

49

ADAPTIVE FEATURES OF A BACTERIOLYTIC ENZYME FROM THE STYLE OF THE MUSSEL *CHOROMYTIUS MERIDIONALIS* IN RESPONSE TO ENVIRONMENTAL FLUCTUATIONS

L.J. SEIDERER and F.T. ROBB

Departments of Zoology and Microbiology, University of Cape Town, RONDEBOSCH, 7700 (SOUTH AFRICA)

ABSTRACT - The extracellular digestive apparatus of bivalve molluscs consists of a crystalline style containing diverse degradative enzymes which are released during rotation and dissolution of the style. Bacteriolytic substances have been reported previously in crystalline style extracts of bivalves, and have been identified as true lysozymes or N-acetyl-muramyl-hydrolase. This paper will review the occurrence of a temperature-regulated bacteriolytic enzyme in the black mussel *Choromytilus meridionalis*, which is an inhabitant of coastal reefs on the south and south west coast of South Africa. This agent is unable to lyse *Micrococcus luteus* or *Escherichia coli*, both of which are susceptible to lysis by a true lysozyme. It appears to have a restricted spectrum of activity which includes both free-living and kelp-associated gram-negative bacteria. In addition, the level of activity varies dramatically according to the environmental water temperature. When upwelling occurs, the water is cold (9°C) and is poor in phytoplankton and macrophyte debris. Under these conditions bacteriolytic activity is at its maximum and bacteria predominate as a nitrogen-rich exploitable food resource with a C:N ratio of approximately 3.5:1. These phases of upwelling are interspersed with an opposite flow of phytoplankton-rich warm surface water. Under these conditions bacteriolytic activity of the style is at a minimum.

RÉSUMÉ - Le système digestif extracellulaire des mollusques bivalves est constitué d'un stylet cristallin contenant diverses enzymes de dégradation qui sont libérées lors de la rotation et la dissolution du stylet. Des substances bactériolytiques ont déjà été signalées dans des extraits de stylet cristallin de bivalves et identifiées comme véritables lysozyme ou N-acetylmuramyl-hydrolase. Le présent travail étudie la présence d'une enzyme bactériolytique régulée par la température chez le bivalve *Choromytilus meridionalis* qui est présent sur la côte rocheuse du Sud et du Sud-Ouest de l'Afrique du Sud. Cette enzyme est incapable de lyser *Micrococcus luteus* ou *Escherichia coli* qui sont tous deux susceptibles d'être lysés par un vrai lysozyme. Elle présente un spectre d'activité limité qui inclut les bactéries gram négative libres ou associées aux algues. En outre, le niveau d'activité varie considérablement en fonction de la température de l'eau environnante. Lors de «l'upwelling» l'eau a une température d'environ 9°C et est pauvre en phytoplancton et débris de macrophytes. Dans ces conditions, l'activité bactériolytique est maximale et les bactéries constituent la principale source d'aliment assimilable riche en azote, avec un rapport C : N est égal à 3.5 : 1. Ces phases «d'upwelling» sont entrecoupées par un courant opposé d'eau chaude de surface riche en phytoplancton. Dans ces conditions, l'activité bactériolytique du stylet est minimale.

INTRODUCTION

Newell *et al.* (1980) have shown that the protein component of kelp debris amounts to as much as 23 - 28 % of the dry weight of freshly powdered *Laminaria pallida* frond. Since microbial conversion of nitrogen from kelp detritus is achieved with an efficiency of as much as 83-94 % (see Stuart *et al.*, 1981 ; Koop *et al.*, 1982a, 1982b), it seems likely that much of the protein originally released during fragmentation of kelp will become potentially available to consumers in the form of microbial biomass associated with the particulate fraction. The following work was therefore undertaken to investigate the

potential significance of style enzymes from the mussel *Choromytilus meridionalis* in the utilisation of living bacteria and the extent to which the activity of these enzymes could supply the nitrogen requirements of the mussel.

Apart from the work of McHenery *et al.* (1979) and McHenery and Birkbeck (1979, 1982), there have been very few studies of the digestive enzymes which are required for the utilisation of the bacterial component of such detrital diets.

