

Distribution de divers types métaboliques bactériens sur un site hydrothermal profond (dorsale du Pacifique oriental à 13°N).

Daniel Prieur, Nadia Benbouzid-Rollet, Simone Chamroux, Pascale Durand,
Gaël Erauso, Evelynne Jacq, Christian Jeanthon, Geneviève Mével
et Patrick Vincent

CNRS, LP 4601, Station Biologique,
BP 74, 29682 Roscoff, France.

Résumé : Au cours de la campagne "Hydronaut" sur le site du 13°N, (dorsale du Pacifique oriental), des échantillons prélevés par le submersible "Nautil" (tissus d'invertébrés, eaux hydrothermales, échantillons solides) ont été analysés sur le plan bactériologique à bord du navire support "Nadir". Divers métabolismes bactériens du soufre et de l'azote, des métabolismes hétérotrophes non spécifiques, ainsi que des bactéries résistant aux métaux lourds ont été recherchés sur ces échantillons. Les résultats obtenus sur les différents milieux de culture, après incubation dans diverses conditions de température et de pression, ont permis de mettre en évidence tous les métabolismes recherchés. Les résultats diffèrent cependant en fonction de la nature de l'échantillon. Le micro-écosystème constitué par l'Annélide Polychète *Alvinella* et son tube, s'est révélé le plus diversifié, en ce qui concerne les types métaboliques présents, ce qui confirme les observations antérieures en microscopie électronique.

Abstract : During the "Hydronaut" cruise, at 13°N on the East Pacific Rise, invertebrates, hydrothermal waters, rocks and immersed surfaces were sampled by the submersible "Nautil" and processed aboard the mother-ship "Nadir" for bacteriological analysis. Bacteria involved in nitrogen and sulfur cycles, non specific heterotrophs, and heavy metal resistant bacteria were enriched from the various samples. All the searched metabolisms were detected after incubation under different conditions of temperature and pressure. However, results are different, according to the origin of the samples. The Polychaete *Alvinella* and its tube appeared to be the most diversified micro-environment, and this is in agreement with previous electron microscope observations.

INTRODUCTION

Tous les travaux consacrés à la biologie des sites hydrothermaux actifs de la ride du Pacifique oriental soulignent le rôle primordial des communautés bactériennes dans le fonctionnement de ces écosystèmes (voir Prieur *et al.*, 1987, pour revue).

Le fait le plus marquant est l'existence d'une production "primaire" locale, qui est le fait de bactéries chimioautotrophes que l'on rencontre libres, fixées sur des surfaces et surtout associées aux invertébrés consommateurs primaires (Jannasch et Wirsén, 1979, 1981 ; Cavanaugh, 1981 ; Tuttle *et al.*, 1983 ; Fiala-Médioni, 1984 ; Gaill *et al.*, 1984). Ces bactéries tirent l'énergie nécessaire à la fixation du CO₂ de l'oxydation de composés soufrés réduits présents dans les fluides hydrothermaux, et sont donc le premier maillon de la chaîne trophique de ces écosystèmes. L'essentiel des premières études microbiologiques consacrées aux sources hydrothermales profondes concerne d'ailleurs ce type métabolique (Ruby *et al.*, 1981 ; Jannasch *et al.*, 1985).

Pourtant, les composés susceptibles de jouer le rôle de donneurs ou d'accepteurs d'électrons pour les bactéries de ces milieux sont nombreux. Mais si l'éventail des métabolismes

bactériens possibles dans ce type d'environnement est très vaste (Lilley *et al.*, 1983 ; Jannasch & Mottl, 1985 ; Karl, 1987), assez peu de souches bactériennes ont été isolées et décrites.

C'est en particulier le cas pour le site du 13°N de la dorsale du Pacifique oriental, étudié depuis 1982 par les équipes françaises (Desbruyères *et al.*, 1982 ; Bianchi, 1986 ; Deming, 1986 ; Prieur & Jeanthon, 1987). Ce site a l'avantage de présenter à la fois des émissions hydrothermales de type "froid" auxquelles sont associées des Vestimentifères (*Riftia pachyptila*) et des bivalves (*Bathymodiolus thermophilus*), et des émissions de type "chaud", fumeurs blancs et noirs auxquels sont associés des peuplements des Polychètes *Alvinella pompejana* et *Alvinella caudata*.

