

## Caractérisation des communautés bactériennes épiphytes de frondes de *Laminaria digitata* et de débris résultant de leur fragmentation.

Sophie Corre(1), Daniel Prieur(3), Simone Chamroux(3),  
Jean-Yves Floch(2) & Annick Hourmant(2).

(1) Laboratoire de Zoologie.

(2) Laboratoire de Physiologie Végétale, Université de Bretagne Occidentale, 29287 Brest Cedex, France.

(3) Station Biologique CNRS LP 4601, 29211 Roscoff, France.

**Résumé :** Des échantillons d'algue sont prélevés en hiver et au printemps sur la côte bretonne atlantique (France) à 3 niveaux d'une fronde de *Laminaria digitata* (tissu jeune, adulte et âgé) et sur des débris résultant de sa fragmentation. Les peuplements bactériens associés à ces différents niveaux sont comparés et la teneur en ATP de l'algue est déterminée, à titre d'indicateur de l'état physiologique des tissus. Elle est maximale dans le tissu jeune (55 nmoles g<sup>-1</sup>MF) et passe à 9 nmoles g<sup>-1</sup>MF dans les débris, témoignant d'une diminution du nombre de cellules algales métaboliquement actives. Les densités (3,6 x 10<sup>7</sup> bactéries cm<sup>-2</sup> en moyenne sur les débris), l'activité métabolique (Ima = 7,14 sur les débris) et la diversité spécifique (E = 0,57 sur les débris) des peuplements bactériens sont plus élevées sur les tissus détériorés (tissu âgé et débris) que sur les tissus sains (jeune et adulte) (tissu jeune : 2,8 x 10<sup>7</sup> bactéries cm<sup>-2</sup> en moyenne, Ima = 2,05, E = 0,06). Ces observations ont été rapportées à la progression du tissu néoformé en zone stipofrontale le long de la lame. La colonisation des tissus détériorés serait favorisée par la libération constante de matière organique dissoute lors de la lyse des cellules algales par érosion des extrémités des frondes, alors que celle des surfaces saines de l'algue serait tributaire de la physiologie de l'algue (production tissulaire et variation saisonnière des composés spécifiques entrant dans la composition du mucilage).

**Abstract :** Algal samples from different parts of the frond of *Laminaria digitata* (young, adult and aged tissues) and from macroscopic fragments naturally separated from the thallus were collected on the Atlantic coast of France (Brittany) during winter and spring. Bacterial communities associated with the different levels were compared and ATP content determined, as an indicator of the physiological state of the tissues. It is higher in the young tissues (55 nmoles g<sup>-1</sup>f.w.) than in fragments (9 nmoles g<sup>-1</sup> f.w.), showing a decrease of metabolically active cell number. Bacterial density (3,6 x 10<sup>7</sup> bacteria cm<sup>-2</sup> in average on fragments), metabolic activity (Ima = 7,14 on fragments) and specific diversity (E = 0,57 on fragments) were higher on deteriorated tissues (aged and fragments) than on healthy tissues (young and adult) (young tissue : 2,8 x 10<sup>7</sup> bacteria cm<sup>-2</sup>, Ima = 2,05, E = 0,06). These observations have been correlated to the progression of stipofrontal new tissue along the frond. Bacterial colonization on deteriorated tissues may be due to a leakage of dissolved organic compounds during erosion of the distal part of the frond ; on the other hand, the colonization of healthy surfaces could depend on algal physiology (production of tissue and seasonal variations of mucilage specific compounds).

### INTRODUCTION

Les macrophytes marines produisent de larges surfaces qui, non seulement permettent la concentration de composés organiques par adsorption, mais sont aussi le site de relargage de composés organiques dissous résultant du métabolisme de l'algue (Majak *et al.* 1966 ; Khailov & Burlakova, 1969 ; Sieburth, 1969 ; Brylinsky, 1977 ; Hatcher *et al.* 1977 ; Johnston *et al.*, 1977 ; Newell *et al.*, 1980 ; Lucas *et al.*, 1981). Elles constituent donc un substratum extrêmement favorable au développement de bactéries hétérotrophes, comme l'ont montré plusieurs auteurs sur des espèces appartenant aux trois phyllums algaux (Chan & Mac Manus, 1969 ; Laycock, 1974 ; Sieburth *et al.*, 1974 ; Cundell *et al.*, 1977 ; Kong &

Chan, 1979 ; Mazure & Field, 1980 ; Shiba & Taga, 1980 ; Sieburth & Tootle, 1981 ; Lakshmanaperumalsamy & Purushothaman, 1982).

Parmi les algues brunes, les laminaires présentent dans plusieurs régions du monde une biomasse importante qui permet le développement de communautés bactériennes tant planctoniques que fixées, pendant la phase de croissance des algues immergées et la phase de dégradation des thalles échoués à la côte (Laycock, 1974 ; Mazure & Field, 1980 ; Linley *et al.*, 1981 ; Lucas *et al.*, 1981 ; Stuart *et al.*, 1981 ; Koop *et al.*, 1982 a, b ; Linley & Field, 1982).

Cependant, si l'impact de ces communautés bactériennes sur le milieu environnant a été suivi dans les travaux évoqués ci-dessus, leur évolution quantitative et qualitative au cours du vieillissement d'une fronde d'algue et de sa fragmentation *in situ* est peu connue. De plus, aucun travail de ce type n'a été réalisé sur les côtes européennes.

Sur les seules côtes de Bretagne (France), ces champs de grandes algues couvrent une superficie de fonds rocheux de 1 000 km<sup>2</sup>, pour une biomasse algale totale d'environ 10 millions de tonnes fraîches, dont 95 % sont représentées par dix espèces (Chassé *et al.*, 1982). L'une des espèces dominantes, *Laminaria digitata* L. (Lamouroux), qui présente les avantages d'une production primaire élevée (2,04 kg MS.m<sup>-2</sup>.an<sup>-1</sup>), d'une accessibilité aux basses mers de vives eaux et d'une distinction possible de tissus d'âges différents, a été choisie pour ce travail.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Site d'étude et échantillonnage

Les prélèvements ont été effectués à basse mer sur une période de quatre mois, de janvier à avril 1984. Le site sélectionné, en rade de Brest (48°25' N ; 4°34' W) (Fig. 1), présente un faciès rocheux et un mode moyennement battu. Trois niveaux d'échantillonnage ont été retenus sur la fronde, car représentatifs de l'âge des tissus de l'algue : zone stipofrontale (tissu jeune), zone médiane (tissu adulte) et extrémités distales (tissu sénescant) ; un quatrième échantillon correspond aux débris résultant de la fragmentation naturelle de la fronde (5 à 10 cm<sup>2</sup>), ramassés dans les flaques de la partie médiolittorale inférieure. Pour le dosage de l'ATP, le thalle est rapporté entier au laboratoire. Dans le cas de l'étude bactériologique, les échantillons sont découpés sur le terrain à l'emporte-pièce aux différents niveaux choisis et transportés soit dans de l'eau de mer stérile, soit dans une solution de glutaraldéhyde, selon l'analyse envisagée.