The naturally occurring populations of marine bacteria are almost exclusively gram negative. Although Repaske (1958) has shown that for lysis of *Escherichia coli* by lysozyme, prior treatment with the chelating agent EDTA is required to destabilise the cell wall, this does not appear to be the case in bacteriolysis within the stomach of marine bivalves. McHenery *et al.*, (1979) described the occurrence of a lysozyme-like enzyme in the bivalves *Mytilus edulis*, *Modiolus modiolus*, *Chlamys opercularis* and *Mya arenaria* and suggested that its primary role is in the utilisation of bacteria. McHenery and Birkbeck (1982) subsequently showed that the enzyme from *M. edulis* is a true N. acetylmuramyl-hydrolase which is capable of degrading the cell walls of a variety of bacteria including *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.

Clearly the occurrence and activity of such lysozyme-like enzymes is of importance in estimating the significance of bacteria as a carbon, and above all, a nitrogen resource for consumer organisms which are exploiting detrital diets with a high C:N ratio. This paper examines the occurrence and role of lysozyme-like enzymes in the utilisation of bacteria as a potential resource by the kelp bed mussel *Choromytilus meridionalis* whose carbon balance on a detrital diet has been established (Seiderer *et al.*, 1982).

MATERIALS AND METHODS

Sampling and Preparation of Style Extract

Specimens of the black mussel *Choromytilus meridionalis* (Krauss) were collected from a rocky intertidal reef at Bloubergstrand, on the West Coast of South Africa, between November 1982 and February 1983 and were transferred to the laboratory for immediate extraction of the crystalline style. The styles of twenty specimens were removed, rinsed and homogenised over ice with a glass tissue grinder in 12 ml 20 mM phosphate buffer, pH 7.0, containing 150 mM NaCl (see also Langton, 1977; Seiderer and Newell, 1979; Seiderer *et al.*, 1982, 1984). All glassware had been sterilised immediately prior to use. The homogenate was centrifuged at 15,000 x g for 5 minutes and the supernatant diluted to 1.0 mg protein ml⁻¹ (Groves *et al.*, 1968) with phosphate buffer before lysozyme assays were performed.

Isolation and Culture of Bacterial Strains

In order to isolate water column bacteria, samples of seawater were taken from Oudekraal, also on the west coast of South Africa. Subsamples were pipetted onto agar plates made of 1.5% agar in seawater growth medium (Davis *et al.*, 1983). Plates were then incubated at 25 - 30°C for 24 - 48 hours. Twenty five strains were isolated and restreaked at least five times before the clones were assigned to collections and stored on slants of seawater agar at 4°C.

Bacterial isolates were also prepared from the gut contents of the mussel *Choromytilus meridionalis*. The guts of four mussels were removed (excluding extraneous contamination) and the contents cultured on seawater-agar plates at 20°C after treatment with 1% Trypsin for 30 minutes at 30°C. Cultures were also made from homogenised gut tissues and twenty strains were isolated and stored on seawater agar at 4°C.

Each of the isolates in the collections was then incubated in an orbital shaker at 30°C for 10 hours in 2 ml seawater liquid growth medium. These were reinoculated into 50 ml growth medium and grown at 30°C for a further 12 hours before being used for preparation of experimental agarose plates.

Preparation and Incubation of Plates

The activity of lysozyme-like enzymes was assayed on 0.8 % agarose plates containing heat-killed target bacteria (McHenery *et al.*, 1979). The bacterial suspensions were centrifuged at 8 000 x g for 15 minutes and the pellets resuspended in 2 ml sterile seawater. The suspensions were then adjusted with sterile seawater so that the final optical density in the agarose medium would be 0.122 at 600 nm, and added to 20 ml agarose medium. The media were then heated at 65°C for 10 - 15 minutes to kill the bacteria, and poured into 8.4 cm diameter petri dishes. Wells of equal diameter (2 mm) were cut into each agarose plate to receive the enzyme extract.

Eight serial ten-fold dilutions of enzyme extract were prepared and aliquots of 10 µl of each of the dilutions were placed individually into the wells and incubated at 20°C for 48 hours. The intact bacteria were stained by the addition of 5 ml of 0.12 % crystal violet to each plate. After 2 hours, the plates were rinsed with distilled water and the diameter of the clear zones of lysis was measured. From the number of bacteria per unit surface area of the plates, the area of the clear zone could be expressed as number of bacteria lysed per 45 hours of incubation at 20°C. The equation for the regression is : Bacterial number lysed ($\times 10^5$) $y = - 0.92 + 0.11 X$. (where X = zone diameter in mm), all calculated values, (Seiderer *et al.*, 1984).

