M. et ESPINASSE S., 1962 - Recherches sur les vibrions marins. A propos de 44 souches isolées de Moules (*Mytilus galloprovincialis*) du littoral algérois. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 55 : 260-275.
- CABELLI V.J. and HEFFERNAN W.P., 1970 - Accumulation of *Escherichia coli* by the Northern Quahaug. *Applied Microbiology*, 19 (2) : 239-244.
- CABELLI V.J. and HEFFERNAN W.P., 1971 - Seasonal factors relevant to coliform levels in the Norther Quahaug. *Proc. natl. Shellfish. Ass.*, 61 : 95-101.
- CHAKROUN F., 1964 - Contribution à l'étude des microflores bactériennes de la Moule *Mytilus galloprovincialis* Lamarck. Thèse 3e cycle, *Océanogr. biol.*, Paris : 110 p.
- COLWELL R.R. and LISTON J., 1960 - Microbiology of Shellfish. Bacteriological study of the natural flora of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Appl. Microbiol.*, 8 : 104-109.
- GILMOUR A., ALLAN M.C. and Mc CALLUM M.F., 1976 - The insuitability of high pH media for the selection of marine *Vibrio* species. *Aquaculture*, 7 : 81-87.
- LANGTON R.W., 1977 - Digestive rythms in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 41 (1) : 53-58.
- LANGTON R.W. and GABBOT P.A., 1974 - The tidal rythm of extracellular digestion and the response to feeding the *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.*, 24 (2) : 181-187.
- LOVELACE T.E., TUBIASH H. and COLWELL R., 1968 - Quantitative and qualitative commensal bacterial flora of *Crassostrea virginica* in Chesapeake Bay. *Proc. natl. Shellfish. Assoc.*, 58 : 82-87.
- MARTIN Y., 1976 - Importance des bactéries chez les mollusques bivalves. *Haliotis*, 7 : 97-103.
- MATHERS N.F., 1974 - Digestion and pH variation in two species of oysters. *Proc. Malac. Soc. Lond.*, 41 (1) : 37-40.
- MATHERS N.F., 1976 - The effects of tidal currents on the rythm of feeding and digestion in *Pecten maximus* L. *J. exp. mar. biol. Ecol.*, 24 : 271-283.
- MORTON B.S., 1977 - The tidal rythms of feeding and digestion in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. exp. mar. biol. Ecol.*, 26 : 135-151.
- MURCHELANO R.A. and BROWN C., 1968 - Bacteriological study of natural flora of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invest. Pathol.*, 11 (3) : 520-521.
- 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., 1980a - La microflore du tractus digestif des Bivalves marins : étude expérimentale chez la moule, *Mytilus edulis*. 7e Congr. int. Malacologie, Perpignan 1980, *Malacologia*, sous presse.
- PRIEUR D., 1980b - Observations de coupes histologiques en microscopie électronique à balayage : application à l'étude de microorganismes dans le tractus digestif de *Mytilus edulis*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, T 290, Sér. D : 1087-1089.
- PRIEUR D., 1981 - Les relations entre mollusques bivalves et bactéries hétérotrophes en milieu marin. Etude analytique et expérimentale. Thèse Doct. Etat, Sc. Nat., Brest : 266 p.

ROTTINI G., SCHREIBER F. and JAMARD M., 1973 - Biochemical and antigenic characteristics of halophilic sea vibrios in the Gulf of Trieste. *Zbl. Bakteriol. Parasitenkde Infekthrankh. Hyg.*, 128 (3-4) : 412-422.

SCHOLES R.B. and SHEWAN J.M., 1964 - The present state of some aspects of marine microbiology. *Adv. mar. Biol.*, 2 : 133-169.

SERA H., ISHIDA Y. and KADOTA H., 1972 - Bacterial flora in the digestive tracts of marine fish. IV. - Effect of H^+ concentration and gastric juices on the indigenous bacteria. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 38 : 859-863.