### Dosage de l'ATP

L'adénosine triphosphate (ATP) contenu dans le tissu algal est dosé, à titre d'indicateur de l'état physiologique de ses tissus. De façon à évaluer une éventuelle surestimation des

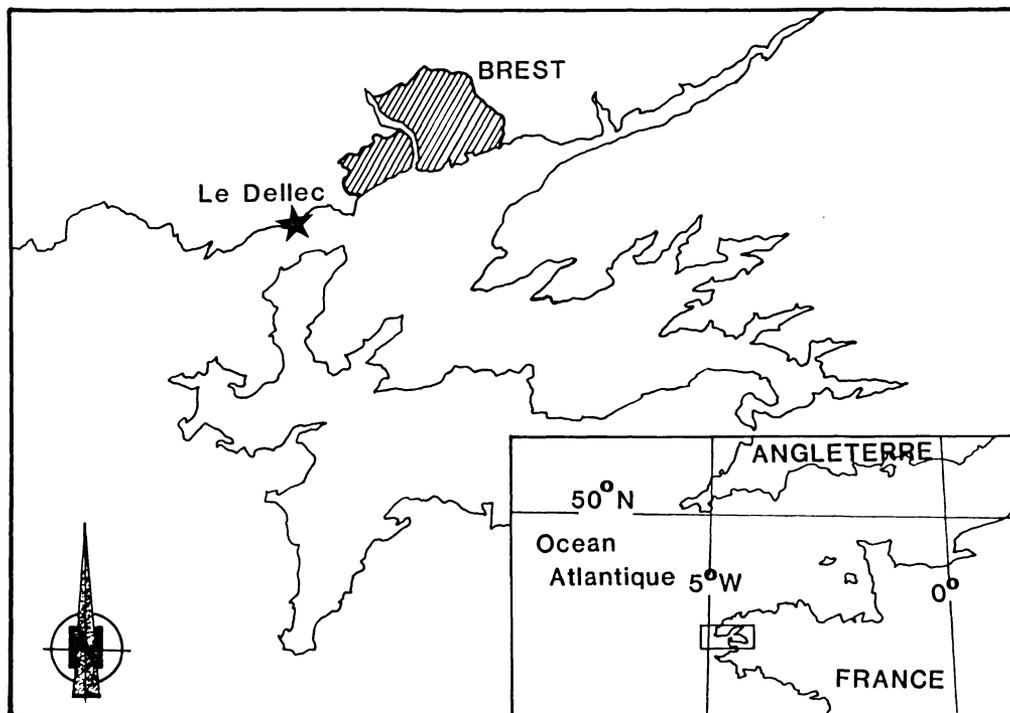


Fig. 1- Carte de la rade de Brest montrant la localisation du site de prélèvement.

teneurs, liée à la présence des bactéries, l'ATP est dosé, d'une part dans le tissu algal porteur de sa microflore associée et d'autre part dans cette microflore seule.

Les pièces d'algue après leur découpage sont rapidement pesées, fixées à l'azote liquide puis broyées durant 30 s dans un broyeur Dangoumau, dont les pots sont préalablement refroidis dans l'azote liquide. Les bactéries sont décrochées des surfaces d'algue par passage au stomacher et récupérées sur des filtres Nuclepore de porosité 0,2  $\mu\text{m}$ . Les mesures, effectuées aux mois de mars et avril, portent, pour chacun des niveaux étudiés, sur 7 à 9 échantillons d'algues et sur 2 suspensions bactériennes.

L'extraction des composés phosphorylés est réalisée, selon la méthode de Hourmant *et al.* (1979), par addition d'acide trichloracétique (TCA) 0,6 M dans l'éther. Après centrifugation (10 mn, 12 000 tr/mn, 2°C), une nouvelle extraction est effectuée (sur le culot de centrifugation et sur les bactéries) par du TCA 0,1M dans l'eau. Les deux types d'échantillons (algue et bactéries) sont ensuite centrifugés (10 mn, 12 000 tr/mn, 2°C).

Le dosage porte sur la fraction soluble débarrassée du TCA par agitation et décantation en présence d'éther. Les extraits sont ajustés à un pH compris entre 5,5 et 6. L'ATP est dosé à l'aide d'un nucléotimètre (type 107 CLV Interbio) selon la méthode de Pradet (1967) : un mélange de luciférine-luciférase produit une réaction lumineuse dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ATP présente dans le milieu réactionnel.

## Analyse bactériologique quantitative

### Numérations en microscopie électronique à balayage

Cette technique a été choisie en raison des difficultés que posait l'utilisation de la microscopie photonique. Cette dernière n'était en effet pas satisfaisante, compte tenu de la fluorescence naturelle de l'algue (lorsque le fluorochrome utilisé était l'acridine orange) et des densités de sa microflore associée (lorsque le fluorochrome utilisé était le DAPI). De plus, la microscopie électronique à balayage (MEB) a été utilisée par plusieurs auteurs pour dénombrer les bactéries associées aux algues (Sieburth & Tootle, 1981 ; Koop *et al.*, 1982 a) ou à des surfaces inertes (Caron & Sieburth, 1981 ; Bryant *et al.*, 1983 ; Fera *et al.*, 1989).

Les pièces d'algue d'une surface moyenne de 0,4 cm<sup>2</sup> sont fixées au glutaraldéhyde à 2,5 %. Pour favoriser sa pénétration dans les tissus, la solution est préparée dans de l'eau de mer tamponnée à pH 7,2 stérile, filtrée (0,2 µm). Elle est composée d'un mélange cacodylate (0,1M) -eau de mer (1:3) (v:v), auquel est ajouté 0,01 % de chlorure de calcium (CaCl<sub>2</sub>).

Au laboratoire, les échantillons sont rincés trois fois 10 mn à l'eau de mer tamponnée, puis partiellement déshydratés dans des bains d'alcool de degré croissant : 50°, 70°, 95° et 100° avec 0,01 % de CaCl<sub>2</sub> dans les alcools 50° et 70°. Cette déshydratation est complétée par un passage au point critique selon la méthode décrite par Anderson (1951). Les disques d'algue sont ensuite collés sur des plots puis métallisés.

L'observation est réalisée sur un microscope électronique à balayage, type Jeol JSM 35. Le comptage des bactéries se fait au grossissement 4 000 (à 35 KV), soit sur une surface de 642 µm<sup>2</sup>, sur 10 champs pris au hasard à la surface d'un disque d'algue.

### Numérations sur milieu de culture

Au laboratoire, les pièces d'algue sont rincées et agitées dans l'eau de mer stérile pour débarrasser l'algue du film d'eau susceptible de contenir des bactéries libres pélagiques ou de contamination.

Plusieurs méthodes ont été essayées pour décrocher les bactéries de la surface d'algue : grattage, ultrasons, agitation, broyage, et une technique de bactériologie alimentaire, le "stomaching" (Sharpe & Jackson, 1972 ; Sharpe, 1973). Seule cette dernière a été retenue. En effet, compte tenu de l'épaisseur et de la texture des tissus (parois riches en alginate) des zones stipofrontale et médiane, le broyage s'est avéré difficile et la suspension obtenue non homogène.

Les pièces d'algue sont placées dans un sac en plastique stérile contenant 20 ml d'eau de mer stérile ; l'action mécanique de deux palettes métalliques dont l'onde se propage dans un volume total d'eau d'environ 200 ml décroche les bactéries incrustées à la surface de l'algue avec une élévation de température négligeable (Fry & Humprey, 1978). La durée du traitement est de 15 mn, et le modèle utilisé un "stomacher 400 LABBLENDER".

Les bactéries cultivables sont dénombrées en boîtes de Petri sur le milieu 2216E (Oppenheimer & Zobell, 1952), après 8 jours d'incubation à la température de 19°C.

Notre étude s'intéressant à la comparaison de peuplements épiphytes de différents tissus, l'expression des résultats par unité de surface fraîche a été choisie (Fry & Humfrey, 1978).

