

Dynamique des communautés bactériennes d'une eau lagunaire enrichie en azote

Dynamique
Bactéries
Lagunes
Azote

Dynamics
Bacteria
Lagoons
Nitrogen

F. Van Wambeke, M. A. G. Bianchi, A. J. M. Bianchi
CNRS, Écologie et Biochimie microbiennes du Milieu marin, Université de Provence, 3, place
Victor-Hugo, 13331 Marseille Cedex 3, France.

RÉSUMÉ

A partir d'expérimentations effectués sur l'eau du bassin d'Arcachon, des essais de quantification et qualification du potentiel de réactivité des communautés bactériennes ont été effectués.

Les communautés bactériennes ont été définies par comptages directs, comptages après mise en culture, structure et diversité de ces communautés, dosage des AMP, ADP, ATP.

Deux situations écologiques opposées ont été considérées. Une situation automnale (température élevée) et une situation hivernale (température faible).

Des bacs d'eau de mer de 6 et 60 l ont été enrichis, soit avec du chlorure d'ammonium, soit avec un mélange d'acides aminés, à environ $500 \mu\text{Atg N.l}^{-1}$. Les expériences ont duré 24 h, avec des prélèvements toutes les 3 h.

La communauté automnale réagit rapidement (6 h), la réponse à l'enrichissement en azote organique étant la plus importante. La structure de la communauté présente des stades immatures instables.

Au contraire, au cours de l'expérimentation hivernale, aucune réponse n'a pu être perçue. Ceci peut signifier que la phase de latence est supérieure à 24 h. La structure de cette communauté présente des stades matures.

Dans l'expérimentation d'automne, les taux d'AMP sont largement supérieurs aux taux d'ATP dosés, à l'inverse de ce qui est observé en février.

Oceanol. Acta, 1982. Actes Symposium International sur les lagunes côtières, SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, 8-14 septembre 1981, 403-406.

ABSTRACT

Dynamics of aquatic bacterial communities from oysters areas of Arcachon Lagoon.

Carrying out some experiments on Arcachon lagoon water, we have tried to qualify and quantify the potential reactivity of bacterial communities.

Bacterial populations were defined by direct counts, plate counts, structure and diversity of communities, AMP ; ADP and ATP were also measured. We studied two opposite ecological situations : a fall situation (temperature still high) and a winter situation (low temperature).

We used batches of 6 and 50 l in which the sea water was enriched with ammonium chlorid, or amino-acids about $500 \mu\text{Atg N.l}^{-1}$. Experiment lasted 24 hrs. with a sampling time of 3 hrs. during the first 12 hrs., and a last sample at 24 hrs.

We can see the fall communities reacted quickly (6 hrs) and responses to organic nitrogen are more important. The community structure described immature states (zymogenous bacteria) easy to stress.

In the contrary, during winter situation, we cannot see any response. It may mean that the lag phase lasted longer than 24 hrs. Community structure pointed out a mature state (autochthonous bacteria).

Oceanol. Acta, 1982. Proceedings International Symposium on coastal lagoons, SCOR/IABO/UNESCO, Bordeaux, France, 8-14 September, 1981, 403-406.

INTRODUCTION

Les eaux eutrophes du bassin d'Arcachon sont soumises à des décharges organiques ou minérales (d'origine naturelle ou humaine) parfois concomitantes à des fluctuations brutales de température. Ces conditions physico-chimiques se traduisent sur le plan biologique par des crises dystrophiques pouvant induire des mortalités importantes de la faune, catastrophiques pour l'aquaculture pratiquée dans ces eaux (Lasserre, 1979).

Le rôle primordial joué par les communautés microbiennes lors de ces états de crise, nécessite une étude de la dynamique et des possibilités métaboliques de ces communautés.

Des études, portant sur la distribution des micro-communautés en différents points de la lagune, et au cours d'un cycle annuel (Baleux *et al.*, 1979), n'ont permis que des comparaisons fragmentaires des communautés bactériennes de cette zone, considérées alors sous un angle statique de simple observation.

