

45

NUTRITION EXPERIMENTALE : PROBLEMES METHODOLOGIQUES LIES A L'UTILISATION DES MICROORGANISMES COMME SOURCE TROPHIQUE

L. GUIDI

Laboratoire Arago 66650 BANYULS-SUR-MER, (FRANCE)

RÉSUMÉ - La compréhension des interactions trophiques existant entre les petits invertébrés benthiques non filtreurs et les microorganismes (auto- et hétérotrophes) passe dans la plupart des cas par l'expérimentation en laboratoire. Des souches pures isolées du sédiment, et maintenues en culture sont alors offertes aux consommateurs étudiés. Le présent travail traite des différents problèmes techniques rencontrés dans ces conditions, et liés à l'éthologie alimentaire des invertébrés étudiés ainsi qu'à leur taille. Utilisant 2 cultures pures de *Pseudomonas* et *Navicula*, il est montré que ces microorganismes sont capables de se fixer sur des supports inertes artificiels (billes de verre) ou naturels (grains de sable). Les meilleures fixations sont observées sur le sable (jusqu'à 4.8×10^8 cell.g⁻¹ sec.). L'intensité du marquage radioactif de ces microorganismes dépend de la forme sous laquelle l'isotope (¹⁴C) est introduit dans la culture, ainsi que de l'instant et de la durée du marquage. Alors que 70 % de l'isotope est incorporé de façon stable par les diatomées, le démarquage rapide des bactéries dont le rendement de marquage maximal n'est que de 34%, semble inévitable lorsqu'on les transfère du milieu de culture en eau de mer.

Mots clés : nutrition, méthodologie, microorganismes benthiques, adhésion, marquage radioactif.

ABSTRACT - The trophic relations between small deposit feeding invertebrates and microorganisms are usually studied in the laboratory where pure cultures of auto-and heterotrophic microorganisms, isolated from the sediment, are offered to the consumers. The present study deals with different technical problems encountered under these conditions, and in relation to the feeding behavior and the size of the invertebrates studied. Using 2 pure cultures of *Pseudomonas* and *Navicula*, it was shown that these microorganisms will attach to artificial (glass beads) and natural (sand grains) substrates. Best microbial attachment was observed on sand (up to 4.8×10^8 cells.g⁻¹ dry wt.). The radioactive labelling of the microorganisms depends not only on the form under which the isotope (¹⁴C) is supplied to the cultures, but also on the time and the duration of the labelling. 70% of the isotope was incorporated in a stable manner by the diatoms. The bacteria incorporated, at most, 34% of the ¹⁴C available in the cultures, and very rapidly lost an important fraction of their label when they were transferred to sea water.

Key words : nutrition, methodology, benthic microorganisms, attachment, ¹⁴C-labelling.

INTRODUCTION

La compréhension des interactions trophiques existant entre les invertébrés marins et les microorganismes (auto- et hétérotrophes), passe dans la plupart des cas par l'expérimentation en laboratoire. Des souches isolées du milieu sont alors offertes aux organismes dont on étudie la nutrition. Par exemple, dans le cadre d'expérience de "choix" où diverses souches pures de bactéries et diatomées sont offertes simultanément, Vanden Berghe & Bergmans (1981) et Rieper (1982) ont pu montrer que certains copépodes harpacticoïdes font preuve d'une grande sélectivité à l'égard de certaines souches bactériennes.

Selon l'éthologie alimentaire (filtreurs, brouteurs d'épistrates, mangeurs de dépôts...) et la taille des organismes étudiés, certains problèmes méthodologiques se posent à l'expérimentateur. En premier lieu, il convient de présenter la nourriture sous une forme aussi proche que possible de celle rencontrée par l'animal dans la nature. Par exemple, à un organisme benthique non filtreur seront offertes des sources trophiques "sédimentées" ou "fixées" sur des supports. En second lieu, parce que la méthode la plus fiable permettant à la fois d'identifier et de quantifier la nourriture consommée est basée sur l'utilisation de traceurs radioactifs (Sorokin, 1968 ; Conover & Francis, 1973...), il convient de marquer les sources trophiques, le marquage devant être uniforme, stable dans le temps et d'autant plus élevé que la taille des consommateurs diminue.