Activity Spectrum of Crystalline Style Extract

An experiment was carried out to determine the activity spectrum of style extract of *C. meridionalis*, taken from mussels collected under an ambient water temperature of 11°C. A total of 43 gut, water column and kelp frond bacterial isolates were cultured as before. Agarose plates were poured, incorporating cultures of each bacterial isolate separately, and wells were made within each plate. Into the wells, eight 1:10 serial dilutions of style extract were pipetted, and the plates were incubated at room temperature for 45 hours. The zones of lysis were measured, and the enzyme activity was calculated as before. The plates were divided up into 19 gut isolate plates, 16 water column plates and 8 kelp frond plates. A cut-off point between susceptible bacteria and resistant bacteria was arbitrarily assigned to be 1×10^6 bacteria lysed per µl of style extract. The percent frequencies on either side of this cut-off point were plotted against the origins of these bacterial isolates.

RESULTS AND DISCUSSION

Lysis of Target Bacteria

Zones of lysis formed the basic assay for lysozyme activity in extracts of the crystalline style from *Choromytilus meridionalis*. The assay for the activity of this factor is extremely reproducible and sensitive, due to the use of crystal violet to enhance contrast of low levels of target bacteria.

The results demonstrated in Figure 1 show the bacterial strains isolated from the gut of *C. meridionalis* to be 79 % resistant and 21 % susceptible to lysis. A similar spectrum was found amongst the kelp-frond bacterial isolates, in which 62 % were resistant and 38 % were susceptible. The bacteria isolated from the water column in the kelp bed are 43 % resistant and 57 % susceptible to lysis. Although the sample size used in this study is too

Aucun des travaux précédents n'a permis de déterminer définitivement l'origine microbienne, digestive ou mixte de la cellulolyse. Nous avons donc étudié le rôle éventuel des microflores du tube digestif et de l'environnement immédiat dans ce phénomène, ainsi que les relations pouvant exister entre ces deux microflores dont nous donnons les caractéristiques.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les mollusques utilisés proviennent de la rade de Brest. Les expériences sont réalisées au laboratoire, à l'obscurité et à deux températures, 10 et 20°C. Nous avons procédé, dans des conditions aseptiques, à deux types d'expérimentation, les unes sur des appareils digestifs, les autres sur des animaux maintenus vivants dans des fioles sous courant d'air stérile. Après dissection, nous avons ligaturé les extrémités des tubes digestifs. Le milieu expérimental est constitué par de l'eau de mer artificielle préparée selon la formule de Lyman et Fleming (1940). Les tubes digestifs sont incubés à pH 6,43. Cette valeur est choisie après mesure du pH interne de ces tubes digestifs à l'aide de microélectrodes. Nous avons introduit dans l'appareil digestif ou dans l'environnement des mollusques de l'eau de mer à 5 g/l de carboxyméthylcellulose (CMC) associée le cas échéant avec des antibiotiques comme l'azide de sodium (ANa) à 100 mg/l, inhibiteur de la microflore aérobie ou le chloramphénicol (300 mg/l). Ce dernier s'est révélé plus efficace que la colistine, la pénicilline G, la streptomycine, la sulfométhoxyypyridazine et la tétracycline, lors de tests préliminaires sur une collection de souches cellulolytiques issues des *Teredo*. Selon le type d'expérience, nous avons pris comme témoin soit un tube digestif, soit l'environnement d'un *Teredo* non traité. Les expériences ont été répétées six fois entre juin 1983 et mai 1984 tant au niveau du tube digestif que dans l'environnement des *Teredo*. Cette série de mesures permet de confirmer la répétitivité de nos résultats qui se révèlent peu dépendants de la saison. La quantité de sucres réducteurs libérés est mesurée toutes les 24 h pendant 72 h selon la méthode de l'acide dinitrosalicylique (Miller, 1959). Les dosages ont été faits à l'extérieur des tubes digestifs et dans l'environnement des *Teredo* et, en fin d'expérience, à partir de broyats de *Teredo* clarifiés par centrifugation (5 000 g, 15 mn, 4°C). Nous avons exprimé les résultats en millimoles d'équivalent glucose rapportées à 1 gramme de mollusque. L'activité cellulose-dépolymérase est mesurée selon la technique viscosimétrique de Cooper (1977).

