

ACCUMULATION DU CADMIUM PAR MYTILUS EDULIS EN PRESENCE DE BACTERIES
MARINES SENSIBLES OU RESISTANTES A CE METAL

Gilles N. FLATAU et Michel J. GAUTHIER
I.N.S.E.R.M. U.40 ; 1, avenue Jean Lorrain 06300 NICE

SUMMARY

CADMIUM ACCUMULATION BY MYTILUS EDULIS IN THE PRESENCE OF CADMIUM
SENSITIVE OR RESISTANT MARINE BACTERIA

The cadmium accumulation by the soft parts of the mussels increased in the presence of the sensitive strain, and was lower in the presence of the resistant strain, when only ionic metal was given to the mussels. The metal brought by previously contaminated and killed bacteria was more accumulated by the different organs than when it was provided in the ionic form, and was more accumulated by viscera and gills when it was bound to the resistant bacteria.

INTRODUCTION

Les modifications de l'accumulation des métaux lourds (comme le mercure ou le cadmium) par certains invertébrés marins provoquées par les complexants naturels ou artificiels rejetés en mer ont déjà été étudiées. Ainsi certains chélatants diminuent l'accumulation du cadmium chez le barnacle *Semibalanus balanoides* (Rainbow et al., 1980), et l'augmentent chez *Mytilus edulis* (George et Coombs, 1977).

Les bactéries marines peuvent être, dans une certaine mesure assimilées à des agents chélatants complexes. Capables d'accumuler le mercure (Austin et coll., 1977), ou le cadmium (Gauthier et Flatau, 1977, 1980) elles peuvent modifier la forme physicochimique des métaux en libérant des formes alkylées (Olson et Cooper, 1973) plus dangereuses car plus assimilables par la faune marine (Fowler et coll., 1978). Selon Sayler et coll. (1975), le mercure ionique est plus accumulé par *Crassostrea virginica* en présence de certaines bactéries appartenant au genre *Pseudomonas* fixant ou réduisant ce métal. Le rôle joué par les bactéries au cours des phénomènes d'accumulation apparaît comme très important.

Ce travail avait pour but l'étude de l'accumulation du cadmium par *Mytilus edulis* en présence de deux souches bactériennes hétérotrophes, l'une sensible, l'autre résistante à ce métal et selon que celui-ci était injecté sous forme soluble ou préalablement incorporé par ces micro-organismes.

MATERIEL ET METHODES

Isolement et propriétés des souches bactériennes

La souche résistante (R) a été isolée d'un sédiment très contaminé dans la Baie des Anges, (Nice). La souche sensible (S) provenait d'un sédiment peu contaminé prélevé dans la rade de Villefranche-sur-Mer. Ces deux bactéries ont été isolées en cultures pures par trois repiquages alternés sur milieu Marine Agar (MA) (Difco) et en bouillon Marine Broth (MB) (Difco). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) du cadmium ($CdCl_2 \cdot 2,5 H_2O$), déterminées par la méthode de dilution en milieu liquide (Chabbert, 1963) ont été respectivement de 0,8 mg/l et 20 mg/l pour la souche S et la souche R.

Leurs principaux caractères morphologiques, culturels et physiologiques déterminés selon diverses techniques décrites par ailleurs (Gauthier, 1976) montrent qu'elles appartiennent aux genres *Pseudomonas* ou *Alteromonas* (Gibson et al., 1977)

Culture en masse des souches bactériennes

Elle a été obtenue sur milieu solide (Marine Agar) : les cellules ont été récoltées à la surface de ce milieu après 48 heures d'incubation à 22°C, puis congelées (-30°C) et lyophilisées. La même technique a été utilisée pour produire des cellules S ou R contaminées par le cadmium, en incorporant 1 mg (S) ou 10 mg (R) de cadmium (chlorure) par litre de milieu gélosé. Un test de viabilité a été réalisé sur ces souches lyophilisées, par remise en suspension en eau de mer, étalement sur milieu MA et MB et culture pendant 72h à 23°C.

Intoxication des moules

Les moules (5 à 6 cm de long, 20 à 35g) ont été collectées dans le port de Nice, puis mises en stabulation pendant une semaine avant chaque expérimentation. Les intoxications ont été réalisées dans des bacs en verre contenant 10 l d'eau de mer naturelle et 50 moules, à l'ombre et à une température moyenne de 15°C.