Lors de la campagne "Hydronaut", organisée sur ce site par l'Ifremer en 1987, une recherche de bactéries appartenant à des types métaboliques variés a donc été entreprise sur des échantillons de natures diverses : eaux hydrothermales, fragments de cheminées, surfaces artificielles immergées, tissus d'invertébrés (Annélides Polychètes, Bivalves, Vestimentifères).

MATERIEL ET METHODES

Les échantillons étudiés ont été prélevés sur le site de 13°N (Desbruyères *et al.*, 1982) pendant la campagne "Hydronaut" à l'aide du submersible "Nautile". Les cultures d'enrichissement ont été effectuées dès la remontée des échantillons à bord du navire support "Nadir".

Les échantillons d'eaux hydrothermales ont été prélevés à l'aide de bouteilles de titane (pour les fluides chauds) ou d'un aspirateur à barillet pour les fluides froids. Ces échantillons ont été inoculés sans traitement préalable dans les milieux de culture. Les autres échantillons ont été prélevés directement par le bras télémanipulateur du submersible, et remontés à la surface soit dans le panier isotherme du submersible, soit dans une navette autonome.

Les fragments de cheminée ont été rincés à plusieurs reprises dans de l'eau de mer stérile filtrée à 0,2 µm, puis agités sur vortex pendant une minute dans de l'eau de mer stérile. Les surfaces artificielles immergées ont été frottées avec de la gaze stérile. Celle-ci est ensuite placée dans de l'eau de mer stérile et les bactéries sont décrochées au vortex. Les suspensions ainsi obtenues ont été inoculées dans les milieux de culture choisis.

Les échantillons d'invertébrés (*Alvinella pompejana*, *Alvinella caudata* et leurs tubes, *Bathymodiolus thermophilus*, *Riftia pachyptila*, *Tevnia jerichonana*) ont été d'abord rincés à l'eau de mer stérile filtrée, puis disséqués finement avec des instruments stériles, en fonction des organes à analyser. Les fragments ainsi obtenus sont à nouveau rincés à l'eau de mer stérile, puis broyés dans une eau de même qualité à l'aide d'un broyeur de tissus en verre ou d'un broyeur ultra-turax.

En fonction de leur origine, les enrichissements ont été incubés aux températures de 5,

20, 40 et 80°C. Certains échantillons ont été incubés parallèlement à la pression atmosphérique et en pression "in situ" reconstituée (260 atmosphères). Ces différentes conditions d'incubation seront précisées ultérieurement dans les tableaux de résultats.

Les bactéries sulfo-oxydantes ont été cultivées en milieu liquide contenant du thiosulfate ou du thiocyanate comme donneurs d'électrons (Adair & Gundersen, 1969 ; Tuttle & Jannasch, 1972) et dans des gradients de sulfure contenant Na_2S (Nelson & Jannasch, 1983). Les bactéries sulfato-réductrices ont été cultivées dans un milieu contenant du lactate et de l'acétate, selon Abd el Malek & Risk (1958) et Postgate (1966). Les bactéries intervenant dans le cycle de l'azote ont été enrichies dans les milieux spécifiques aux bactéries nitrifiantes, respirant les nitrates, dénitrifiantes et fixatrices d'azote, selon Lewis & Pramer (1958), Chamroux (1972), Postgate (1972), Mével (1986).

Les bactéries hétérotrophes non spécifiques ont été cultivées en boîtes de Petri contenant le milieu 2216E de Oppenheimer & Zobell (1952), et incubées en conditions aérobies et anaérobies. Le milieu TCBS (Kobayashi *et al.*, 1963) a également été employé pour la sélection des hétérotrophes de la famille des Vibrionacées. Deux autres milieux convenant à ce type de bactéries, mais contenant des acides aminés (casaminoacids Difco, 0,5 g/l, Chamroux, comm. pers.) ou des sucres comme seules sources de carbone ont été aussi utilisés.

Les bactéries hétérotrophes mangano-oxydantes ont été recherchées en boîtes de Petri contenant le milieu de Nealson (1978). Les bactéries hétérotrophes résistantes aux métaux lourds ont été cultivées sur le milieu 2216E, enrichi en cadmium (80 mg/l), zinc (100 mg/l), cuivre (90 mg/l), argent (10 mg/l) et arsenate (1770 mg/l) selon les résultats préliminaires de Jeanthon & Prieur (sous presse).