Dans le présent travail, préliminaire à l'étude de la nutrition d'organismes benthiques non filtreurs de petite taille (méiofaune), nous avons testé la capacité de fixation de microorganismes sur des substrats inertes tels que billes de verre et grains de sable, ainsi que les conditions optimales de leur marquage et l'évolution de ce marquage dans le temps.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Deux souches pures isolées à partir du sédiment ont été utilisées dans cette étude : -une bactérie du genre *Pseudomonas*, et une diatomée du genre *Navicula*. Les souches sont cultivées à 20°C en milieu liquide : Zobell 2216 (Oppenheimer & Zobell, 1952) à l'obscurité pour les bactéries, et F/2 (Guillard & Ryther, 1962) en cycle jour/nuit (12/12h) pour les diatomées. Les comptages bactériens sont effectués par étalement sur milieu solide (1.5% agar) après dilutions successives en eau de mer stérile. Les diatomées sont dénombrées au microscope sur cellule de Thoma après fixation au lugol.

Présentation de la nourriture

Du fait de leur taille (16.5 μm x 6.45 μm), les diatomées sédimentent rapidement et ne posent pas de problème majeur de présentation. En revanche, les bactéries, plus petites (3.9 μm x 1.4 μm), tendent à rester en suspension, et une étude de fixation sur divers supports a dû être menée. Les supports utilisés se composent de billes de verre et grains de sable dont la médiane est proche de celle du sédiment habité par les consommateurs étudiés (230 μm).

Une première étude est menée en fonction du temps sur des billes de 250 μm de médiane. Au temps 0, 10 tubes à essai contenant 5 ml de milieu de culture et 1 g sec de "support" sont inoculés avec 2×10^6 bactéries. Après différents temps d'incubation (3 heures à 6 jours), le milieu de culture est éliminé et les billes rincées délicatement. Après agitation vigoureuse et prolongée (5 à 10 mn), les bactéries "fixées" sont comptées.

Une seconde étude est menée en fonction de la nature du support sur des billes de verre de 250 μm de médiane, des billes de verre concassées (200 μm de médiane) et du sable dépourvu de matière organique (4 h à 400°C) de 230 μm de médiane. Au temps 0, 3 flacons contenant 20 g secs de "support" et 10 ml de milieu de culture sontensemencés avec 5×10^5 bactéries. Après 48 h, les "supports" sont rincés et les bactéries "fixées" comptées.

Marquage des sources trophiques

Il s'agit de déterminer à quel instant et sous quelle forme l'isotope radioactif (^{14}C) doit être introduit dans la culture pour que son incorporation soit optimale. L'isotope ($200\mu\text{Ci.l}^{-1}$) est fourni soit sous la forme de ^{14}C -acide glutamique, soit sous la forme de ^{14}C -glucose aux bactéries, et sous la forme de ^{14}C -bicarbonate aux diatomées. Au temps

0, 2 séries de 4 flacons (a,b,c,d) contenant chacun 50 ml de milieu de culture sont inoculés, l'une avec 5×10^5 bactéries. flacon⁻¹, l'autre avec 3.7×10^6 diatomées. flacon⁻¹. Le ¹⁴C-acide glutamique est introduit à to + 2 h (flacon a) et à to + 24 h (flacons b et c). De la peptone (nutriment) est également ajoutée à la culture c à to+ 24h. Le ¹⁴C-glucose est introduit dans la culture d à to + 24 h. Le ¹⁴C-bicarbonate est fourni aux diatomées à to (flacon a), to + 2 j (flacon b) et à to + 7 j (flacons c et d). Un mélange de nutriments ($\text{NaNO}_3 + \text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{NaHSiO}_3$) est également ajouté à la culture c à to + 7 j. Après différents temps d'incubation (5 à 72 h pour les bactéries et 1 à 9 j pour les diatomées), 1 ml de chaque culture, préalablement agitée, est filtré sur une membrane Nuclepore (polycarbonate) de $0.2 \mu\text{m}$ de porosité. Les cellules ainsi retenues sont rincées à l'eau de mer stérile, et leur activité (DPM cell.) mesurée à l'aide d'un appareil à scintillation liquide (Bekman LS 7000) après dissolution complète du filtre dans du Soluene 100 (Packard) et mélange de la solution au liquide scintillant (Instagel, Packard). Une numération cellulaire est effectuée en parallèle. Les mesures (2 à 3 par flacon et par temps) permettent de calculer le rendement de marquage, c'est-à-dire le rapport de l'activité incorporée dans les cellules à un instant donné, à la quantité de radioactivité introduite dans la culture au moment du marquage : $\% \text{Rendement} = (\text{DPM cell.} / \text{DPM intro.}) \times 100$.