A partir d'un tube digestif et de la galerie d'un *Teredo*, les souches potentiellement cellulolytiques sont isolées sur deux milieux gélosés, l'un préparé avec de la cellulose soluble (CMC), l'autre avec de la cellulose insoluble (Whatman 3 M). Ces deux types de milieux ont été préparés selon les techniques de Deschamps et Lebeault (1980). Au cours des expériences, l'évolution des populations bactériennes est suivie par la méthode des dilutions sur le milieu 2216E d'Oppenheimer et Zobell (1952) et sur un milieu gélosé à CMC. L'incubation est de huit jours à 20°C et à l'obscurité. La microflore de l'environnement immédiat des *Teredo*, entraînée par rinçage des mollusques, est incubée à 10°C en présence d'une source de carbone à 1 g/l d'eau de mer artificielle. Les sucres utilisés sont l'arabinose, le cellobiose, le galactose, le mannose et le xylose. La flore dénombrée est *aérobie* mais il n'est pas exclu que certaines souches soient anaérobies facultatives.

RÉSULTATS ET COMMENTAIRE

Influence de deux antibiotiques sur la microflore et la cellulolyse dans le tube digestif de *Teredo navalis* L. (Pl. 1 et Tab. 1)

Les résultats exposés proviennent d'une expérience réalisée en mars 1984. A 10°C, de 24 à

48 h, dans le tube digestif en présence de CMC et d'azide de sodium, la quantité d'oses réducteurs reste voisine de celle mesurée dans le tube digestif témoin. Elle correspond aux sucres provenant de la digestion ayant précédé l'expérience.

Dans le tube digestif à CMC et chloramphénicol, la quantité d'oses réducteurs est multipliée de 1,1 à 2,8 par rapport au témoin. Le chloramphénicol, en neutralisant une partie de la microflore, a permis à une sous-population cellulolytique, jusque là restreinte, de proliférer en dégradant la cellulose. Les oses réducteurs libres augmentent car la microflore capable de les utiliser est absente.

Dans le tube digestif à CMC, le niveau de ces oses est plus important et atteint 2,3 à 3,6 fois celui du témoin. A 72 h, la nécrose du tube digestif, impossible à maintenir en survie au-delà, libère des glucides constitutifs. La prolifération bactérienne est à son maximum dans le tube digestif témoin et à CMC. Cet accroissement s'accompagne d'une utilisation métabolique bactérienne des oses, utilisation qui reste quasi nulle en présence des antibiotiques.

A 20°C, nous observons la même évolution mais l'élévation de température se traduit par une augmentation plus rapide aussi bien de la cellulolyse que de la microflore utilisatrice des sucres réducteurs.

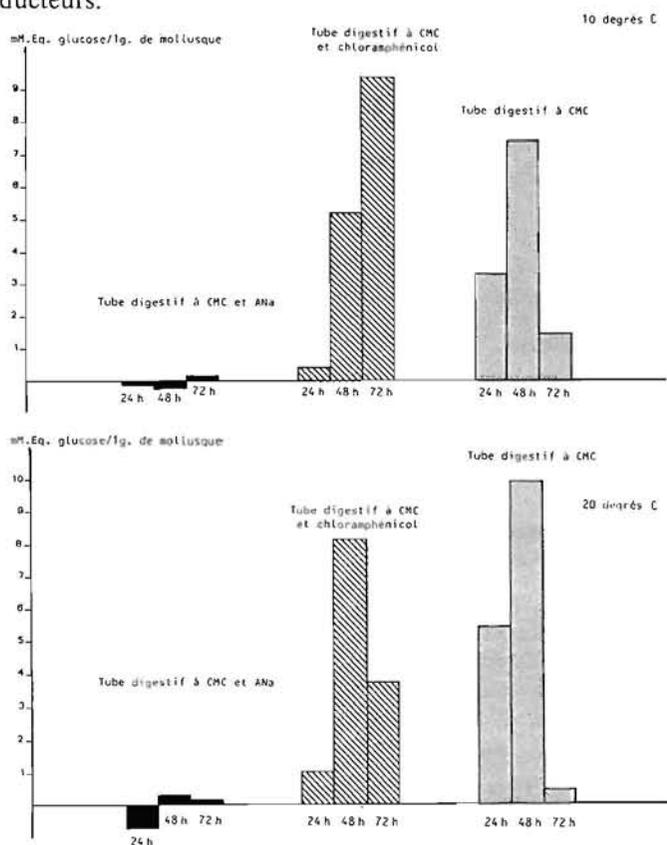


Planche 1 : influence de l'azide de sodium et du chloramphénicol sur la microflore du tube digestif de *Teredo navalis* L.