#### Analyse bactériologique qualitative

L'étude qualitative a été réalisée sur une série de prélèvements effectuée au mois d'avril. A partir des boîtes de Petri provenant de l'analyse quantitative, 20 colonies pour chaque niveau étudié sur la fronde et 40 colonies sur les débris (compte tenu de leur plus forte hétérogénéité *de visu*) ont été isolées et purifiées. Certaines de ces souches n'ont pu être conservées et la collection étudiée se compose de 81 souches. Leurs caractéristiques sont déterminées par la série de 27 tests proposés par les galeries API 20B (Baleux, 1976). 22 de ces tests portent sur l'hydrolyse des sucres et polyols (saccharose, arabinose, mannitol, fructose, glucose, maltose, amidon, rhamnose, galactose, sorbitol et glycérol), la présence de certaines enzymes (cytochrome oxydase, catalase, protéase, nitrate réductase,  $\beta$  galactosidase, uréase et tryptophanase), la formation d' $H_2S$ , l'utilisation du citrate en tant que seule source de carbone et la production d'acétoïne à partir de l'acide pyruvique ; des observations microscopiques (morphologie, mobilité, coloration Gram et sporulation) ainsi que la détermination du type respiratoire (Hugh & Leifson, 1953) sont associées à cette série. De plus, l'aptitude des souches à croître à des températures de 8 et 30°C a été étudiée. L'identification des souches, au niveau du genre, a été effectuée selon le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan & Gibbons, 1974).

Les résultats des tests API sont rentrés sur fichiers informatisés et traités en taxonomie numérique. Toutes les souches à classer sont comparées deux à deux. Pour chaque paire est calculé le coefficient de Sokal & Michener (1958), qui tient compte des similitudes positives et négatives. Puis les souches sont regroupées selon la variance (Benzecri *et al.*, 1973 ; Delabre *et al.*, 1973). L'ensemble des calculs est réalisé sur un micro-ordinateur et aboutit à l'obtention de dendrogrammes. Le programme calcule en outre un indice de régularité fonctionnelle (E), lié à la fréquence relative d'apparition de chaque caractère (Troussellier & Legendre, 1981) et un indice moyen d'activité (Ima), basé sur le pourcentage de réponses positives aux 22 tests cités ci-dessus (Troussellier & Baleux, 1981).

## RÉSULTATS

### Teneur en ATP du tissu algal

Les résultats sont consignés dans le tableau 1.

La teneur en ATP décroît en fonction de l'âge du tissu de l'algue, passant de 55,49 nanomoles  $g^{-1}$  de matière fraîche (MF) dans la partie basale à 8,68 nanomoles  $g^{-1}$  MF dans les débris.

Pour l'ATP bactérien, les valeurs les plus faibles sont obtenues au niveau de la partie médiane (0,05 nmole  $g^{-1}$  d'algue fraîche), les plus fortes sur les débris (0,17 nmole  $g^{-1}$

d'algue fraîche). La teneur maximale en ATP bactérien reste 50 fois inférieure à la teneur minimale enregistrée dans le tissu algal. Bien que les valeurs obtenues pour l'ATP bactérien soient vraisemblablement sous-estimées, compte tenu de la technique de décrochage utilisée, il apparaît néanmoins que le vieillissement des tissus de l'algue, visible macroscopiquement (dépigmentation, lyse des cellules), s'accompagne bien d'une diminution de la proportion de cellules métaboliquement actives.

TABLEAU 1

Nombre d'échantillons traités (N), teneur en ATP et écart type (ET) des mesures effectuées sur les tissus jeune, adulte, âgé et les débris de *Laminaria digitata*, ainsi que sur les suspensions bactériennes isolées de ces différents niveaux. Les teneurs en ATP sont exprimées en nanomoles g<sup>-1</sup> d'algue fraîche.

|              | ALGUE + BACTÉRIES |       |       | BACTÉRIES |      |       |
|--------------|-------------------|-------|-------|-----------|------|-------|
|              | N                 | ATP   | ET    | N         | ATP  | ET    |
| Tissu jeune  | 7                 | 55,49 | 18,27 | 2         | 0,07 | 0,007 |
| Tissu adulte | 7                 | 37,05 | 9,93  | 2         | 0,05 | 0,01  |
| Tissu âgé    | 9                 | 18,56 | 8,89  | 2         | 0,07 | 0,006 |
| Débris       | 8                 | 8,68  | 5,18  | 2         | 0,17 | 0,006 |

## Densités bactériennes

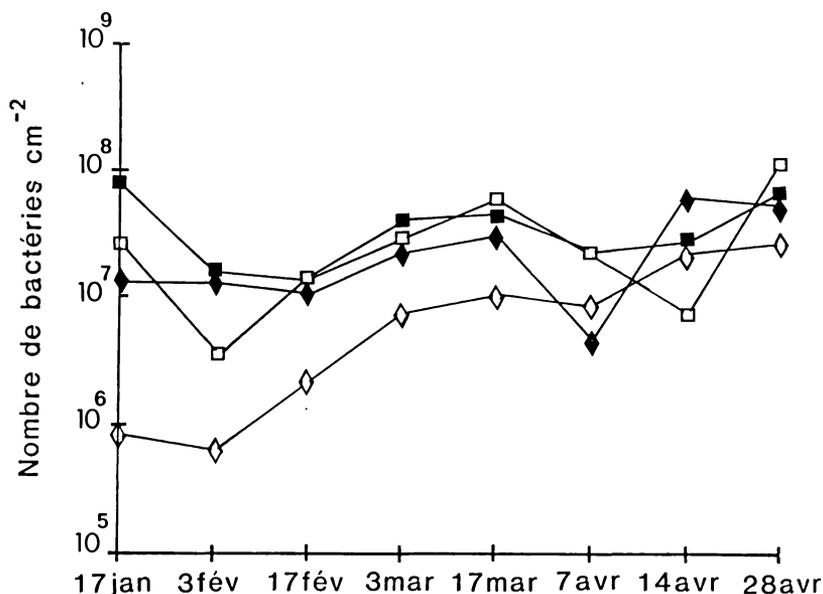


Fig. 2 - Microflore bactérienne dénombrée au microscope électronique à balayage (MEB), sur les tissus jeune (◆), adulte (◇), âgé (■) et les débris (□) de *Laminaria digitata*, de janvier à avril 1984.

Les résultats, exprimés en UFC (unité formant colonie) ou en nombre de bactéries par  $\text{cm}^2$  de surface fraîche, sont illustrés par les figures 2 et 3.

Dans le cas des numérations de la microflore totale (MEB), un facteur 100 sépare les densités extrêmes observées sur les tissus médian et âgé au mois de janvier. Au cours du temps cette différence s'estompe avec une augmentation de la colonisation de la partie médiane de l'algue, qui présente au mois d'avril des densités comparables ( $2,5 \times 10^7$  bactéries  $\text{cm}^{-2}$ ) à celles des autres tissus. Le tissu âgé et les débris sont les plus colonisés, avec des densités du même ordre de grandeur, d'une valeur moyenne de  $3,6 \times 10^7$  bactéries  $\text{cm}^{-2}$  sur la période étudiée. La colonisation du tissu jeune est intermédiaire entre celle des parties adulte et âgée.