Par contre, l'intérêt d'une étude dynamique des communautés bactériennes, traduisant la réactivité bactérienne de l'eau considérée, réside dans la possibilité de dégager une prédiction du comportement des bactéries d'un lieu donné lors de conditions physico-chimiques, biologiques et climatologiques définies.

Cette étude dynamique est réalisée en soumettant les bactéries présentes dans l'eau testée, à un stress artificiel, simulant les facteurs favorables à une crise dystrophique naturelle. Un enrichissement soit en ammonium, soit en azote organique, deux sources d'azote pouvant découler d'une utilisation des eaux à des fins d'aquaculture, a été choisi comme stress.

La rapidité des processus bactériens implique une étude à court terme et procédant de temps d'échantillonnage très rapprochés.

Pour mettre en évidence le comportement des communautés bactériennes lors des conditions naturelles, soit propices à l'apparition des crises dystrophiques, soit, au contraire, réputées comme ne permettant pas cet état de déséquilibre, deux expérimentations similaires ont été conduites à deux saisons différentes.

Une expérience s'est déroulée en septembre 1980, période de fin de production estivale et pendant laquelle la température est encore élevée (19 °C). Une deuxième expérimentation a été réalisée en février 1981, dans les eaux froides (8 °C) et non susceptibles de voir l'apparition d'un état de crise (Lasserre, 1979).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prélèvement et expérimentation

Au voisinage immédiat d'un des parcs à huîtres de l'île aux Oiseaux, à marée basse, de l'eau de surface a été prélevée et

ramenée rapidement au laboratoire, puis répartie uniformément dans 5 bacs en plein air ; à raison de 6 l par bac en septembre et 60 l par bac en février :

— 2 bacs sont enrichis à 30 mg.l⁻¹ en NH₄Cl, soit 560 µAtg N.l⁻¹ ;

— 2 bacs sont enrichis à 30 mg.l⁻¹ en acides aminés Difco, soit 214 µAtg N.l⁻¹ ;

— 1 bac sert de témoin et n'est pas enrichi.

Le temps T₀ correspond à l'introduction de la source d'azote. Les expériences durent 24 h, avec des prélèvements toutes les 3 h les 12 premières heures, et un dernier point est réalisé, 24 h après l'enrichissement.

Estimation quantitative de la microflore

ATP

Le protocole expérimental est celui de Holm-Hansen et Booth (1966) modifié par Laborde (1972). Les échantillons sont filtrés sur membranes Gelmann 0,45 µ puis extraits dans 5 ml de Tris (0,02 M pH 7,5) bouillant pendant 5 mn. Le dosage est fait sur l'appareil Pico-ATP MUKA.

Numération directe

Les comptages sont effectués au microscope à épifluorescence, sur les échantillons fixés au formol à 1 % final et filtrés sur filtres Nucleopore 0,22 µ ; selon la technique de Hobbie *et al.* (1977).

Estimation qualitative de la microflore

A partir de l'isolement des bactéries viables sur milieu 2216 E, gélosé (Oppenheimer, Zobell, 1952), 20 souches par boîte, représentant une population statistique de l'échantillon, sont isolées (au hasard à l'aide d'une grille), purifiées et décrites par 87 tests morphologiques, physiologiques, biochimiques et nutritionnels ; puis ces souches sont comparées entre elles grâce à un programme de classification taxonomique suivant les distances moyennes, à partir des mesures de coefficient de similitude de Jaccard.

A partir d'un niveau de coupure choisi à 70 % de similitude (correspondant à la valeur de similitude pour laquelle s'infléchit la courbe d'entrée des souches dans le dendrogramme), on repère les phénons et les souches isolées.