Évolution du marquage

Avant toute expérience de nutrition, il est nécessaire de laver les cultures marquées, afin d'éliminer la radioactivité extracellulaire. Elles sont ensuite placées en eau de mer stérile. Bien que la durée des expériences de nutrition soit en général courte (quelques heures), des pertes non négligeables d'activité cellulaire (dialyse, respiration) pourraient survenir du fait du changement de milieu. Nous avons donc suivi l'évolution de la radioactivité cellulaire et extracellulaire (sous formes dissoute et gazeuse) dans ces conditions pendant 10 h pour les 2 souches bactérienne et algale.

Au temps 0, une quantité connue de cellules marquées (6×10^8 bactéries et 3.2×10^6 diatomées) est introduite dans un flacon de culture contenant 50 ml d'eau de mer et recevant par bullage un air dépourvu de CO_2 (après passage dans de la potasse). Le flacon est bouché et relié à un système capteur de CO_2 composé de 2 récepteurs en série contenant l'un de l'éthanolamine, l'autre de la potasse. Après différents temps d'incubation (1 à 10 h), les flacons sont agités et des prélèvements de 1 ml effectués. Dans le flacon de culture sont mesurées la concentration cellulaire, l'activité cellulaire (protocole précédent) et l'activité extracellulaire présente sous forme dissoute (le filtrat rincé du ml filtré pour mesurer l'activité cellulaire est mélangé à de l'Instagel). Dans les flacons capteurs de CO_2 est mesurée l'activité perdue par les cellules sous forme gazeuse. L'aliquot d'éthanolamine est mélangé à du toluène PPO-POPOP (liquide scintillant) après solubilisation dans du méthanol. L'aliquot de potasse est mélangé à de l'Instagel.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Présentation de la nourriture

- Fixation en fonction du temps (fig. 1)

La figure 1 montre que le nombre de bactéries "fixées" augmente au cours des 24 premières heures d'incubation (maximum : 1.9×10^8 bactéries.g⁻¹), se maintient aux alentours de 10^8 bactéries.g⁻¹ jusqu'au 3^e jour, puis diminue.

Marshall *et al.* (1971) et Fletcher (1977, a, b) qui ont étudié la fixation du genre *Pseudomonas*, remarquent une fixation optimale à 20°C en phase exponentielle de

croissance. Meadows (1965) précise que de nombreuses fixations apparaissent dès la 3^e heure de culture. Toutefois, les bactéries cultivées en laboratoire semblent toujours se fixer de façon réversible et sont facilement récupérables. Pour les expériences de nutrition, afin d'obtenir une teneur maximale en bactéries "fixées", il est donc nécessaire de travailler dans les trois premiers jours de culture.

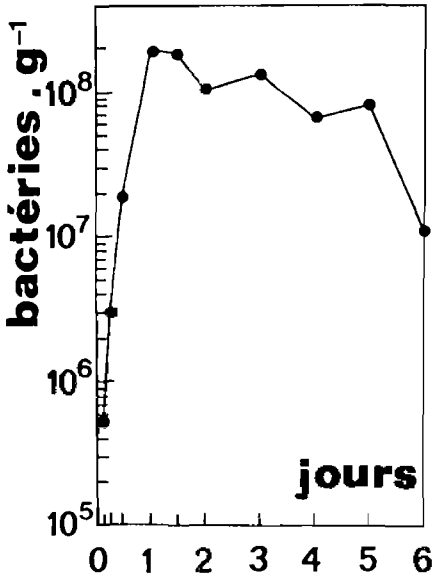


Figure 1 : Evolution du nombre de bactéries (*Pseudomonas*) "fixées" par g sec de billes de verre (médiane 250 µm) en fonction de la durée de la culture en tubes à essai contenant 5 ml de milieu et 1 g sec de billes. Au temps 0, l'inoculum était de 2 x 10⁶ bactéries.