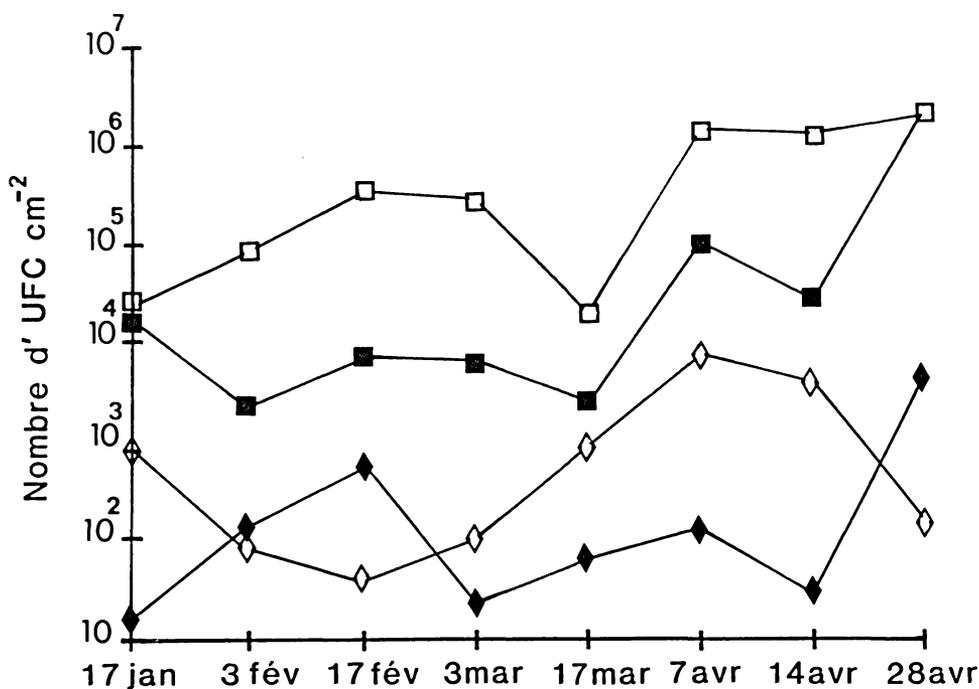


Fig. 3 - Microflore hétérotrophe dénombrée sur milieu 2216E, sur les tissus jeune (◆), adulte (◇), âgé (■) et les débris (□) de *Laminaria digitata*, de janvier à avril 1984.

Les dénombrements de la microflore cultivable différencient plus nettement les tissus détériorés de l'algue (âgé et débris) des tissus sains (jeune et adulte). La colonisation des tissus jeune et adulte est, en moyenne, respectivement de  $7 \times 10^2$  et  $2 \times 10^3$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ , celle des extrémités de la fronde et des débris de  $6 \times 10^6$  UFC  $\text{cm}^{-2}$ . L'écart de  $10^3$  à  $10^4$  UFC  $\text{cm}^{-2}$  apparaissant entre la partie jeune et les débris reste relativement constant sur les quatre mois étudiés.

Ainsi la comparaison des microflores dénombrées sur milieu de culture et au MEB (Fig. 4) laisse essentiellement apparaître deux ensembles de points correspondant (par ordre

de densité croissante sur milieu de culture) aux tissus sains et détériorés, et témoigne d'une augmentation du nombre de bactéries cultivables avec le vieillissement des tissus de l'algue.

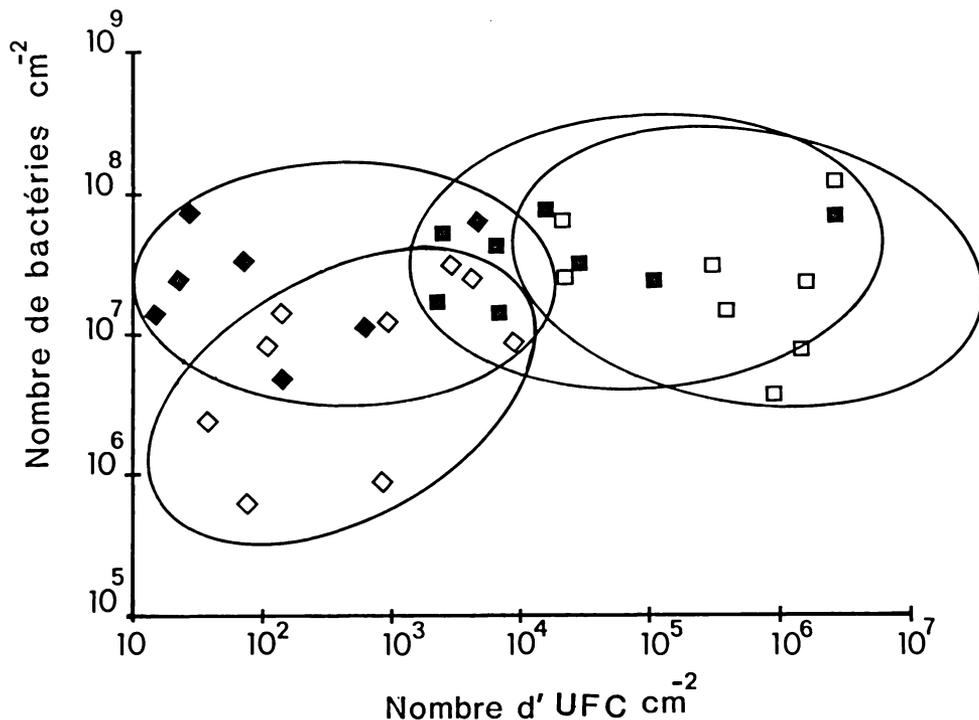


Fig. 4 - Comparaison des dénombrements bactériens effectués au MEB et sur milieu 2216E, sur les tissus jeune (◆), adulte (◇), âgé (■) et sur les débris (□) de *Laminaria digitata* ; la chronologie des prélèvements n'est pas prise en compte.

#### Caractérisation des peuplements

Les souches isolées (Tabl. 2) sont essentiellement des bacilles Gram négatif (95,1 %) dont 58 % sont mobiles. Environ la moitié de la collection (55,6 %) possède un pigment jaune-orange. Les isolats semblent plus adaptés aux basses températures : 90,1 % croissent à 8°C contre 51,9 % à 30°C. 16 % des souches réduisent les nitrates en nitrites.

8,6 % des souches fermentent le glucose ; 30,9 % et 33,3 % d'entre elles hydrolysent respectivement le glucose et le mannitol ; ces pourcentages varient selon l'origine des souches et la figure 5 montre, sur les 12 sucres et polyols testés, une augmentation à la fois du nombre de substrats hydrolysés et du pourcentage de souches capables de les hydrolyser avec le vieillissement des tissus de l'algue. C'est également ce que confirme l'indice d'activité métabolique (Tabl. 3), qui augmente des communautés isolées du tissu jeune (2,05) aux débris (7,14).

La comparaison des peuplements est présentée sous forme de deux dendrogrammes. Sur le dendrogramme des souches isolées de la fronde (Fig. 6a) se détachent 3 ensembles, cor-

TABLEAU 2

Principales caractéristiques des souches isolées des tissus jeune, adulte, âgé et de débris de *Laminaria digitata* (avril) ; les valeurs entre parenthèses correspondent aux pourcentages.