Intoxication par CdCl₂ et bactéries marines

Tous les jours pendant 11 jours, l'eau des bacs a été renouvelée puis additionnée de cadmium (1 mg/l, sous forme de chlorure) et de bactéries (1×10^5 à 3×10^5 cellules S/ml ou 3×10^5 à 5×10^5 cellules R/ml). Un bac témoin n'a reçu que le cadmium. Lors de chaque prélèvement, effectué avant l'injection de cadmium et des bactéries (2°, 4°, 6°, 9° et 11° jour), quatre moules ont été disséquées pour étudier la répartition du métal dans les viscères, les branchies, le manteau et le muscle adducteur postérieur, et quatre autres ont servi à la détermination du cadmium dans la chair totale. La coquille n'a pas été analysée.

Intoxication par les bactéries S et R cultivées sur milieu cadmié

Tous les jours pendant 18 jours, après renouvellement de l'eau de mer, une masse connue de bactéries S et R préalablement cultivées sur milieu cadmié et lyophilisées (quantité correspondant à un apport de 20 µg Cd/l) a été ajoutée à chaque bac après réhydratation dans 10 ml d'eau de mer. Afin de fournir aux animaux la même masse de bactéries R ou S (environ 0,4 g de cellules lyophilisées), une quantité complémentaire (environ 0,2 g) de bactéries R non contaminées par le cadmium a dû être ajoutée dans le bac correspondant. Les prélèvements ont été effectués tous les deux jours pendant 18 jours avant le renouvellement de l'eau et l'injection de bactéries.

Accumulation du cadmium par les souches R et S

Environ $2 \cdot 10^{11}$ cellules de la souche R ou S ont été mises en suspension dans 2 l d'eau de mer contenant 1 mg Cd/l (chlorure). Après 0, 2, 5, 9, 13, 19 et 24 h, 250 ml de suspension ont été centrifugés (18000 rpm, 20n, 10°C) ; les culots cellulaires ont été rincés à l'eau de mer et centrifugés deux fois dans les mêmes conditions, puis congelés et lyophilisés avant analyse.

Dosage du cadmium

Les moules, comme les cellules bactériennes lyophilisées, ont été minéralisées en milieu nitroperchlorique à chaud (120°C) pendant 48 h ; les dosages de cadmium ont été réalisés par redissolution anodique (ESA 2011) ou par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer 290B équipé d'un bruleur air-acétylène). Les facteurs d'accumulation du métal par les moules ou les bactéries ont été exprimés par le rapport : concentration Cd dans l'organe/concentration Cd dans le milieu.

Traitement statistique des résultats

L'analyse de la variance des résultats a été réalisée sur calculatrice Olivetti P652.

Les données brutes concernant les moules proviennent de l'analyse chimique de quatre organes ou organismes. Les données concernant les deux souches bactériennes proviennent de trois expérimentations successives. L'analyse de la variance a porté sur le logarithme des concentrations en métal dans les moules afin de stabiliser la variance.

RESULTATS

La souche S a accumulé environ 16 fois plus de cadmium que la souche R après 19 heures d'incubation, ce qui met en évidence une différence de comportement de ces deux bactéries en présence de ce métal (fig. n° 1).

Les différences d'accumulation du cadmium par les moules en présence des bactéries R ou S n'ont été significatives que dans le cas de la chair totale lorsque le métal était apporté par l'eau (tableau n°1) et les viscères et les branchies lorsque le métal était fourni par les bactéries (tableaux n° 2 et 3). Dans les cas significatifs les droites d'accumulation ont été tracées en utilisant la méthode des moindres carrés (Fig. n° 3 et 3). Le tableau n° 4 regroupe les facteurs d'accumulation après 10 Jours de traitement.

Dans les cas analysés, l'ordre d'accumulation par les différents organes de moules examinés a été le suivant :

viscères > branchies > manteau

Quand le cadmium était fourni par les bactéries (S ou R), le facteur d'accumulation était entre 5 et 9 fois plus important suivant l'organe, que lors de l'intoxication par le métal ionique. De plus, en présence de bactéries contaminées, l'accumulation avait une allure exponentielle (Fig. n° 3 et 4).