Une mesure de l'hétérogénéité de la population bactérienne est donnée par l'indice de Shannon :

$$H = - \sum P_i \log_2 P_i$$

P_i représentant la proportion de souches du ième phénon.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Lors des deux situations (automnale et hivernale) les eaux considérées font état d'une numération plus faible en septembre qu'en février (fig. 1A et 1B). Cet écart

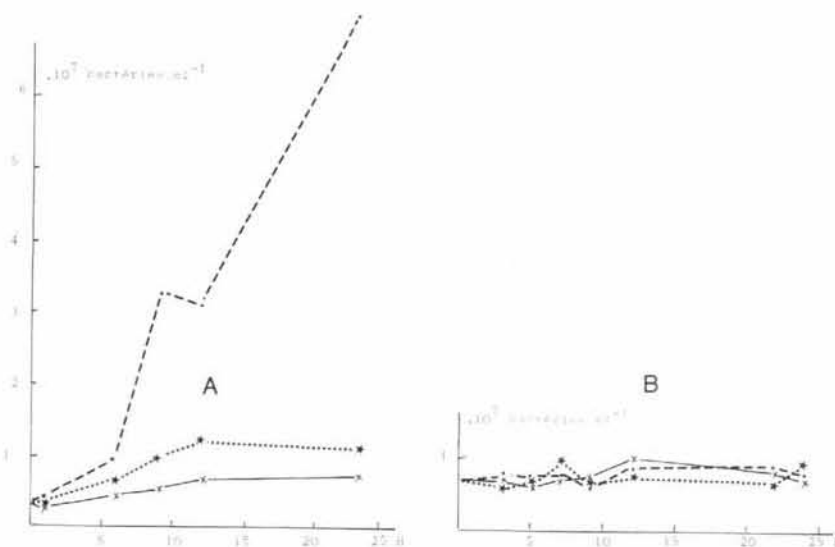


Figure 1

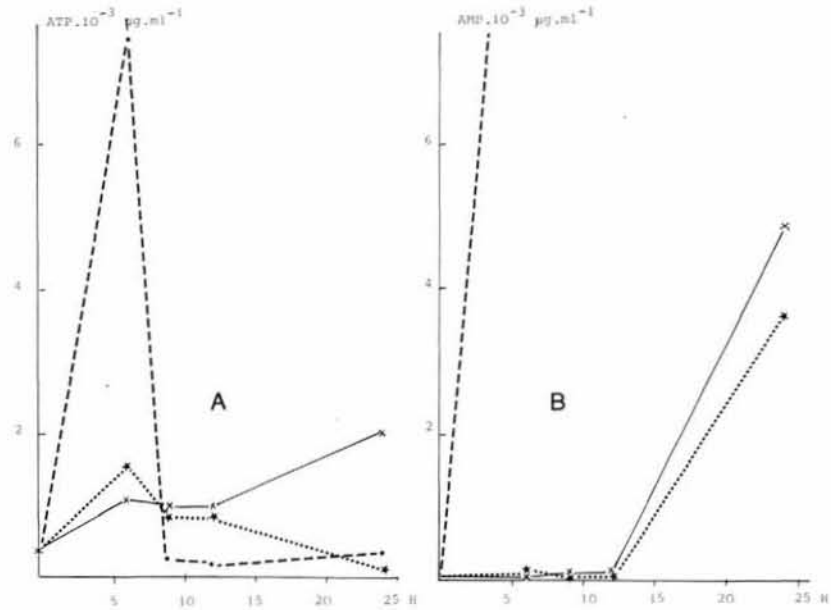
Numérations de la microflore totale dans les différents bassins au cours des 2 expériences. x—x, bac témoin ; ★—★, bac enrichi en NH₄⁺ ; ●—●, bac enrichi en acides aminés. Fig. 1A : expérience de septembre 1980. Fig. 1B : expérience de février 1981.

Number of bacteria (AOC). Fig. 1A, September 1980 ; Fig. 1B, February 1981. x—x, Blank ; ★—★, NH₄⁺ enrichment ; ●—●, amino-acids enrichment.

Figure 2

Dosage des adénosines 5' phosphates de l'expérience de septembre, dans les différents bacs. x—x, bac témoin; ★—★, bac enrichi en NH_4^+ ; ●—●, bac enrichi en acides aminés. Fig. 2A: ATP; Fig. 2B: AMP.