Les histogrammes indiquent la concentration d'oses réducteurs en fonction du temps par rapport à la quantité d'oses réducteurs d'un tube digestif témoin.

Ana : Azide de sodium.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

bactéries de l'environnement et/ou le *Teredo* est supérieure à leur libération par cellulolyse, d'où un taux inférieur au témoin (81 %).

b) Expérience d'avril 1984 :

A 20°C, dans l'environnement à CMC et azide de sodium, la quantité d'oses réducteurs est trois fois plus importante à 24 qu'à 48 h où elle est voisine de celle du témoin. La quantité mesurée peut aussi bien provenir de la digestion ayant précédé l'expérience que de l'intervention d'une microflore anaérobie facultative non inhibée par l'ANA. A 72 h, le taux d'oses présents est décuplé. L'accroissement constaté est dû à la nécrose du *Teredo* qui libère ses sucres constitutifs. Le même processus s'observe dans l'environnement en présence de CMC ; mais à 48 h, la diminution en oses réducteurs est due à l'intervention de la microflore, plus dense à cette température qu'à 10°C et/ou à leur ingestion par le *Teredo*. A la 72^e h, nous retrouvons dans les broyats la même évolution qu'à 10°C, mais les quantités de sucres mesurées sont faibles. L'élévation de température a provoqué un accroissement de la microflore apte à utiliser ces oses.

Comme dans le tube digestif, l'utilisation de l'azide de sodium montre la présence d'une microflore cellulolytique dans l'environnement des *Teredo*. Il est probable cependant qu'une microflore anaérobie facultative, réduite dans les conditions naturelles, puisse s'exprimer à 20°C dans nos conditions expérimentales.

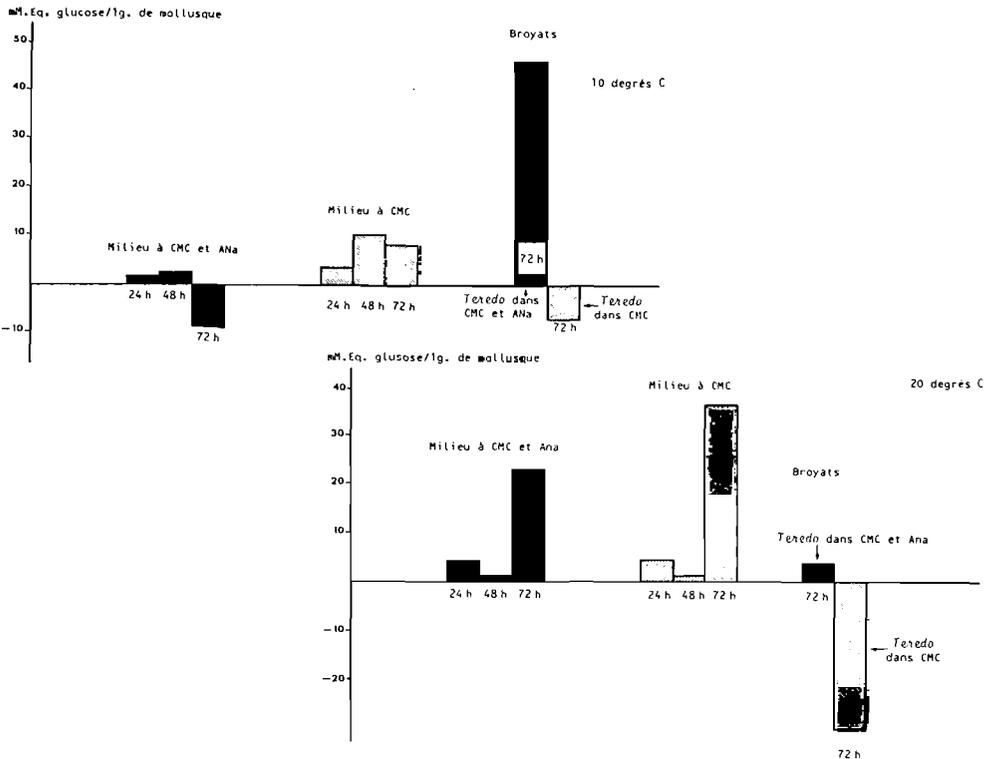


Planche 2 : influence de l'azide de sodium sur l'activité de la microflore de l'environnement de *Teredo navalis* L.