Le cadmium fourni par les bactéries R était plus rapidement accumulé par les branchies et les viscères que le cadmium apporté par la souche S (Fig. n° 3 et 4). Par contre, quand le métal a été fourni sous forme ionique par l'eau, il a été moins accumulé par la chair totale en présence de la souche R (Fig. n°2)

DISCUSSION

Contrairement à d'autres bactéries dont la résistance au cadmium s'accompagne d'une forte accumulation intra cellulaire du métal (Horitsu et coll., 1979), la résistance de la souche R (Fig. n° 1) se traduit par une diminution de cette accumulation, ce qui suggère l'existence chez cette bactérie, d'une barrière empêchant la pénétration du métal dans la cellule, phénomène décrit antérieurement par Tynecka *et al.*, (1975) chez *Staphylococcus aureus*. Cette souche fixe cependant une faible quantité de cadmium, vraisemblablement lié à la paroi cellulaire par des liaisons ioniques.

Quel que soit le mode d'intoxication, la variation de l'accumulation du métal suivant les organes examinés correspond à celle observée antérieurement pour le cadmium (ionique ou complexé) chez *Mytilus edulis* (George et Coombs, 1977), et pour le mercure ionique (injecté seul ou en présence de Pseudomonadacées accumulant ou réduisant le mercure) chez *Crassostrea virginica* (Sayler *et al.*, 1975). Par contre, alors que dans le cas du mercure l'accumulation dans tous les organes était augmentée en présence de bactéries marines (Sayler *et al.*, 1975), dans le cas du cadmium, l'accumulation dépendait de la souche bactérienne associée.

La suspension bactérienne étant homogène dans les bacs, on peut estimer que la répartition du métal l'était aussi. La source alimentaire du cadmium était donc plus importante que la source "eau" puisque les facteurs d'accumulation ont été beaucoup plus importants quand le métal était apporté exclusivement par les micro-organismes. Ceci provient vraisemblablement de l'importante capacité de filtration des moules, ainsi que la rapidité à laquelle peuvent apparaître et transiter les bactéries ingérées dans le tractus digestif (Prieur, 1981). L'estomac et l'intestin moyen se vident graduellement entre 9 et 20 heures après l'ingestion, mais dans l'intestin postérieur peuvent encore se trouver des cellules intactes (Prieur, 1981). L'accumulation plus rapide en présence de la souche résistante surtout dans les viscères pourrait être due au fait que le métal, fixé de manière plus labile sur la paroi cellulaire de la bactérie, était plus disponible que lorsqu'il pénétrait à l'intérieur du corps cellulaire, et pouvait être libéré plus facilement dans les conditions particulières du milieu gastrique ou intestinal.

En présence de cadmium ionique par contre, l'accumulation du métal par la moule a été accélérée en présence de la souche S, celle-ci fixant plus rapidement le métal que la souche R. En fait dans ce cas, l'apport de cadmium aux moules était mixte puisque associé à la fois à l'eau et à une fraction des aliments.

Les résultats obtenus au cours de ce travail montrent donc que la réaction des organismes marins en présence de polluants métalliques peut varier significativement selon la nature de la microflore associée, et que les propriétés de ces micro-organismes vis-à-vis des métaux peuvent conditionner le devenir de ceux-ci dans les chaînes alimentaires.

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'un contrat de recherche libre de l'I.N.S.E.R.M. n° 78.5.114.8.

RESUME

L'accumulation du cadmium par les branchies les viscères et le manteau de *Mytilus edulis* en présence de bactéries marines résistantes ou sensibles à ce métal, a été étudiée. Le cadmium ionique était plus accumulé par la chair totale en présence de la souche sensible, qu'en présence de la souche résistante. L'accumulation du cadmium fourni par les souches préalablement cultivées sur milieu cadmié puis tuées était plus importante que celle du cadmium ionique. Le métal lié à la souche résistante était plus accumulé par les viscères et les branchies que celui lié à la souche sensible.

MOTS CLES

Cadmium, accumulation, moule, bactéries marines, résistance.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur J. Ph Breittmayer pour le traitement mathématique des résultats.