Adenosines 5' phosphates in September experiment. Fig. 2A: ATP values; Fig. 2B: AMP values; x—x, blank; ★—★, NH_4^+ enrichment; ●—●, amino acids enrichment.



($250 \cdot 10^4$ bactéries. ml^{-1} et $650 \cdot 10^4$ bactéries. ml^{-1}), inférieur à une variation de puissance, est relativement peu significatif sur le plan bactériologique. Les valeurs correspondent à celles déjà mises en évidence dans des eaux côtières dessalées ou eutrophes, comprises entre $200 \cdot 10^4$ et $400 \cdot 10^4$ bactéries. ml^{-1} (Zimmermann, 1977; Wright, 1978; Hagström *et al.*, 1979). Kaneko *et al.* (1977) ont remarqué, au contraire, que les eaux hivernales de la mer de Beaufort sont moins riches en bactéries que les mêmes eaux en été. La différence de comportement des communautés bactériennes en automne et en hiver apparaît clairement sur les figures 1 et 2. En effet, lors de l'expérience de février, ni les numérations bactériennes, ni les valeurs d'ATP n'ont varié significativement au cours de l'expérimentation (fig. 1B et 2B). Le temps d'observation (24 h), n'a pas permis de mettre en évidence une réaction des populations bactériennes de cette eau hivernale, quelle que soit la source d'azote utilisée comme enrichissement.

Par contre, dans l'eau de l'expérimentation automnale, une véritable poussée bactérienne se déclenche (fig. 1A). La source d'azote fournie sous forme d'acides aminés, et qui apporte donc également du carbone, permet une croissance numériquement plus importante que lorsque l'azote est fourni seul (ammonium). Ce développement est rapide. Le temps de génération, estimé à partir de la courbe de croissance, est de 1,5 h pour le bac acides aminés et de 5 h pour le bac NH_4^+ .

Dans les deux cas, un temps de latence de 4 heures est nécessaire aux composants de la communauté bactérienne pour s'adapter aux enrichissements proposés.

Pendant cette phase de latence, les pics d'ATP (fig. 2A) démontrent la réaction immédiate des bactéries au stress appliqué. La présence d'un pic d'ATP pendant la phase de latence avait déjà été observée par Romano (1976) sur le phytoplancton. Mais, une partie des composants de la communauté bactérienne des bacs enrichis en azote ne peut profiter de cet enrichissement. Ceci se traduit par la

supériorité des taux d'AMP sur les taux d'ATP au long de l'expérimentation. Une telle hypothèse a déjà été émise par Romano (1975) en milieu marin, pour des populations phytoplanctoniques à tendance mono spécifique. L'élévation du rapport AMP/ATP a également été observée pour l'étude d'un phytoplancton lacustre (Amblard, 1978).

Par contre, en février, la quantité importante d'ATP toujours supérieure à celle d'AMP (fig. 3A et 3B), fait état d'une communauté stable, difficile à perturber, possédant une activité d'entretien élevée.

Sur le plan qualitatif, les deux communautés, hivernale et automnale, présentent avant enrichissement le même état diversifié ($\bar{H} = 3,85$ en septembre et $\bar{H} = 3,63$ en février). Cette structure de la communauté bactérienne est conforme à la loi d'écologie générale qui veut qu'en absence d'état de crise, ou état instable, toute communauté tende vers un état diversifié stable (Margalef, 1957).

Au cours des deux expérimentations, on observe une diminution de la diversité spécifique 24 h après l'enrichissement. Il convient cependant de noter que dans le bac témoin de l'expérience de septembre (tab. 2) et dans les trois bacs de l'expérience de février (tab. 1), les indices de diversité ont été calculés à partir de collections bactériennes d'effectifs décroissants entre T0 et T24. Or une diminution du nombre de souches isolées entraîne une diminution de \bar{H} (Mills, Wassel, 1980). Par conséquent la diminution d'une unité de \bar{H} observée lors de l'expérimentation de février et dans le bac témoin en septembre n'est pas significative.