RÉSULTATS

Les échantillons d'Alvinellidés :

Les résultats concernant ce type d'échantillons sont donnés dans le tableau I.

Métabolismes du soufre : les bactéries sulfooxydantes utilisant le thiosulfate ont été cultivées à partir d'échantillons d'*A. pompejana*, *A. caudata* et de leurs tubes, après incubation à 20°C, à pression atmosphérique, et en pression "in situ" (260 atmosphères). A 40°C et en pression atmosphérique, une seule culture effectuée à partir d'un tube s'est révélée positive. Les autres sources d'énergie, thiocyanate et sulfures, ont donné très peu de résultats positifs ou présomptifs. Aucune souche n'a pu être isolée de ces échantillons. Les bactéries sulfato-réductrices ont été mises en évidence après culture à la pression atmosphérique d'échantillons de tubes d'Alvinellidés et de *P. grasslei*. Dans ces conditions de culture, elles n'ont pas pu être décelées chez *A. pompejana* et *A. caudata*. Par contre, ce type métabolique est présent dans ces mêmes échantillons, après incubation à 80°C sous pression "in situ".

Métabolismes de l'azote : la première étape de la nitrification (oxydation de NH_4 en

TABLEAU I

Résultats des cultures d'enrichissement effectuées sur des échantillons d'*Alvinellidés*. (- : culture négative ; + : culture positive, pas de souche isolées ; les chiffres indiquent le nombre de souches isolées d'une culture positive).

Origine	<i>Alvinella pompejana</i>						<i>Alvinella caudata</i>						Tubes d' <i>Alvinella</i>						<i>P. grasslei</i>
Pression	P. atm			P. in situ			P. atm			in situ			P. atm			in situ			P. atm
Temperature	20	40	80	20	40	80	20	40	80	20	40	80	20	40	80	20	40	80	40
SOUFRE																			
Thiosulfate	3	-		3		-	8	-		+		-	2	7		2		-	-
Thiocyanate	-	-		-		-	-	-		-		-	-	-		-		-	-
Na ₂ S							+	-											-
BSR	-	-		-		+	-	-		-		+	+	+		-		+	+
AZOTE																			
NH ₄ -NO ₂	8	+	7	3		-	15	-	9	8		-	25	-	4	13		-	-
NO ₂ -NO ₃	2	-	1	-		-	-	-		1		-	3	+		2		-	-
Respiration NO ₃	+	7		4		-	+	10		1		-	3	8		4		+	8
Dénitrification	-	5		4		-	-	6		1	6	-	3	1		3		-	5
Fixation N ₂ aéro	-	-		-		-	-	-		-		-	-	-		-		-	-
Fixation anaé	1	-		1		-	-	-		1		-	-	-		-		-	-
METAUX																			
Argent	39	-					21	+					37	+					-
Cuivre	30	-					22	-					25	+					-
Cadmium	7	-					14	-					15	+					-
Zinc	28	-					21	-					14	-					-
Selenium		-						-						+					
Arsenic	36	-					25	+					22	+					1
Oxydation Mn	12	-					16	2					8	+					-
HETEROTROPHES																			
2216E aérobie	37	-				-	35	+					40	+				-	-
2216E anaérobie	+	-					+	+					+	+					-
<i>Vibrionaceae</i>	-	-					-						-	+					-
Acides aminés	12	-					1	+					20	+					1
Carbohydrates	+						+	+				+							+

NO_2) a été mise en évidence dans les échantillons d'*Alvinella* et de leurs tubes incubés à la pression atmosphérique, et sous pression hydrostatique. De plus quelques souches ont pu être isolées à 20°C, à partir d'échantillons préalablement incubés à 80°C. La deuxième étape de la nitrification (oxydation de NO_2 en NO_3) a été décelée à 20°C chez *A. pompejana*, à 20 et 40°C dans les tubes d'Alvinellidés. Quelques souches ont également été isolées à 20°C d'échantillons préalablement incubés à 80°C. La respiration des nitrates a été mise en évidence chez pratiquement tous les échantillons d'Alvinellidés, incubés à 20 et 40°C, à la pression atmosphérique et à la pression "in situ". La dénitrification complète (production de N_2O ou N_2) a été notée chez ces mêmes échantillons incubés à 40°C, à la pression atmosphérique et à 20°C à la pression "in situ". La respiration des nitrates a été également observée pour un échantillon de tube d'*A. pompejana* incubé à 80°C en pression "in situ". La fixation d'azote en anaérobiose a été mise en évidence chez *A. pompejana*, après incubation à 20°C, en pression atmosphérique et en pression "in situ", ainsi que chez *A. caudata*, après incubation en pression "in situ", à 20°C.