|                             | tissu jeune | tissu adulte         | tissu âgé          | débris              | TOTAL                |
|-----------------------------|-------------|----------------------|--------------------|---------------------|----------------------|
| nombre de souches           | 20          | 16                   | 9                  | 36                  | 81                   |
| bâtonnets Gram-<br>mobilité | 17(85)<br>0 | 16(100)<br>15(93,5)  | 9(100)<br>4(44,4)  | 35(100)<br>28(77,8) | 77(95,1)<br>47(58)   |
| 8°C<br>30°C                 | 19(95)<br>0 | 13(81,3)<br>11(68,8) | 8(88,9)<br>6(66,7) | 33(75)<br>25(69,4)  | 73(90,1)<br>42(51,9) |
| pigmentation jaune          | 20(100)     | 4(26,7)              | 5(55,6)            | 16(44,4)            | 45(55,6)             |
| fermentation du glucose     | 0           | 0                    | 2(22,2)            | 5(13,9)             | 7(8,6)               |
| hydrolyse du saccharose     | 0           | 2(12,5)              | 3(33,3)            | 12(33,3)            | 17(21)               |
| arabinose                   | 0           | 1(6,25)              | 2(22,2)            | 2(5,55)             | 5(6,2)               |
| mannitol                    | 0           | 2(12,25)             | 1(11,1)            | 19(52,7)            | 27(33,3)             |
| fructose                    | 0           | 2(12,5)              | 4(44,4)            | 11(30,5)            | 11(20,9)             |
| glucose                     | 0           | 2(12,5)              | 3(33,3)            | 20(55,6)            | 25(30,9)             |
| maltose                     | 0           | 2(12,5)              | 3(33,3)            | 24(66,6)            | 29(38,3)             |
| amidon                      | 0           | 1(6,25)              | 4(44,4)            | 16(44,4)            | 21(25,9)             |
| rhamnose                    | 0           | 0                    | 3(33,3)            | 8(22,2)             | 11(13,6)             |
| galactose                   | 0           | 2(12,25)             | 1(11,1)            | 15(41,6)            | 18(22,2)             |
| mannose                     | 0           | 0                    | 3(33,3)            | 4(11,1)             | 7(8,6)               |
| sorbitol                    | 0           | 1(6,25)              | 1(11,1)            | 3(8,33)             | 5(6,2)               |
| glycérol                    | 0           | 1(6,25)              | 1(11,1)            | 3(8,33)             | 5(6,2)               |
| oxydase                     | 18(90)      | 2(12,5)              | 3(33,3)            | 15(41,7)            | 38(46,9)             |
| catalase                    | 19(95)      | 6(37,5)              | 5(55,6)            | 23(63,9)            | 53(65,4)             |
| protéase                    | 0           | 1(6,3)               | 1(11,1)            | 15(41,7)            | 17(21)               |
| nitrate réductase           | 1(5)        | 1(6,3)               | 4(44,4)            | 7(19,4)             | 13(16,1)             |
| β galactosidase             | 0           | 1(6,3)               | 1(11,1)            | 7(19,4)             | 9(11,1)              |

TABLEAU 3

Évolution de l'indice de régularité fonctionnelle (E) et de l'indice moyen d'activité (Ima) des communautés bactériennes isolées des tissus jeune, adulte, âgé et de débris de *Laminaria digitata* (avril).

|              | E    | Ima  |
|--------------|------|------|
| tissu jeune  | 0,06 | 2,05 |
| tissu adulte | 0,03 | 2,8  |
| tissu âgé    | 0,35 | 5,33 |
| débris       | 0,57 | 7,14 |

respondant chacun à l'un des trois tissus étudiés. La majorité des souches isolées du tissu jeune entre elles et du tissu adulte entre elles sont identiques à 100 % ; celles isolées du tissu âgé ont des coefficients de similitude plus faibles (de 87 à 97 %), ce qui traduit une plus grande diversité. Par contre, le dendrogramme des souches isolées du tissu âgé et des débris (Fig. 6b) ne laisse apparaître aucune séparation entre les souches des deux origines.

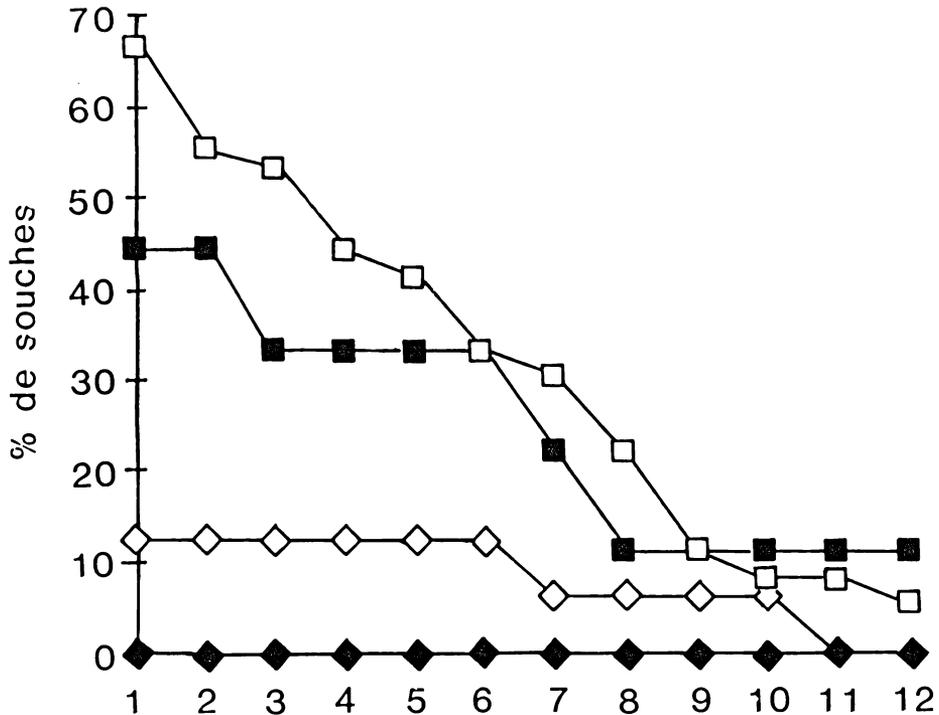


Fig. 5 - Profils métaboliques des souches isolées des tissus jeune (◆), adulte (◇) et âgé (■) de la fronde et des débris (□) de *Laminaria digitata*. En ordonnée : pourcentages d'hydrolyse des sucres et polyols ; en abscisse : pour chacun des niveaux, les sucres et polyols (glu- sac- ara- fru- mal- amd- rha- gal- mne- man- sor- gly) sont classés (numéros 1 à 12) en fonction de leur pourcentage décroissant d'hydrolyse.

Les souches isolées du tissu âgé, moins nombreuses, se répartissent équitablement parmi celles isolées des débris avec lesquelles elles présentent d'ailleurs de fortes similitudes (de 90 à 100 %).

Selon la classification du Bergey's Manuel (Buchanan & Gibbons, 1974), 85 % des souches se répartissent entre les genres *Flavobacterium* et *Pseudomonas* ; de plus, sur les tissus détériorés apparaissent des souches appartenant aux genres *Chromobacterium* et *Photobacterium* (13,3 % sur les 45 souches isolées de ces tissus). L'indice de régularité fonctionnelle (Tabl. 3) témoigne également d'une diversification des peuplements de tissus sains (0,06 pour les communautés isolées du tissu jeune) aux tissus détériorés (0,57 pour les communautés isolées des débris).

#### DISCUSSION ET CONCLUSION

Les résultats montrent une évolution des communautés bactériennes, de la zone stipo-frondale aux débris résultant de la fragmentation des extrémités distales de la fronde, en liaison avec le cycle de renouvellement des tissus de l'algue.