Les variations de l'indice de diversité observées en septembre dans les bacs enrichis (fig. 4) sont significatives, le nombre de souches isolées étant toujours de l'ordre de 25 (tab. 2). La diminution de \bar{H} est égale ou supérieure à 1,5 unités, la prolifération d'espèces dominantes traduisant une spécialisation de la communauté. Cette évolution a déjà été rencontrée lors d'expériences de productions expérimentales de phytoplancton marin (Martin, Bianchi, 1980).

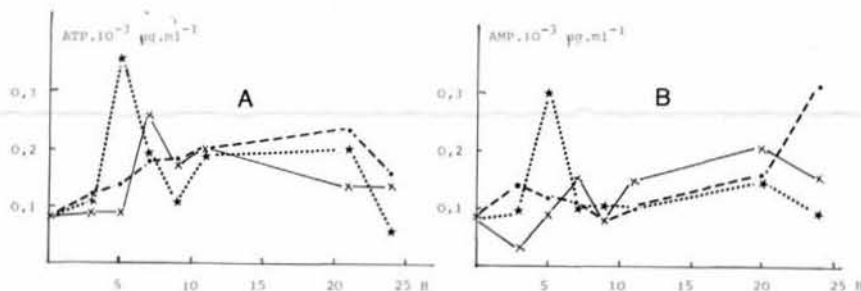


Figure 3

Dosage des adénosines 5' phosphates de l'expérience de février, dans les différents bacs. x—x, bac témoin; ★—★, bac enrichi en NH_4^+ ; ●—●, bac enrichi en acides aminés. Fig. 3A: ATP; Fig. 3B: AMP.

Adenosines 5' phosphates in winter experiment. Fig. 3A: ATP values; Fig. 3B: AMP values; x—x, blank; ★—★, NH_4^+ enrichment; ●—●, amino-acids enrichment.

Tableau 1

Mesure de l'indice de diversité de Shannon, dans les différents bacs au cours de l'expérience de février. n : nombre de souches testées ; \bar{H} : indice de Shannon.

Winter experiment (February 1980). Shannon diversity indices. n : number of tested strains ; \bar{H} : diversity index.

	T 0	T 24 AA	T 24 NH ₄ ⁺	T 24 T
\bar{H}	3,63	2,78	3,27	2,86
n	38	9	11	15

Tableau 2

Nombre de souches (n) isolées pour la mesure de l'indice de diversité de Shannon, dans l'expérience de septembre.

Number of isolated strains for Shannon diversity index measurement, in September experiment.

n	T 0	T 1	T 9	T 12	T 24
Bac T	30	13	12	10	8
Bac + NH ₄ ⁺		24	26	22	23
Bac + AA		19	28	20	25

CONCLUSION

De part leur nombre et leur diversité, les deux communautés hivernales et automnales présentent un état similaire si l'on se contente d'une simple observation ponctuelle. La différence de réactivité de ces deux communautés n'apparaît que par expérimentation : en appliquant un stress défini (enrichissement en azote) dans une masse d'eau délimitée (utilisation de bacs), en procédant à court terme

RÉFÉRENCES

- Amblard C., 1978. Applications du dosage des adénosines 5' phosphate à l'étude d'un phytoplancton lacustre (Lac Pavin), *Thèse 3e cycle, Univ. Clermont II*.
- Baleux B., Caumette P., Trousselier M., 1979. Numération et approche qualitative des populations bactériennes des lagunes aménagées de Certes (Arcachon). I Bactéries hétérotrophes aérobies, *Publ. Sci. Tech. CNEOX, Actes Colloq.*, 7, 503-508.
- Hagström A., Larsson U., Hörstedt P., Normark S., 1979. Frequency of dividing cells, a new approach to the determination of bacterial growth rates in aquatic environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 37, 805-812.
- Hobbie J. E., Daley R. J., Jasper S., 1977. Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy, *Appl. Environ. Microbiol.*, 33, 1225-1228.
- Holm Hansen O., Booth C. R., 1966. The measurement of adenosine triphosphate in the ocean and its ecological significance, *Limnol. Oceanogr.*, 11, 510-519.
- Kaneko T., Atlas R. M., Krichevsky M., 1977. Diversity of bacterial populations in the Beaufort Sea, *Nature*, 270, 596-599.
- Laborde P., 1972. L'adénosine triphosphate des microorganismes marins planctoniques. Rapport avec la biomasse et la productivité primaire, *Thèse Doct., Univ. Aix-Marseille II*, 108 p.
- Lasserre P., 1979. Programme coordonné Écotron sur le site d'Arcachon (Aquitaine, France) : contrôle de la production biologique marine dans un écosystème lagunaire aménagé (réservoirs à poissons) ; bilan, synthèses et perspectives, *Publ. Sci. Tech. CNEOX, Actes Colloq.*, 7, 463-502.