Métabolismes hétérotrophes non spécifiques : Des souches capables d'utiliser des sources variées de carbone organique en anaérobiose et en aérobiose ont été isolées de pratiquement tous les échantillons testés, après incubation à 20 ou 40°C selon le cas. Il en est de même lorsque la source de carbone est composée uniquement d'acides aminés ou de carbohydrates. Dans ce dernier cas, une culture positive a également été obtenue après incubation à 80°C sous pression "in situ". Les Vibrionacées recherchées sur le milieu TCBS n'ont été cultivées que d'un échantillon de tube d'*A. pompejana*, incubé à 40°C.

Bactéries résistantes aux métaux : Des bactéries hétérotrophes résistantes à l'argent, au cuivre, au cadmium, au zinc et à l'arsenic ont été isolées de tous les échantillons étudiés d'*Alvinella*, et de tubes d'Alvinellidés. Dans le cas de *P. grasslei*, seules des souches résistantes à l'arsenic ont pu être isolées. La résistance au selenium n'a été testée que sur un nombre réduit d'échantillons, et seul un tube d'Alvinellidé a permis d'isoler des souches. Enfin des souches oxydant le manganèse ont pu être isolées d'*A. pompejana*, d'*A. caudata* et des tubes d'Alvinellidés.

Les échantillons de *Bathymodiolus thermophilus* :

Les résultats concernant ce type d'échantillons sont donnés dans le tableau II.

Métabolismes du soufre : Toutes les cultures ont été incubées à la pression atmosphérique. Une seule culture positive a été obtenue après incubation à 5°C d'un fragment de branchie. Après incubation à 20°C, des bactéries oxydant le thiosulfate ont été cultivées d'échantillons de coquilles, de branchies et d'intestin postérieur. Les échantillons de branchies ont donné également des cultures positives dans les gradients de sulfure, mais aucune souche n'a pu être isolée. Quant aux bactéries sulfato-réductrices, elles n'ont été cultivées qu'à partir d'un échantillon de glande digestive.

Métabolismes de l'azote : Après incubation à 5 et 20°C, des bactéries nitrifiantes, principalement nitrosantes ont été trouvées dans tous les échantillons étudiés. La respiration des nitrates a été observée à 20°C, mais pas la dénitrification, ni la fixation d'azote.

TABLEAU II

Résultats des cultures d'enrichissement effectuées sur des échantillons de *Bathymodiolus thermophilus*. (- : culture négative ; + : culture positive, pas de souche isolée ; les chiffres indiquent le nombre de souches isolées d'une culture positive).

Origine	Coquille		Branchies		Glande digestive		Intestin		Manteau
Pression	P.atm		P.atm		P.atm		P.atm		P.atm
Temperature	5	20	5	20	5	20	5	20	20
SOUFRE									
Thiosulfate	-	2	1	22	-	-	-	8	
Thiocyanate	-	-	-	-	-	-	-	-	
Na ₂ S				+		-	-	-	
BSR	-	-	-	-	-	+	-	-	
AZOTE									
NH ₄ -NO ₃	+	+	+	11	+	9	+	10	
NO ₂ -NO ₃	+	-	+	2	+	1	+	1	
Respiration		+		+		+		+	
Dénitrification		-		-		-		-	
Fixation N ₂ aéro	-	-	-	-	-	-	-	-	
Fixation N ₂ anaé	-	-	-	-	-	-	-	-	
METAUX									
Argent	-	17	-	4	-	-	-	-	-
Cuivre	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Cadmium	-	9	-	-	-	-	-	-	+
Zinc	-	-	-	10	-	-	-	-	-
Selenium		4		-		-		-	
Arsenic	-	10	-	9	-	1	-	-	5
Oxydation Mn	-	12	-	13	-	8	-	-	
HETEROTROPHES									
			P.atm	Pat P.h	P.atm	Pat P.h			
2261E aérobie	-	26	-	15 +	-	11 +	-	3	14
2216E anaérobie		+		+		-	-	-	
<i>Vibrionaceae</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	
Acides aminés	-		-	+	-	+	-	-	
Carbohydrates				+					