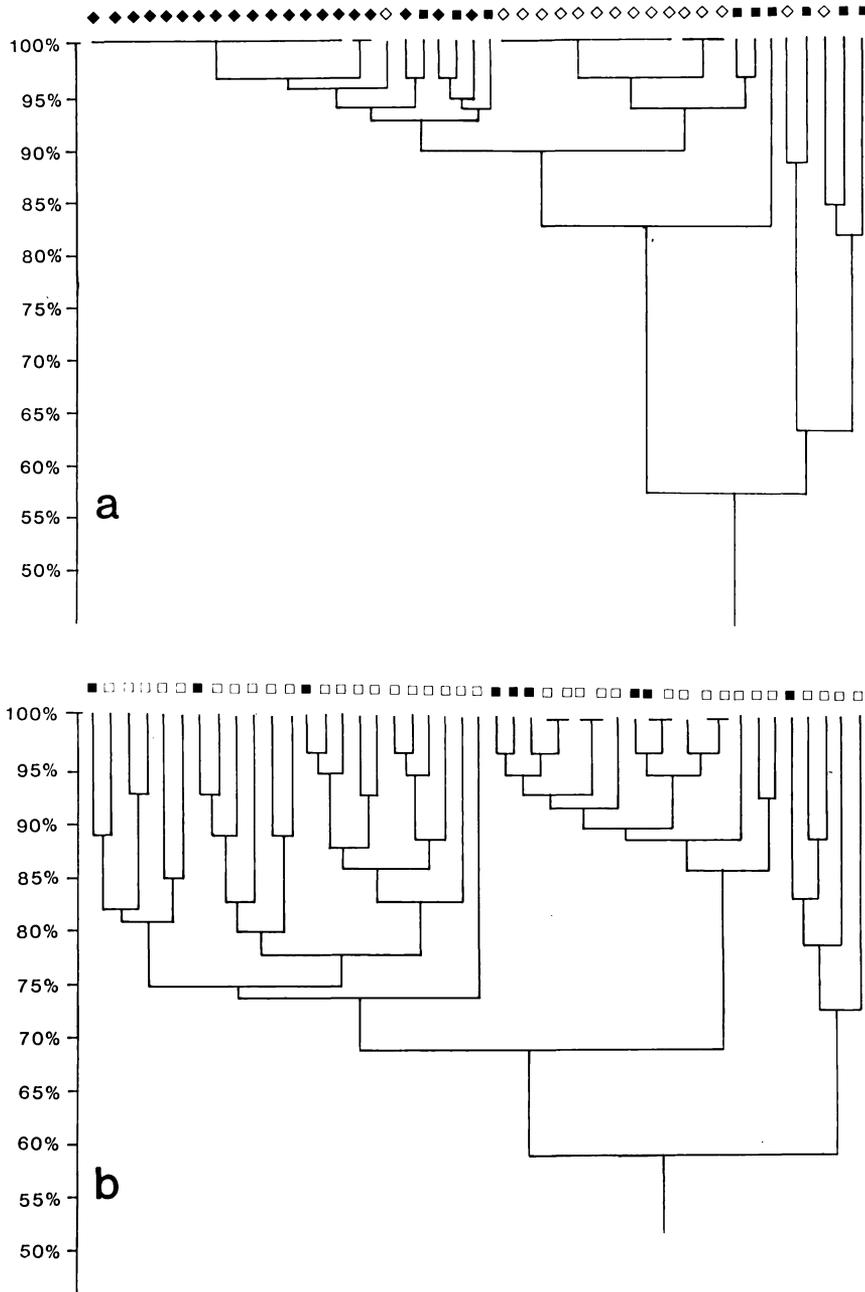


Fig. 6 - Dendrogrammes de l'ensemble des souches isolées (avril) :  
 a. des tissus jeune (◆), adulte (◊) et âgé (■) d'une fronde de *Laminaria digitata*.  
 b. du tissu âgé (■) d'une fronde et de débris (□) de *Laminaria digitata*.  
 Les valeurs numériques correspondent aux pourcentages de similitude entre les souches.

Le suivi de la croissance de frondes de *Laminaria digitata* sur trois années consécutives par Pérez (1969) permet d'évaluer à un peu plus d'une année le temps de renouvellement de l'ensemble de la fronde. Cette valeur est confirmée par Chassé et Legendre (1976), qui donne, pour cette même algue un coefficient multiplicateur annuel de 0,9.

La croissance de l'algue est assurée par un méristème intercalaire situé à la jonction stiprofondale (partie basale). Elle s'étale de décembre à juillet sur les côtes françaises ; l'automne et l'hiver sont des périodes de croissance très ralentie (Cosson, 1967 ; Perez, 1971). Ainsi au mois de janvier, seule la zone basale est constituée de tissu neuf. Fin avril, la moitié de la lame est déjà renouvelée. Le tissu des extrémités de la fronde a un peu plus d'un an. L'âge des débris est plus délicat à estimer. A titre indicatif, la décomposition de laminaires échouées sur un estran se fait sur un cycle de 10 à 15 jours selon Kerambrun (1984). Compte tenu de l'érosion permanente des extrémités distales de *Laminaria digitata* (Perez, 1969) et de la taille des débris que nous avons choisis (fragmentation peu avancée) il est probable que l'âge de ces tissus n'excède guère une année.

Il est ainsi possible de suivre l'évolution d'une surface de tissu néoformé.

Le tissu neuf de la partie basale de la fronde a une teneur en ATP élevée (55 nmoles g<sup>-1</sup> MF), ce qui témoigne d'un métabolisme cellulaire actif. Dès sa formation, il est fortement colonisé (1,3 x 10<sup>7</sup>) bactéries cm<sup>2</sup> au mois de janvier), mais sur milieu de culture cette valeur n'est que de 15 UFC cm<sup>2</sup>. Deux phénomènes peuvent expliquer une telle différence. Le premier serait imputable à la technique de décrochage utilisée. L'efficacité du stomacher a été abordée par une évaluation des densités bactériennes en épifluorescence sur les suspensions récupérées après stomaching (Corre, non publié). La comparaison de ces valeurs à celles obtenues au MEB montrent qu'environ 50 % des peuplements associés à l'algue sont ainsi décrochés. Fry et Humphrey (1978) précisent en outre que le stomaching et l'"homogénéisation" sont les techniques les plus satisfaisantes pour le décrochage des bactéries épiphytes. Le second pourrait correspondre à une inadaptation du milieu 2216E aux communautés épiphytes du tissu jeune, bien que des essais préliminaires (Corre, non publié) aient montré que ce milieu donnait les meilleurs résultats. Il est en outre couramment utilisé en milieu marin et mentionné par plusieurs auteurs dans l'étude des peuplements bactériens associés aux algues (Mazure & Field, 1980 ; non gélosé : Bouvy *et al.*, 1986).

Le peuplement isolé de ce tissu est très peu diversifié, ce que traduisent un fort pourcentage de similitude entre les souches et un faible indice de régularité fonctionnel (0,06). Ses besoins nutritionnels sont très spécialisés (Ima = 2,05) et, en conséquence, certains regroupements sont obtenus par des similitudes négatives.

Ce tissu jeune passe en position médiane au mois d'avril. Sa teneur en ATP a diminué (37 nmoles g<sup>-1</sup> MF). Le peuplement bactérien associé présente sensiblement la même densité (2,6 x 10<sup>7</sup> bactéries cm<sup>2</sup>) que celle du tissu nouvellement formé au mois de janvier (tissu jeune) ; mais le nombre de bactéries cultivables est plus élevé (2,2 x 10<sup>3</sup> UFC cm<sup>2</sup>). Sa diversité augmente (0,30), et l'activité métabolique reste faible (2,8).

La spécialisation nutritionnelle des peuplements associés aux tissus sains (jeune et adulte) pourrait être attribuée à la spécificité des substrats contenus dans le mucilage de la surfa-

ce algale. Le système mucifère apparaît en effet dès le niveau stipofrondal chez *Laminaria digitata* (Ribier 1969). Chez les laminaires, ce mucilage est essentiellement composé de mannitol, protéines, alginates et laminarine (Newell *et al.*, 1980). Le faible pourcentage constaté de souches hydrolysant le mannitol peut s'expliquer par la variation saisonnière de la production de ce composé, qui est minimale en hiver (Caraes, 1969), soit à une période assez proche de celle de cette étude. D'autre part, plusieurs auteurs (Conover & Sieburth 1964 ; Sieburth & Conover, 1965 ; Sieburth, 1969 ; Cundell *et al.*, 1977 ; Sieburth & Tootle, 1981) ont mis en évidence la production, au niveau des tissus nouvellement formés d'algues brunes, soit en période hivernale, de substances (tanins) qui tendraient à inhiber le fouling bactérien. Cette activité bactéricide irait dans le sens des densités plus faibles et de la diversité moindre des peuplements cultivables isolés de ces niveaux.

Le tissu médian passe en position terminale aux mois de février ou mars de l'année suivante. Les densités bactériennes atteignent alors des valeurs de  $3,1 \times 10^7$  bactéries  $\text{cm}^{-2}$ . Quant aux débris provenant de ce tissu, ils présentent une densité moyenne de  $3,8 \times 10^7$  bactéries  $\text{cm}^{-2}$ . Les différences entre les densités des microflores dénombrées au MEB et sur milieu de culture sont plus estompées. Les teneurs en ATP décroissantes (19 et 9 nmoles  $\text{g}^{-1}$  MF) prouvent que la proportion de cellules algales fonctionnelles a diminué.