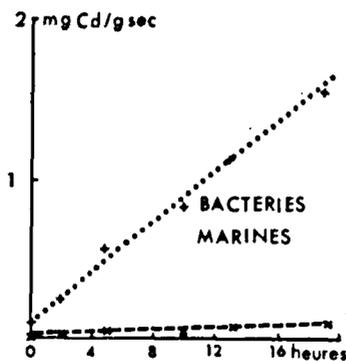


Fig. n° 1

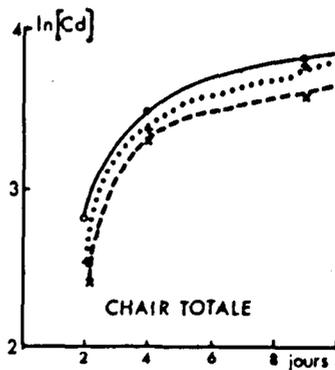


Fig. n° 2

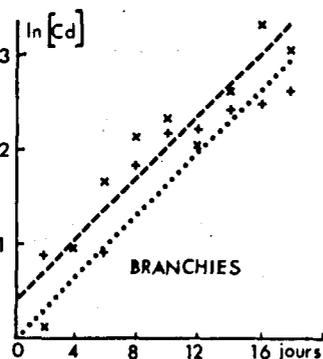


Fig. n° 3

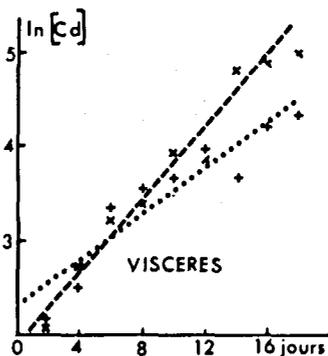


Fig. n° 4

Fig. n° 1 : Accumulation du cadmium en fonction du temps par la souche R (x---x---x) et la souche S (+.....+.....+)
 $Cd_R = 0,004x + 0,011$; $r = 0,932$. $Cd_S = 0,077x + 0,11$; $r = 0,998$.

Fig. n° 2 : Logarithme népérien de la concentration en cadmium dans la chair totale des moules au cours du temps : Cd seul (o---o---o), Cd et souche S (+.....+.....+), ou souche R (x---x---x).

Fig. n° 3 : Logarithme népérien de la concentration en cadmium dans les branchies des moules au cours du temps : Cd fourni par la souche R (x---x---x), ou par la souche S (+.....+.....+).
 $\ln Cd_R = 0,172x + 0,325$; $r = 0,93$. $\ln Cd_S = 0,175x - 0,072$; $r = 0,85$.

Fig. n° 4 : Logarithme népérien de la concentration en cadmium dans les viscères des moules au cours du temps : Cd fourni par la souche R (x---x---x), ou par la souche S (+.....+.....+).
 $\ln Cd_R = 0,178x + 1,95$; $r = 0,98$ $\ln Cd_S = 0,113x + 2,31$; $r = 0,92$.

Sources de variations	Carré moyen	Degrés de liberté	F	Niveau de signification
Entre cases	1,400	11		
Ecart à la linéarité	0,261	6	3,95	1 %
Parallélisme	0,059	2	0,89	NS
Pente	12,76	1	193	1 %
Traitement	0,476	2	7,21	1 %
Résiduelle	0,066	36		
Totale	0,378	47		

Tableau n° 1. Analyse de la variance des logarithmes des concentrations en cadmium dans la chair totale des moules ; le métal a été apporté par l'eau, en présence de bactéries R ou S non contaminées. Les résultats du jour n° 6 étant aberrants n'ont pas été inclus dans l'analyse.

NS = non significatif

Sources de variations	Carré moyen	Degrés de liberté	F	Niveau de signification
Entre cases	2,811	17		
Ecart à la linéarité	0,238	14	1,31	NS
Parallélisme	2,080	1	11,43	1 %
Pente	40,763	1	224	1 %
Traitement	1,617	1	8,88	1 %
Résiduelle	0,182	54		
Totale	0,812	71		

Tableau n° 2. Analyse de la variance des logarithmes des concentrations en cadmium dans les viscères des moules ; le métal a été apporté par les bactéries R ou S préalablement contaminées.