Métabolismes hétérotrophes non spécifiques : Aucune culture n'a été obtenue à 5°C. A la pression atmosphérique, et à 20°C, des bactéries cultivant sur le milieu 2216E en aérobiose ont été obtenues des 4 types d'échantillons étudiés. En anaérobiose, seules les cultures issues des coquilles et de branchies ont été positives. En présence d'acides aminés comme source de carbone, des cultures ont été obtenues d'échantillons de branchies et de glandes digestives. Les carbohydrates n'ont permis la culture que de souches provenant des branchies. Aucune culture de Vibrionacées n'a été obtenue. Enfin, l'incubation d'échantillons de branchie et de glande digestive sur le milieu 2216E, en pression "in situ", a donné des résultats positifs.

Bactéries résistantes aux métaux : Les échantillons de coquille ont donné des cultures positives pour tous les métaux étudiés, à l'exception du zinc. Dans le cas des branchies, seules des souches résistantes à l'argent, au zinc, à l'arsenic et oxydant le manganèse ont été obtenues. Les échantillons de glande digestive ont donné des souches résistantes à l'arsenic et au cadmium. Enfin, aucune souche n'a été obtenue des échantillons d'intestin postérieur.

Les échantillons de Vestimentifères :

Les résultats concernant ces échantillons sont donnés dans le tableau III :

Métabolismes du soufre : Des bactéries oxydant le thiosulfate ont été cultivées d'échantillons de *R. pachyptila*, d'un tube de cette espèce, ainsi que de *T. Jerichonana*. Un échantillon de tube de *R. pachyptila* a permis également de cultiver des bactéries sulfatoréductrices. Un résultat positif a été également obtenu après incubation sous pression "in situ" d'un échantillon de *R. pachyptila*.

Métabolismes de l'azote : Des bactéries nitrosantes ont été cultivées des échantillons de *Riftia*, *Tevnia* et de tubes de *Riftia*. Par contre, une seule souche de bactérie nitrifiante a été isolée d'un échantillon de *Riftia*. Des bactéries respirant le nitrate, et dénitrifiantes ont été isolées d'un échantillon de *Riftia*, incubé en pression hydrostatique.

Métabolismes hétérotrophes non spécifiques : Des bactéries utilisant des acides aminés comme source de carbone ont été cultivées à partir des échantillons de *Riftia* et de *Tevnia*, en aérobiose, tandis que seul les échantillons de *Tevnia* ont permis des cultures en anaérobiose. Des cultures positives ont également été obtenues sur les milieux contenant des acides aminés ou des carbohydrates comme seule source de carbone.

Bactéries résistantes aux métaux : Des souches résistantes à l'argent, au cadmium, à l'arsenic, et oxydant le manganèse ont pu être isolées d'échantillons de *Riftia* et de *Tevnia* incubés à 20°C.

Les échantillons d'eaux hydrothermales :

Les résultats concernant ces échantillons sont donnés dans le tableau IV.

Métabolismes du soufre : Des bactéries sulfo-oxydantes utilisant le thiosulfate ont été cultivées à la pression atmosphérique et à 40°C à partir d'un seul échantillon. Après incuba-

TABLEAU III

Résultats des cultures d'enrichissement effectuées sur des échantillons de Vestimentifères. (- : culture négative ;
+ : culture positive, pas de souche isolée ; les chiffres indiquent le nombre de souches isolées d'une culture positive).