Le spectre nutritionnel des peuplements isolés de ces tissus détériorés s'élargit, en même temps qu'augmente leur diversité spécifique. Les indices les plus forts sont notés au niveau des débris ( $E = 0,57$  ;  $Ima = 7,14$ ).

L'étude de 20 à 30 souches, sur une base d'environ 30 caractères, est statistiquement suffisante pour appréhender la diversité d'une communauté bactérienne (Bianchi & Bianchi, 1982). En raison de la perte de certaines souches isolées initialement, ce nombre n'a pu être conservé pour le tissu âgé. Cependant, les résultats obtenus montrent une augmentation des diversités spécifique et métabolique, principalement entre les communautés bactériennes des tissus sains (jeune et médian représentés par 36 souches) et celles des tissus détériorés (âgé et débris, représentés par 45 souches).

La présence de peuplements plus diversifiés ainsi que les densités élevées et relativement stables trouvées sur les tissus détériorés, sur la période étudiée, peuvent s'expliquer par la libération de matière organique dissoute lors de la lyse des cellules de l'algue. La fragmentation de l'algue est permanente et la libération des composés intracellulaires n'est donc pas soumise aux variations saisonnières. Ce phénomène pourrait expliquer l'augmentation du pourcentage de souches, issues du tissu âgé (44,4 %) et des débris (58,3 %), capables d'utiliser le mannitol, qui est un composé d'origine intracellulaire. De même l'activité protéolytique des peuplements bactériens s'accroît avec l'état de décomposition des tissus, jusqu'à atteindre 41,7 % sur les débris.

Les observations faites dans ce travail vont dans le sens de celles réalisées sur d'autres macrophytes. Ainsi Mazure et Field (1980) obtiennent, en période hivernale (Afrique du Sud), des densités de bactéries cultivables d'environ  $10^3$  cellules. $\text{cm}^{-2}$  à la base des frondes de *Laminaria pallida*, de  $10^5$  sur la partie médiane et de  $10^6$  sur les extrémités. Laycock (1974) montre cette même modification, tant quantitative que qualitative de la colonisation

le long des frondes de *Laminaria longicuris* (Canada). Il est vraisemblable que cette évolution soit guidée par les changements de l'état physiologique de l'algue, qui se traduisent par des productions différentes de substances organiques, favorisant ou inhibant le développement des bactéries. Cependant, d'autres facteurs que le vieillissement des tissus interviennent, et notamment les facteurs du milieu environnant. Ainsi, Mazure et Field (1980) observent que les densités des bactéries épiphytes de la base des frondes d'*Ecklonia maxima* et de *Laminaria pallida* suivent le cycle saisonnier du bactérioplancton.

Le vieillissement de la fronde s'achève par la libération permanente de débris. Les résultats obtenus dans ce travail indiquent que ces débris sont fortement colonisés, avant même leur libération, par des communautés bactériennes denses. L'impact de cet apport de matière particulaire riche en bactéries a été abordé par plusieurs auteurs. Mazure et Field (1980) estiment, à partir des numérations de bactéries viables effectuées sur les extrémités du thalle d'*Ecklonia maxima* et de *Laminaria pallida* (péninsule du Cap), à  $2,60 \times 10^9$  cellules  $m^{-2} \cdot jour^{-1}$  le nombre de bactéries liées aux particules libérées par l'érosion des frondes. Pour ce même champ d'algues, Stuart *et al.* (1981) calculent que la biomasse bactérienne sèche supportée par la matière particulaire, résultant de la fragmentation des algues, s'élève à  $72,20 \times 10^4$  kg. Cette valeur, obtenue à partir d'incubations réalisées en laboratoire, témoigne de l'importance de l'apport bactérien que représentent de telles particules dans la chaîne trophique basée sur les décomposeurs. La présente étude montre, de plus, que la diversité et les capacités nutritionnelles des bactéries sont maximales dans les parties où se réalise la fragmentation de l'algue et sur les débris qui en sont issus. Ces débris, peuvent être transportés au-delà du champ d'algues, et, du fait de leur flore bactérienne associée, sont susceptibles d'influencer de façon significative la composition des masses d'eau qu'ils traversent.

Ce travail a été effectué dans le cadre de l'AIP CNRS - Chimie Marine - (n° 9-84-47).X

## BIBLIOGRAPHIE

- ANDERSON, T.F., 1951. Techniques for the preservation of three dimensional structures in preparing specimens for the electron microscope. *Trans. New York Acad. Sci.*, 13 : 130 p.
- BALEUX B., 1976. Dégradation biologique des agents de surface. Étude chimique et microbiologique. *Thèse de Doctorat d'État* - Montpellier. 242 p.
- BENZECRI, J.P. *et al.*, 1973. L'analyse des données. Tome 1 - La taxonomie. *Ed. Dunod*, Paris 615 p.
- BIANCHI, M.A.G. & A.J.M. BIANCHI, 1982. Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurement. *Microb. Ecol.*, 8 : 61-69.
- BOUVY, M., M. LE ROMANCER & D. DELILLE, 1986. Significance of microheterotrophs in relation to the degradation process of subantarctic kelp beds (*Macrocystis pyrifera*). *Polar biol.*, 5 : 249-253.
- BRYANT, R.D., J.W. COSTERTON & E.J. LAISHLEY, 1983. The role of *Thiobacillus albertis* in the adhesion of cells to elemental sulfur. *Can. J. Microb.*, 30 : 81-90.
- BRYLINSKY, M., 1977. Release of dissolved organic matter by some marine macrophytes. *Mar. Biol.*, 39 : 213-220.
- BUCHANAN, R.C. & N.E. GIBBONS, 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>e</sup> edition. *The Williams and Williams company*. Baltimore. 126 p.
- CARAES, A., 1969. Le mannitol dans les Phéophycées et son extraction industrielle. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 6 : 663-669.
- CARON, D.A. & J.M. SIEBURTH, 1981. Disruption of the preliminary fouling sequence on fiber glass-reinforced plastic submerged in the marine environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 268-273.