Les histogrammes indiquent la concentration d'oses réducteurs en fonction du temps par rapport à la quantité d'oses réducteurs dans l'environnement d'un mollusque témoin.

Ana : Azide de sodium.

CMC : Carboxyméthylcellulose.

Remarque : Le dosage de l'activité cellulolytique sur les précipités acétoniques extraits des environnements de *Teredo navalis* L. et *Teredo pedicellata* Quatrefages a montré que la quantité d'enzymes libres était quatre fois plus importante chez *Teredo navalis* L. (Résultats personnels non publiés).

Origine des microflores	Milieux d'isolement		Numération bactérienne (N) en 10 ² . ml ⁻¹	N. CMC N. 2216 E
	Temps	Milieu		
Tubes digestifs expérimentés	Temps 0	Milieu CMC	39	0,46
	Mars	Milieu 2216 E	85	
	Temps 0	Milieu CMC	200	0,10
	Juin	Milieu 2216 E	2 0000	
Environnement des Teredo expérimentés	Temps 0	Milieu CMC	0,1	0,04
	Mars	Milieu 2216 E	2,2	
	Temps 0	Milieu CMC	0,1	0,05
	Avril	Milieu 2216 E	1,9	
Teredo expérimentés	Temps 24 h	Milieu CMC	15	0,23
	Mai	Milieu 2216 E	64	

Tableau 2 : Évaluation du taux de bactéries cellulolytiques dans les microflores du tube digestif et de l'environnement de *Teredo navalis* L.

Etude comparative des microflores cellulolytiques de l'environnement et du tube digestif (Pl. 3 et Tab 1, 2 et 3)

La microflore du tube digestif est généralement plus abondante que celle de la galerie. Quantitativement, le rapport entre ces deux populations varie de 0,5 à 4 (Tab. 1). Ces résultats permettent d'évaluer la proportion relative des cellulolytiques au sein de chaque microflore. Ce taux varie de 10 à 46 % dans le tube digestif et de 4 à 23 % dans la galerie (Tab. 2).

Au total, 31 souches potentiellement cellulolytiques ont été isolées, 18 proviennent du tube digestif et 13 de la galerie. 31 tests morphologiques, écologiques et biochimiques ont permis de les décrire (Tab. 3). Dans les deux microflores, les bactéries sont des bâtonnets. Une seule souche Gram positif a été décelée dans le tube digestif. 93 % de ces souches fermentent le glucose alors que cette proportion estimée sur le milieu 2216E est de 67 % dans la microflore globale du tube digestif et de 53 % pour celle de la galerie (Martinez, 1984). Elles sont pourvues d'oxydase, de protéase et produisent de l'acide pyruvique et de l'indol.

Nous avons également recherché l'aptitude de la microflore totale à utiliser diverses sources de carbone. En présence de xylose, sur 48 h, la population bactérienne reste stable. Par contre, le galactose, le mannose et le cellobiose permettent chacun un développement qui atteint en 24 h, 5.10³ cellules par ml puis à 48 h, 5.10⁴ cellules. Ces numérations impliquent une meilleure utilisation par les souches de l'environnement du mannose, galactose et cellobiose, caractères déjà notés chez 60 % des bactéries du tube digestif isolées sur le milieu moins sélectif de Zobell (Martinez, 1984).