Origine	<i>Riftia pachytila</i>		<i>Tevnia jerichonana</i>		Tubes <i>Riftia</i>
Pression	P.atm	P.in situ	P.atm	P.in situ	P.atm
Temperature	20	20	20	20	20
SOUFRE					
Thiosulfate	6	6	+	-	5
Thiocyanate	-	-	-	-	
Na ₂ S					
BSR	-	-	-	-	+
AZOTE					
NH ₄ -NO ₂	12	-	8	-	6
NO ₂ -NO ₃	1	-	-	-	-
Respiration NO ₃	1	15			
Dénitrification		14			
Fixation N ₂ aéro	-	-	-	-	
Fixation N ₂ anaé	-	-	-	-	
METAUX					
Argent	4		-		
Cuivre	-		-		
Cadmium	4		1		
Zinc	-		-		
Sélénium	-				
Arsenic	1		3		
Oxydation Mn	5		11		
HETEROTROPHES	P.atm	P.atm			
	20	40			
2216E aerobie	14		2		
2216E anaerobie	-		+		
<i>Vibrionaceae</i>	-		-		
Acides aminés	+		-		
Carbohydrates		+			

tion à 20°C en pression hydrostatique, des cultures positives ont été obtenues de deux échantillons. Des bactéries sulfato-réductrices ont également été cultivées à partir de deux échantillons, dont l'un était incubé à 80°C, en pression "in situ".

Métabolismes de l'azote : Des bactéries nitrosantes ont été isolées de deux échantillons, tandis qu'une seule souche de bactérie nitratante était isolée de l'un de ces échantillons. Les

TABLEAU IV

Résultats des cultures d'enrichissement effectués sur des échantillons d'eaux hydrothermales. (- : culture négative ; + : culture positive, pas de souche isolée ; les chiffres indiquent le nombre de souches isolées d'une culture positive).

Bouteille	Titane				Aspirateur								Titane			
Site	TOTEM												PARIGOSUD		ELSA	
Pression	P.atm		P. in situ		P. atm		in situ	P. atm		in situ	P. atm		P.atm			
Temperature	20	40	20	80	40	80	20	40	80	20	40	80	40		40	80
Echantillon	éch 24				éch 43			éch 44			éch 51		éch 6		éch 42	
SOUFRE																
Thiosulfate			+	-			-		-	6		-	8		-	
Thiocyanate			-	-			-						-		-	
Na2S													-			
BSR			+	+			-		-	-		-	-		+	
AZOTE																
NH4-NO2			5	-		-			-			-	9		-	-
NO2-NO3			1	-		-						-	-		-	-
Respiration NO3			4	+		-			-			-	11			-
Dénitrification			+	+		-			-			-	3			-
Fixation N2 aéro			-	-		-			-			-	-		-	-
Fixation N2 anaé			-	-		-			-			-	-		-	-
METAUX																
Argent						-			-						-	
Cuivre						-			-						18	
Cadmium						-			-						7	
Zinc						-			-						15	
Selenium																
Arsenic						-			-						15	
Oxydation Mn	15	7			11			8			+				14	
HETEROTROPHES																
2261E aerobie	+	+	+	-	+		+	+		+	-				+	
2216E anaerobie	+	+			-			-								
Vibrionaceae	+	-			-			+			-				-	
Acides aminés					+			+			+				+	
Carbohydrates																

bactéries respirant le nitrate, ou dénitrifiantes, ont été isolées de seulement deux échantillons, incubés à 20°C en pression hydrostatique, à 40°C en pression atmosphérique, ainsi que à 80°C en pression hydrostatique.

Métabolismes hétérotrophes non spécifiques : Pratiquement tous les échantillons étudiés ont donné des cultures de bactéries hétérotrophes, les résultats variant légèrement selon les conditions d'incubation. Des Vibrionacées ont été également isolées de deux échantillons.

Bactéries résistantes aux métaux : Tous les échantillons n'ont pu être testés en ce qui concerne la présence de bactéries résistantes aux métaux. L'échantillon 42 a seul permis d'obtenir des souches résistantes au cuivre, au cadmium, au zinc et à l'arsenic. Pour ces mêmes métaux, les autres échantillons n'ont donné aucune culture positive. Par contre, des bactéries oxydant le manganèse ont été trouvées dans tous les échantillons sauf un.

Les échantillons solides.

Les résultats concernant ces échantillons sont donnés dans le tableau V.