- Fixation en fonction de la nature du "support" (Tableau I)

Le tableau I montre que la fixation la meilleure est obtenue sur le sable, ensuite sur les billes de verre concassées, puis sur les billes de verre sphériques.

Support	Billes de verre	Billes de verre concassées	Grains de sable
Médiane (µm)	250	200	230
Bactéries. g ⁻¹	2.8 x 10 ⁷	1.2 x 10 ⁸	4.8 x 10 ⁸

Tableau I : Teneur en bactéries (*Pseudomonas* "fixées" de 3 "supports" différents après 48 h de culture dans des flacons contenant 10 ml de milieu et 20 g secs de "supports". Au temps 0, l'inoculum était de 5 x 10⁵ bactéries

Avec la diminution de la taille des "supports" il y a augmentation de la surface colonisable par unité de poids de "supports". Ceci pourrait expliquer l'augmentation d'un ordre de grandeur de bactéries "fixées" entre les billes de 250 µm et le sable (230 µm) ou les billes concassées (200 µm). Toutefois, les billes concassées dont la médiane est inférieure à celle du sable apparaissent légèrement moins colonisées que ce dernier. Fletcher (1977,b) note que l'attachement qui dépend du type de support est relativement médiocre sur le verre par rapport au polystyrène par exemple. Des différences dans les charges de surface entre le verre et le sable, ou la forme-même des supports (présence de nombreuses aspérités sur les grains de sable) pourraient expliquer ces différences.

Pour les expériences de nutrition, afin d'obtenir une teneur maximale en bactéries "fixées", il convient donc d'utiliser des grains de sédiment comme "supports".

Marquage des sources trophiques (fig. 2 et 3)

Les figures 2 et 3 montrent pour les 2 souches bactérienne et algale, que le rendement de marquage est fonction du moment auquel l'isotope a été introduit dans la culture. D'une manière générale, il reste faible (< 30%) lorsque l'isotope est introduit en début (courbes a) ou en fin (courbe d, fig. 3) de culture. L'addition de nutriments améliore un peu (courbe c, fig. 3) ou pas du tout (courbe c, fig. 2) le rendement. Ce dernier est maximal (34% pour les bactéries et 70% pour les diatomées) en fin de phase exponentielle de croissance lorsque l'isotope a été introduit 24 h après le début de la culture bactérienne et 2 j après le début de la culture algale. Le ^{14}C -glucose (courbe d, fig. 2) est nettement moins bien incorporé (rendement maximal : 10%) par *Pseudomonas* que le ^{14}C -acide glutamique. D'autres auteurs (Duncan *et al*, 1974) ont toutefois mesuré un rendement de 40% pour *Acinetobacter* marqué à l'aide ^{14}C -glucose dans des conditions similaires.

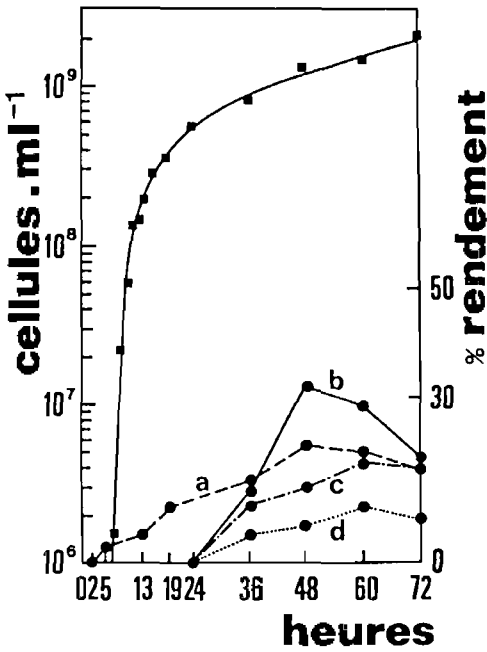


Figure 2 : Etude du marquage des bactéries (*Pseudomonas*). Pour les 4 cultures (a, b, c, d), marquées à l'aide de ^{14}C -acide glutamique à $t_0 + 2\text{h}$ (a) et $t_0 + 24\text{h}$ (b, c) et de ^{14}C -glucose à $t_0 + 24\text{h}$ (d), l'évolution de la concentration cellulaire (■) et du rendement de marquage (●) est suivie au cours du temps. A $t_0 + 24\text{h}$, en plus du traceur, la culture c a été enrichie de peptone. (Inoculum au temps 0 = 10^4 bactéries.ml $^{-1}$).