89 % des bactéries du tractus digestif et de la galerie sont des Vibrionacées du genre *Aeromonas*. Nous avons de plus identifié les genres *Flavobacterium* et *Listeria* dans le tube digestif ainsi que *Pseudomonas* et *Escherichia* dans la galerie. Au vu des résultats du

MILIEUX CNC et WHATMAN		MILIEUX D'ISOLEMENT
GALERIE	APPAREIL DIGESTIF	ORIGINE DES MICROFLORES
13	18	Nombre de souches isolées
100	95	Gram négatif
0	5	Gram positif
92	95	Fermentation glucose
92	100	Acidification glucose
69	28	Acidification saccharose
7,6	5	Acidification L(+) arabinose
100	100	Acidification mannose
100	100	Acidification fructose
100	100	Acidification maltose
92	100	Acidification amidon
0	5	Acidification rhamnose
100	94	Acidification galactose
92	100	Acidification mannitol
0	5	Acidification sorbitol
61	77	Acidification glycérol
0	11	Acide pyruvique
0	5	Citrate
100	100	$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$
100	95	Indole - Tryptophane
0	5	H_2S - Cystéine
92	94	O.N.P.G.
100	100	Protéase
0	0	Uréase
100	100	Catalase
100	100	Oxydase
50	22	Croissance à 5°C
36	28	Croissance à 30°C
0	17	Souches n'exigeant pas NaCl
100	100	Croissance sur NaCl à 30°/..

Tableau 3 : Caractéristiques biochimiques et écologiques des souches isolées.
Les résultats aux différents tests sont exprimés en fréquences de réponses positives.

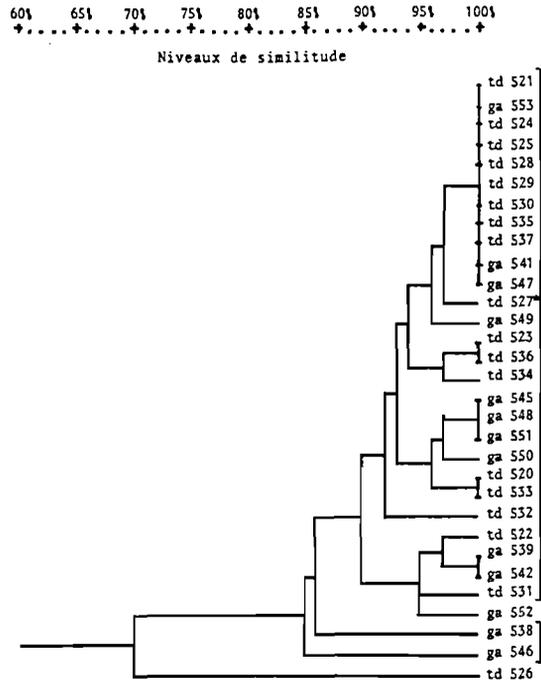


Planche 3 : Dendrogramme - Analyse numérique des données concernant les bactéries de la galerie et du tube digestif de *Teredo navalis* et isolées sur les milieux à carboxyméthylcellulose et cellulose Whatman 3 M.

td : Tube digestif.
ga : Galerie.

★ : Souche Gram positif.
┌───┐ : Regroupement des souches à métabolisme fermentatif.

tableau 3, sur les mêmes milieux d'isolement, les deux microflore paraissent semblables. C'est ce que montre l'analyse numérique (Pl. 3). Les phénons sont mixtes et il n'y a pas de disjonction entre les deux populations. Les regroupements varient de 100 % à 70 % de similitude.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'azide de sodium, inhibiteur des cytochromes oxydases et des peroxydases, neutralise l'activité de la microflore aérobie. La répression de la carboxyméthylcellulolyse, en présence d'azide de sodium, permet de conclure à une activité d'origine microbienne tant dans l'appareil digestif que dans l'environnement immédiat de *Teredo navalis* L. D'autre part, les résultats permettent d'écarter l'hypothèse d'enzymes ayant pour origine le tube digestif. Il n'est pourtant pas exclu que, dans l'environnement des *Teredo*, des bactéries anaérobies facultatives puissent faiblement s'exprimer en présence de cet inhibiteur.

Des résultats complémentaires sont obtenus par l'emploi du chloramphénicol répressur des synthèses protéiques chez les Procaryotes. La production d'oses réducteurs en sa présence confirme que la cellulolyse n'a pas pour origine la paroi digestive mais des bactéries chloramphénicol-résistantes. Une sous-population bactérienne cellulolytique est ainsi révélée dont le rôle doit être réduit dans les conditions naturelles de compétition. En conclusion, les flores bactériennes de l'appareil digestif et de l'environnement des *Teredo* sont donc susceptibles d'hydrolyser la CMC. Cette digestion peut intervenir dans le tube digestif aussi bien qu'à l'extérieur du manteau et dans la galerie. Dans les conditions de l'expérimentation, l'activité maximale de la cellulolyse dans l'appareil digestif se situe à 20°C au pH 6,43 et à 10°C dans l'environnement. Ce pH est voisin de celui noté par Hidaka et Saito (1956) pour l'exocellulase du "*Cell-Vibrio*" qu'ils ont isolé. L'assimilation préférentielle du galactose et du mannose par les microflore étudiées suggère que les hémicelluloses riches en ces composés puissent être dégradées préférentiellement dans les conditions naturelles.