Métabolismes du soufre : A l'exception d'une communauté développée sur gradient de sulfure, aucun métabolisme sulfo-oxydant n'a été mis en évidence sur des échantillons de cheminées. Par contre, ce métabolisme a été trouvé sur les surfaces artificielles immergées de quelques jours (échantillons 21, 52, 53) à plusieurs années (échantillon 31). Des bactéries sulfato-réductrices ont été cultivées à partir de plusieurs des échantillons de cheminées et de surfaces, et il faut noter une culture positive, après incubation à 80°C, en pression "in situ", sur l'échantillon 36.

Métabolismes de l'azote : Les bactéries nitrosantes ont été cultivées des divers types d'échantillons analysés, tandis que les bactéries nitrifiantes sont pratiquement absentes des fragments de cheminée. Les bactéries respirant le nitrate sont fréquentes, pour tous les échantillons, les dénitrifiantes étant décelées uniquement dans les échantillons de cheminée ou sur les surfaces immergées depuis une longue période.

Métabolismes hétérotrophes non spécifiques : Pratiquement tous les échantillons ont permis l'obtention de cultures hétérotrophes en aérobose ou en anaérobose. Des Vibrionacées ont été cultivées à partir d'échantillons de cheminées et de surfaces immergées pendant de courtes et longues périodes.

Bactéries résistantes aux métaux : Assez peu d'échantillons ont pu être inoculés sur des échantillons contenant de fortes concentrations de métaux. Néanmoins, lorsque cela a été le cas (échantillons 12, 55) des souches résistantes à presque tous les métaux choisis ont été mises en évidence. Par ailleurs, tous les échantillons ont permis d'isoler des souches oxydant le manganèse.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'objectif de la campagne "Hydronaut", en bactériologie, était la recherche de divers métabolismes bactériens associés aux invertébrés hydrothermaux, mais aussi à d'autres échantillons (eaux hydrothermales, surfaces immergées). Compte tenu de la nature des

TABLEAU V

Résultats des cultures d'enrichissement effectuées sur des échantillons solides (fragments de cheminées et surfaces immergées). (- : culture négative ; + : culture positive, pas de souche isolée ; les chiffres indiquent le nombre de souches isolées d'une culture positive).

Origine	Cheminées						Ardoises		Tubes titane			
Site	Parigo		Totem			Leslie	Parigo		Totem			
Pression	P.atm		P. atm		P. in situ	P. atm	P. atm	P. in situ	P. atm	P. in situ	P. atm	
Temperature	20	40	40	40	80	40	20	20	20	20	20	20
Echantillon	éch 5	éch 5	éch 12	éch 36	éch 36	éch 55	éch 31	éch. 31	éch 21	éch 21	éch 52	éch 53
SOUFRE+												
Thiosulfate	-	3	-		-	-	+	+	+	+	6	
Thiocyanate	-	-	-		-		-	-	-	-		
Na ₂ S				+			+				+	-
BSR	+	-			+	-	-	-	-	-	+	-
AZOTE												
NH ₄ -NO ₂	6	-	8		3		7	-	9		2	-
NO ₂ -NO ₃	-	-	-		1		3	-	1		3	-
Respiration NO ₃	1	7	7	+	-	4	1	+			+	5
Dénitrification	+	7	1	+	-	1	1	1			-	-
Fixation N ₂ aéro	-	-	-		-		-	-			-	-
Fixation N ₂ anaé	-	-	-		-		-	-			-	-
METEAUX												
Argent			-									
Cuivre			-			+						
Cadmium			2			6						
Zinc			+			12						
Selenium			2									
Arsenic			7			11						
Oxydation Mn			25			12			3		9	11
HETEROTROPHES												
2261E aerobie			21	+		+	+	+	+	+	+	+
2216E anaerobie				+					+			
<i>Vibrionaceae</i>				+		5	+		-		-	+
Acides aminés			+			+					+	-
Carbohydrates							+					

échantillons, mais aussi des conditions de température et de pression retenues pour l'incubation, c'est environ 1000 cultures microbiennes qui ont été réalisées. A partir des cultures positives (>200), 1400 isolats bactériens ont été obtenus.