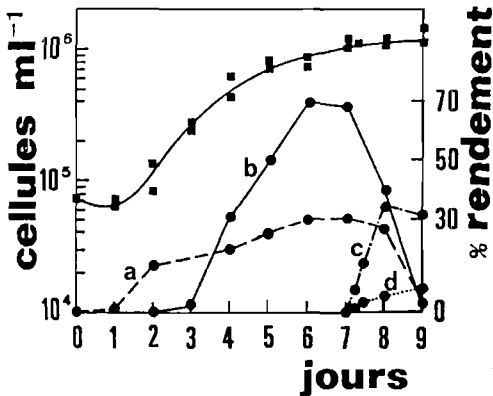


Figure 3 : Etude du marquage des diatomées (*Navicula*). Pour les 4 cultures (a, b, c, d) marquées à l'aide de ^{14}C -bicarbonate à t_0 (a), $t_0 + 2\text{j}$ (b) et $t_0 + 7\text{j}$ (c, d), l'évolution de la concentration cellulaire (■) et du rendement du marquage (●) est suivie au cours du temps. A $t_0 + 7\text{j}$, en plus du traceur, la culture c a reçu un mélange de nutriments.

Pour les expériences de nutrition, afin d'obtenir un marquage relativement élevé des bactéries, il convient donc de les marquer à l'aide d'un acide aminé (tel que le ^{14}C -acide glutamique) qui est vraisemblablement incorporé dans la structure cellulaire en quantités supérieures au glucose dont une part non négligeable risque d'être perdue par respiration. Le marquage se fera 24 h après le début de la culture qui sera utilisée 24 h plus tard. Les diatomées seront marquées 2 j après le début de la culture et utilisées 4 j plus tard.

Évolution du marquage (fig. 4 et 5)

- Bactéries (fig. 4)

La concentration en bactéries dans le flacon reste constante pendant toute la durée de l'expérience. En revanche, l'activité cellulaire évolue rapidement : elle diminue d'environ 33 % dans la 1^{re} heure, augmente à nouveau à 3 h (elle représente alors 85% de l'activité initiale) et se stabilise aux alentours de 78% de l'activité initiale à partir de la 5^e heure. De ce fait, l'activité extracellulaire "dissoute" suit une évolution inverse. Le CO_2 rejeté (3% à 10 h) augmente régulièrement.

Il ressort donc de cette étude que le marquage des bactéries varie de façon importante au cours des 5 premières heures d'expérience. Le passage d'un milieu riche (Zobell) à un milieu pauvre (eau de mer) semble avoir un effet de stress sur les cellules. Un comportement similaire a été observé chez des bactéries du genre *Lactobacillus* par Amouroux (1982). Pour les études de nutrition, afin de se placer dans des conditions de marquage stable des sources trophiques, il convient donc d'attendre environ 5 h avant d'introduire les consommateurs, ou comme Vanden Berghe & Bergmans (1981) de tuer les microorganismes après les avoir marqués.

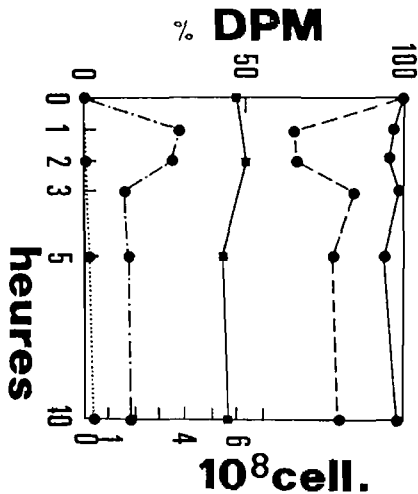


Figure 4 : Evolution au cours du temps du nombre et du marquage des bactéries après élimination du milieu de culture et passage en eau de mer stérile. (—■— : nombre total de cellules dans 50 ml; - -●- : activité cellulaire; - -▲- : activité extracellulaire "dissoute"; - -◆- : activité extracellulaire "gazeuse"; —◆— : activité totale = somme des activités cellulaires et extracellulaires).