Par ailleurs, la cinétique de dépolymérisation de la carboxyméthylcellulose et les étapes de sa dégradation en oses réducteurs laissent présumer l'intervention successive, dans la cellulolyse, d'au moins deux types d'exocellulases. Ce sont une poly β glucosidase C_x et une β glucosidase agissant sur les oligosaccharides de la première hydrolyse. Cette dernière enzyme, active sur le cellobiose, est présente dans les microflore du tube digestif et de l'environnement. Constituées essentiellement de Vibrionacées, ces populations bactériennes présentent un haut degré de similitude. Leurs nombreux caractères communs impliquent entre elles une communication par l'orifice buccal et le siphon inhalant des *Teredo*.

La microflore externe à l'animal opèrerait une première dégradation de la cellulose du bois de la galerie, ce qui faciliterait la décomposition ultérieure par la microflore digestive. La détermination des souches cellulolytiques est à poursuivre et leur mode d'action, peut-être de nature synergique, reste à préciser.

Le suivi du C^{14} lors de la dégradation d'une radio-cellulose permettrait de confirmer définitivement l'utilisation de la cellulose du bois par les *Teredo navalis* L.

COOPER R.M., 1977. Regulation of synthesis of cell wall-degrading enzymes of plant pathogens. *Cell Wall Biochem. Relat. Specif. Host-Plant Pathog. Interact., Proc. Symp.* : 163-211. Solheim B. et Thaa J. Ed., Universitets Forlaget, Oslo.

CUTTER J.M. et ROSENBERG F.A., 1971. The role of cellulolytic bacteria in the digestive processes of the shipworm. 2. Requirement for bacterial cellulase in the digestive system of teredine borers. *Proceedings of the Second International Biodeterioration Symposium, Lunteren, The Netherlands* : 1-31.

DESCHAMPS P., 1953. Recherche de la cellulase chez *Teredo navalis* au moyen de la chromatographie de partage. *Bull. Soc. Zool. Fr.* 8, 78 : 174-177.

DESCHAMPS A.M. et LEBEAULT J.M., 1980. Recherche de bactéries cellulolytiques par la méthode à la cellulose-azur. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 131 A : 77-81.

DORE W.H. et MILLER R.C., 1923. The digestion of wood by *Teredo navalis*. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 22 : 383-400.

HIDAKA T., 1953. On the cellulose decomposing bacteria found in the digestive organs of *Teredo* (*Teredo navalis* sp.). *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, 3 : 149-157.

HIDAKA T. et SAITO K., 1956. Studies on the cellulose decomposing bacteria in the digestive organs of shipworm (*Teredo navalis* sp.). II. On the bacterial cellulase. *Mem. Fac. Fish. Kagoshima Univ.*, 5 : 172-177.

LYMAN J. et FLEMING R.H., 1940. Composition of sea water. *J. Mar. Res.*, 3 : 134-146.

MARTINEZ J.C., 1984. La microflore de l'appareil digestif de *Teredo navalis* L. (*Teredinidae*; *Bivalvia*) : ses propriétés métaboliques et son rôle éventuel dans la digestion. Bactériologie Marine. Marseille 17-18-19 mai 1982. Colloques Internationaux du C.N.R.S., 331 : 151-154.

MILLER R.C., 1924. The boring mechanism of *Teredo*. *Univ. Calif. Publ. Zool.*, 26 : 41-80.

MILLER G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 : 416-428.

OPPENHEIMER C.H. et ZOBELL C.E., 1952. The growth and biobility of sixty-three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.*, 11 : 10- 18.

WATERBURY J.B., CALLOWAY C.B. et TURNER R.D., 1983. A cellulolytic Nitrogen fixing bacterium cultured from the gland of *Deshayes* in shipworms (*Bivalvia* : *Teredinidae*). *Science*, 221 : 1401-1403.