NS = non significatif

Sources de variations	Carré moyen	Degrés de liberté	F	Niveau de signification
Entre cases	4,454	17		
Ecart à la linéarité	1,075	14	1,787	NS
Parallélisme	0,007	1	0,011	NS
Pente	58,2692	1	96,87	1 %
Traitement	2,387	1	3,968	6 %
Résiduelle	0,601	54		
Totale	1,524	71		

Tableau n° 3. Analyse de la variance des logarithmes des concentrations en cadmium dans les branchies des moules ; le métal a été apporté par les bactéries R ou S préalablement contaminées.

NS = non significatif

Organes	Cd lié aux bactéries R ou S	Cd ionique + bactéries non contaminées R ou S
Viscères	1500	170
Branchies	500	60
Manteau	250	50
Chair totale	-	60
Muscle adducteur postérieur		30

Tableau n° 4 : Comparaison des facteurs d'accumulation du cadmium par les moules en présence du métal ionique ou préalablement lié aux bactéries R et S, après 10 jours de contact dans les différents organes examinés.

BIBLIOGRAPHIE

- AUSTIN, B., ALLEN, D.A., MILLS, A.L. and COLWELL, R.R., 1977. Numerical Taxonomy of heavy-metal tolerant bacteria isolated from an estuary. Can. J. Microbiol. 23 : 1433-1447.
- CHABBERT, Y.A., 1963. L'antibiogramme. Coll. Techniques de Base. Ed. La Tourelle, Saint-Mandé, France. 257 p.
- FOWLER, S.W., HEYRAUD, M, and LA ROSA, J., 1978. Factors affecting methyl and inorganic mercury dynamics in mussels and shrimp. Mar. Biol. 46 : 267-276.
- GAUTHIER, M.J., 1976. Morphological, physiological and biochemical characteristics of some violet-pigmented bacteria isolated from seawater. Can. J. Microbiol. 22 : 138-149.
- GAUTHIER, M.J. et FLATAU, G.N., 1977. Concentration et mode de fixation du cadmium par un vibrio marin. C.R. Acad. Sci. (Paris) Ser. D, 285 : 817-820.
- GAUTHIER, M.J. et FLATAU, G.N., 1980. Etude de l'accumulation du cadmium par une bactérie marine en fonction des conditions de culture. Chemosphere. 9 : 713-718.
- GEORGE, S.G. and COOMBS, T.L., 1977. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. Mar. Biol. 39 : 261-268.
- GIBSON, D.M., HENDRIE, M.S., HOUSTON, N.C. and HOBBS, G., 1977. The identification of some Gram negative heterotrophic aquatic bacteria. In "Aquatic Microbiology" Ed. Skinner F.A. et Shewan J.M., Academic Press, London, pp. 135-159.
- HORITSU, H., KATO, H. and TOMOYEDA, M., 1979. Uptake of Cd by a cadmium chloride tolerant bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. J. Ferment. Technol. 57 : 273-379.
- OLSON, B.H. and COOPER, R.C., 1973. Methylation of mercury by estuarine sediments. Abstracts Annual Meeting of American Society for Microbiology, p. 48.
- PRIEUR, D., 1981. Experimental studies of trophic relationships between marine bacteria and bivalve molluscs. Kieler Meeresforsch. Sonderh. 5 : 376-383.
- RAINBOW, P.S., SCOTT, A.G., WIGGINS, E.A. and JACKSON, R.W., 1980. Effect of chelating agents on the accumulation of cadmium by the barnacle *Semibalanus balanoides* and complexation of soluble Cd, Zn, and Cu. Mar. Ecol. Prog. Ser. 2 : 143-152.
- SAYLER, G.S., NELSON, J.D., Jr., and COLWELL, R.R., 1975. Role of bacteria on bioaccumulation of mercury in the oyster *Crassostrea virginica*. App. Microbiol. 30 : 91-96.
- TYNECKA, Z., ZAJAC, J. and GOS, Z., 1975. Plasmid dependant impermeability barrier to cadmium in *Staphylococcus aureus*. Acta. Microbiol. Pol., Ser. A., 7 : 11-20.