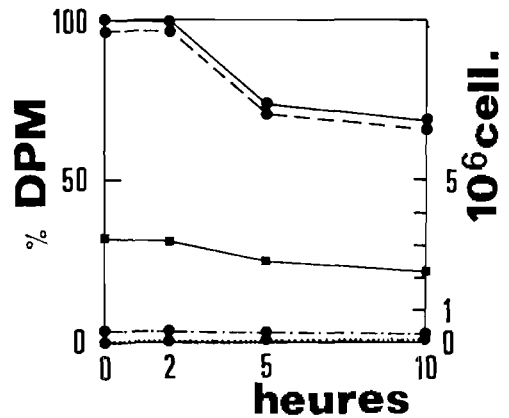


Figure 5 : Evolution au cours du temps du nombre et du marquage des diatomées après élimination du milieu de culture et passage en eau de mer stérile. (—■— : nombre total de cellules dans 50 ml; - -●- : activité cellulaire; - -▲- : activité extracellulaire "dissoute"; - -◆- : activité extracellulaire "gazeuse"; —◆— : activité totale = somme des activités cellulaires et extracellulaires).

- Diatomées (fig. 5)

Après 10 h d'expérience, on constate qu'environ 31% des cellules initialement présentes dans le flacon ont disparu (3.2×10^6 au temps 0 contre 2.2×10^6 à 10 h). Parallèlement, on observe une diminution de l'activité cellulaire (perte d'environ 30% à 10 h). En revanche, l'activité extracellulaire "dissoute" reste constante de 0 à 10 h (perte < 1%). Il en résulte une diminution de l'activité totale dans le flacon, qui n'est pas compensée par les faibles pertes "gazeuses".

Comme en témoignent les mesures d'activités extracellulaires, le marquage des diatomées reste constant pendant toute la durée de l'expérience. La diminution apparente de l'activité cellulaire est à mettre en relation avec la disparition des cellules. Celle-ci, très nette à partir de la 2^e heure, pourrait être due à des phénomènes de fixation. Certains auteurs notent en effet que les diatomées sont capables de se fixer (Cooksey, 1981) de façon plus ou moins importante selon leur état physiologique (Lopez & Levinton, 1978) et selon le substrat (Sieburth, 1975).

CONCLUSIONS

La présente étude a permis de montrer qu'il était possible de "fixer" les microorganismes sur différents "supports" avant de les offrir comme nourriture à des invertébrés benthiques non filtreurs. L'intensité du marquage radioactif de ces microorganismes dépend de la forme sous laquelle l'isotope est introduit dans la culture, ainsi que de l'instant et de la durée du marquage. Alors qu'il est possible d'aboutir à un marquage élevé et stable des diatomées, le démarquage des bactéries après passage en eau de mer stérile semble inévitable.

Bien qu'il fasse rarement l'objet de publications, un travail technique tel que celui-ci se révèle nécessaire avant toute expérience de nutrition afin de travailler dans des conditions optimales.

AMOUROUX J.M., 1982. Ethologie, filtration, nutrition bilan énergétique de *Venus verrucosa* Linné (Bivalves). Thèse Doc. es-Sci., Univ. P. M. Curie. Paris 99 p.

COOKSEY K.E., 1981. Requirement of calcium in adhesion of a fouling diatom to glass. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 1378-1382.

DUNCAN A., F. SCHIEMER & R.Z. KLEKOWSKI, 1974. A preliminary study of feeding rates on bacterial food by adult females of a benthic nematode, *Plectus palustris* de Man 1880. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, 2 : 249-258.

CONOVER R.J., & V. FRANCIS., 1973. The use of radioactive isotopes to measure the transfer of materials in aquatic food chains. *Mar. Biol.*, 18 : 272-283.

FLETCHER M., 1977. a. The effect of culture concentration and age, time and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can. J. Microbiol.*, 23 : 1-6.

FLETCHER M., 1977. b. Attachment of marine bacteria to surfaces. *Microbiology*, : 407-410.

GUILLARD R.R.L., & J.H. RYTHER, 1962. Studies on marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* Cleve Gran. *Can. J. Microbiol.*, 8 : 229-239.

LOPEZ G.R. & J.S. LEVINTON, 1978. The availability of microorganisms attached to sediment particles as food for *Hydrobia ventrosa* (Montagu) (Gastropoda : Prosobranchia). *Oecologia (Berlin)*, 32 : 263-275.