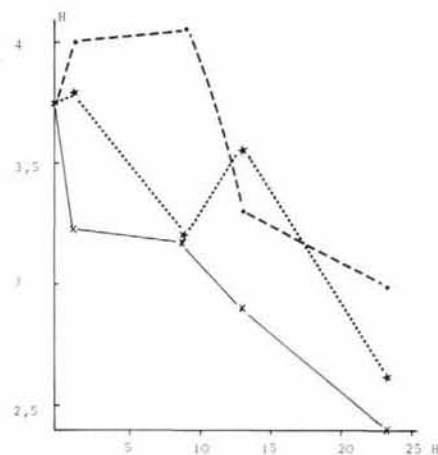


Figure 4

Mesure de l'indice de diversité de Shannon, dans les différents bacs au cours de l'expérience de septembre. x—x, bac témoin ; ★—★, bac enrichi en NH₄⁺ ; ●—●, bac enrichi en acides aminés.

Fall experiment (September 1980). Shannon diversity index. x—x, blank ; ★—★, NH₄⁺ enrichment ; ●—●, amino acids enrichment.

avec des pas d'échantillonnage serrés, et en utilisant une diversité de paramètres descriptifs.

En automne l'ampleur et la rapidité de réponse de la communauté confirme son aptitude à profiter des conditions créées par une crise dystrophique, et éventuellement à l'accroître.

En février, la communauté, numériquement et de par son comportement, ne réagit pas à l'enrichissement en azote. Les taux d'ATP supérieurs à ceux d'AMP confirmeront la stabilité en un état diversifié de cette communauté, qui ne réagit pas, du moins à court terme, à l'enrichissement en azote.

Cette étude de la réactivité microbienne aux stress les plus fréquents fournit des renseignements permettant de prévoir et d'éviter le développement d'états de crise entraînant les phénomènes de mortalité massive dans les zones d'aquaculture.

- Margalef R., 1957. Information theory in ecology, *Mem. Acad. Ci. Artes Barcelona*, 23, 373-449.

Martin Y. P., Bianchi M. A., 1980. Structure, diversity and catabolic potentialities of aerobic heterotrophic bacterial populations associated with continuous cultures of natural marine phytoplankton, *Microbiol. Ecol.*, 5, 265-279.

Mills A. L., Wassel R. A., 1980. Aspects of diversity measurement for microbial communities, *Appl. Environ.*, 40, 578-586.

Oppenheimer C. H., 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.

Romano J. C., 1975. Les adénosines 5'-phosphate chez les algues planctoniques en culture et en zone eutrophe (Golfe de Fos). Signification métabolique et écologique, *Thèse Doct. 3e cycle, Univ. Aix-Marseille II*.

Romano J. C., 1976. Contribution à l'étude de la phase de latence dans des cultures d'algues planctoniques. II. Modifications dans les rapports entre les pigments, les nucléotides adényliques (ATP, ADP, AMP) et les acides ribonucléiques, *C. R. Soc. Biol.*, 170, 1069-1074.

Wright R. T., 1978. Measurement and significance of specific activity in the heterotrophic bacteria of natural waters, *Appl. Environ.*, 36, 297-305.

Zimmermann R., 1977. Estimation of bacterial number and biomass by epifluorescence microscopy and scanning electron microscopy, in : *Microbial ecology of brackish water environment*, edited by G. Rheinheimer, 103-118.