- CHAN, E.C.A. & E.A. Mc MANUS, 1969. Distribution, characterization and nutrition of marine microorganisms from the algae *Polysiphonia lanosa* and *Ascophyllum nodosum*. *Can. J. Microbiol.*, 15 : 409-420.
- CHASSE, C. & A.F. LEGENDRE, 1976. Croissance et production des champs de grandes algues (Laminariales). *Contrat CNEXO 76/5288*, 56 p.
- CHASSE, C., L. KERAMBRUN, Y. LEGAL & Y. TREGUER, 1982. Biomasse algale de Bretagne. Potentiel énergétique. Groupe d'études des énergies nouvelles. *Contrat avec l'Établissement public régional de Bretagne*, 113 p.
- CONOVER, J.T. & J. McN. SIEBURTH, 1964. Effect of *Sargassum* distribution on its epibiota and antibacterial activity. *Bot. Mar.*, 6, fasc.1/2 : 147-157.
- COSSON, J., 1967. Étude d'une population de *Laminaria digitata*, Lam. (biométrie, croissance, régénération). *Bull. Soc. Linn. Normandie*, (ser. 10), 8 : 246-281.
- CUNDELL, A.M., T.D. SLEETER & R. MITCHELL, 1977. Microbial populations associated with the surface of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Microbial. Ecol.*, 4 : 81-91.
- DELABRE, M., A. BIANCHI & M. VERON 1973. Étude critique de méthodes de taxonomie numérique. Application à une classification de bactéries aquicoles. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 124 A : 489-506.
- FERA, P., M.A. SIEBEL, W.G. CHARACKLIS & D. PRIEUR, 1989. Seasonal variations in bacterial colonisation of stainless steel, aluminium and polycarbonate surfaces in a seawater flow system. *Biofouling*, 1 : 251-261.
- FRY, J.C. & N.C.B. HUMPREY, 1978. Techniques for the study of bacteria epiphytic on aquatic macrophytes. In : *Techniques for the study of mixed populations*. (LOVELOCK D.W. & DAVIES R., eds). Soc. appl. Bact. Tech. Ser. n° 11. San Francisco : Academic Press, 1-26.
- HATCHER, B.G., R.O. CHAPMAN & K.H. MANN, 1977. An annual carbon budget for the kelp *Laminaria longicuris*. *Mar. Biol.*, 37 : 85-96.
- HOURLMANT, A., A. PRADET & M. PENOT, 1979. Action de la benzolaminopurine sur l'absorption du phosphate et le métabolisme des composés phosphorilés des disques de tubercule de Pomme de terre en survie. *Physiol. Vég.*, 17 (3) : 483-499.
- HUGH, R. & E. LEIFSON, 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxydative metabolism of carbohydrates by various Gram negative bacteria. *J. Bact.*, 66 : 24-26.
- JOHNSTON, C.S., R.G. JONES & R.D. HUNT, 1977. A seasonal carbon budget for a laminarian population in a scottish sea loch. *Helgoländer wiss. Meeresunters.*, 30 : 527-545.
- KERAMBRUN, L., 1984. Contribution à l'étude de la fertilité des fonds rocheux côtiers de Bretagne. *Thèse de doctorat 3<sup>e</sup> cycle*, Université de Brest : 150 p.
- KHAILOV, K.M. & Z.P. BURLAKOVA, 1969. Release of dissolved organic matter by marine seaweeds and distribution of their total organic production to inshore communities. *Limnol. Oceanogr.*, 14 : 521-527.
- KONG, M.K. & K.Y. CHAN, 1979. A study on bacterial flora isolated from marine algae. *Bot. Mar.*, 22 : 83-97.
- KOOP, K., R.C. NEWELL & M.I. LUCAS, 1982 a. Biodegradation and carbon flow based on kelp (*Ecklonia maxima*) debris in a sandy beach microcosm. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 7 : 315-326.
- KOOP, K., R.C. NEWELL & M.I. LUCAS, 1982 b. Microbial regeneration of nutrients from the decomposition of macrophyte debris on the shore. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 9 : 91-96.
- LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. & A. PURUSHOTHAMAN, 1982. Heterotrophic bacteria associated with seaweed. *Proc. Indian Sci. (Plant Sci.)*, 91 : 487-493.
- LAYCOCK, R.A., 1974. The detrital food chain based on seaweeds. 1- Bacteria associated with the surface of *Laminaria* fronds. *Mar. Biol.*, 25 : 223-231.
- LINLEY, E.A.S., R.C. NEWELL & S.A. BOSMA, 1981. Heterotrophic utilization of mucilage release during fragmentation of kelp (*Ecklonia maxima* and *Laminaria pallida*). 1- Development of microbial communities associated with the degradation of kelp mucilage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4 : 31-41.
- LINLEY, E.A.S. & J.G. FIELD, 1982. The nature and ecological significance of bacterial aggregation in a neashore upwelling ecosystem. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 14 : 1-11.
- LUCAS, M.I., R.C. NEWELL & B. VELIMIROV, 1981. Heterotrophic utilisation of mucilage released during fragmentation of kelp (*Ecklonia maxima* and *Laminaria pallida*). 2 - Differential utilisation of dissolved organic compounds from kelp mucilage. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4 : 43-55.
- MAJAK, W., J.S. CRAIGIE & J. McLACHAN, 1966. Photosynthesis in the Rhodophyceae. *Can. J. Bot.*, 44 : 541-549.
- MAZURE, H.G.F. & J.G., FIELD, 1980. Density and ecological importance of bacteria on kelp fronds in an upwelling region. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, 43 : 173-182.
- NEWELL, R.C., M.I. LUCAS, B. VELIMIROV & L.J. SEIDERER, 1980. Quantitative significance of dissolved organic losses following fragmentation of kelp (*Ecklonia maxima* and *Laminaria pallida*). *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 2 : 45-59.
- OPPENHEIMER, C.H. & C.E. ZOBELL, 1952. The growth and viability of sixty three species of marine bacteria as influenced by hydrostatic pressure. *J. Mar. Res.*, 11 : 10-18.

- PEREZ, R. 1969. Croissance de *Laminaria digitata* (L.) Lamouroux étudiée sur trois années consécutives. *Proc. Int. Seaweed Symp.*, 6 : 329-344.
- PEREZ, R., 1971. Écologie, croissance et régénération, teneurs en acide alginique de *Laminaria digitata* sur les côtes françaises de la Manche. *Rev. Trav. Inst. Pêches.Marit.*, 35 (3) : 287-346.
- PRADET, A., 1967. Étude des adénosine-5'-mono, di et tri-phosphates dans les tissus végétaux. I- Dosage enzymatique. *Physiol. Veg.*, 5 : 209-221.
- RIBIER, J., 1969. Le système mucifère des Laminariales bretonnes : origine, constitution. *C.R. Acad. Sc. Paris*, t. 269, série D, : 1386-1388.
- SHARPE, A.N., 1973. Automation and instrumentation developments for the bacteriology laboratory. In : *Sampling - microbiological monitoring of environments* (BOARD, R.G. & LOVELOCK, D.W., eds). Soc. appl. Bact. Tech. Ser. n° 7. London and New York : Academic press, p 197.
- SHARPE, A.N. & JACKSON, A.K., 1972. Stomaching : a new concept in bacteriological sample preparation. *Appl. Microbiol.*, 24, p 175.
- SHIBA, T. & TAGA, N., 1980. Heterotrophic bacteria attached to seaweeds. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 47 : 251-258.
- SIEBURTH, J. McN., 1969. Studies on algal substances in the sea. 3- The production of extracellular organic matter by littoral marine algae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 3 : 290-309.
- SIEBURTH, J. McN. & J.T. CONOVER, 1965. *Sargassum* tannin, an antibiotic which retards fouling. *Nature*, 208 : 52-53.
- SIEBURTH, J. McN., R.D. BROOKS, R.V. GESSNER, C.D. THOMAS & J.L. TOOTLE, 1974. Microbial colonization of marine plant surfaces as observed by scanning electron microscopy. In (R.R. COLWELL & R.V. MORITA, eds) : *Effect of the Ocean Environment on Microbial Activities*. University Park Press, Baltimore, Md. : 318-326.
- SIEBURTH, J. McN. & J.L. TOOTLE, 1981. Seasonality of microbial fouling on *Ascophyllum nodosum* (L.) Lejol, *Fucus vesiculosus* (L.), *Polysiphonia lanosa* (L.) Tandy and *Chondrus crispus* Stackh. *J. Phycol.*, 17 : 57-64.
- SOKAL, D.M. & C.D. MICHENER, 1958. A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Scientific Bulletin*, 38 : 1409-1438.
- STUART, V., M.I. LUCAS & R.C. NEWELL, 1981. Heterotrophic utilisation of particulate matter from the kelp *Laminaria pallida*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 4 : 337-348.
- TROUSSELLIER, M. & B. BALEUX, 1981. Approche méthodologique pour l'analyse de peuplements bactériens hétérotrophes des étangs littoraux. *Acta Oecologia*, 2(1) : 63-74.
- TROUSSELLIER, M. & P. LEGENDRE, 1981. A functional evenness index for microbial ecology. *Microb. Ecol.*, 7 : 283-296.