En ce qui concerne le cycle du soufre, des communautés sulfooxydantes ont été mises en évidence dans pratiquement tous les types d'échantillons étudiés. Ce résultat n'est pas étonnant, compte tenu de la prépondérance de ce type métabolique, signalé par plusieurs auteurs. Les résultats les plus nombreux ont été obtenus dans les milieux de culture contenant du thiosulfate. Les cultures positives proviennent d'échantillons incubés à la pression atmosphérique, ou en pression "in situ", à la température de 20°C principalement. Le deuxième métabolisme du soufre étudié, la réduction des sulfates, a été détecté également dans un grand nombre d'échantillons d'origines variées. Ce métabolisme, signalé auparavant par peu d'auteurs (Lilley *et al.*, 1983 ; Bianchi, 1986) semble donc assez répandu. Le produit final de ce métabolisme étant l'hydrogène sulfuré, la contribution des bactéries à la production "in situ" de ce composé doit être considérée à l'avenir. D'une part, il est possible d'envisager des interactions sur un microsite donné, entre bactéries sulfatoréductrices et bactéries sulfoxydantes. Une telle interaction avait déjà été envisagée par Prieur et Jeanthon (1987) à propos des bactéries hétérotrophes, également productrices d'hydrogène sulfuré, par dégradation d'acides aminés soufrés. D'autre part, la présence de bactéries sulfatoréductrices dans plusieurs échantillons d'eaux hydrothermales, dans des fragments de cheminée, l'existence de ce métabolisme après incubation à 80°C et 250 atmosphères, reposent la question de l'origine biologique d'une partie de l'hydrogène sulfuré (Baross *et al.*, 1982). Malheureusement, ces cultures n'ont pu être maintenues, et aucune souche de ces derniers échantillons n'a été isolée.

La fixation d'azote n'a été mise en évidence que dans de rares échantillons du Polychète *Alvinella*. Par contre, les bactéries nitrifiantes (nitrosantes et nitratantes) ont été décelées dans tous les types d'échantillons étudiés. D'une manière générale, elles ont été isolées à 20°C, mais une activité nitrifiante a également été observée à 5°C dans les échantillons de *Bathymodiolus*, et les isolements de souches sont en cours. Parmi les souches isolées, les nitrosantes sont beaucoup plus nombreuses que les nitratantes, environ huit fois plus. Cependant les souches nitrosantes isolées n'ont produit que de 2 à 10 $\mu\text{atg N.NO}_2/\text{litre}$ après trois semaines d'incubation, la majorité des souches ne produisant pas plus de 2 $\mu\text{atg N.NO}_2/\text{litre}$, ce qui est extrêmement faible, comparativement aux souches terrestres et marines déjà connues (Mével, 1986). Ces premiers résultats laissent penser que dans le site hydrothermal étudié, l'oxydation de l'azote pourrait être en partie assurée par des bactéries méthanotrophes. En effet, ces bactéries, d'ailleurs signalées en milieu hydrothermal (Jannasch & Wirsén, 1981) sont également capables d'oxyder NH_4 , et de produire de petites quantités de NO_2 (O'Neill & Wilkinson, 1977 ; Dalton, 1977).

La respiration des nitrates a également été trouvée chez pratiquement tous les types d'échantillons. La dénitrification complète a quant à elle été trouvée dans des échantillons d'*Alvinella*, de *Riftia*, d'eaux hydrothermales et de solides immergés. Ce dernier métabolisme semble être en relation avec la température, car il est plus fréquent à 40°C. De plus l'in-

tensité de la dénitrification est remarquable : l'apparition d'azote est très nette en 24 heures, ce qui suppose des taux de croissance rapides. La fréquence de souches dénitrifiantes vraies peut ainsi entraîner une perte d'azote pour l'écosystème, non compensée par la fixation qui ne semble pas importante. D'autre part, dans ce milieu où l'essentiel des synthèses est assuré par les bactéries, la réduction assimilative du nitrate, mise en évidence chez une grande partie des échantillons, pourrait être une voie quantitativement importante en ce qui concerne la synthèse d'azote organique, selon le schéma décrit par Brown et Johnson (1977).

Les métabolismes hétérotrophes non spécifiques ont été peu étudiés en milieu hydrothermal profond, la chimiosynthèse autotrophe étant considérée comme le type métabolique bactérien primordial. Or, compte tenu de biomasses concentrées sur de faibles surfaces, la présence de microorganismes hétérotrophes, utilisant la matière organique dissoute et particulaire produite par les invertébrés, est tout à fait normale. Ainsi, Lilley *et al.* (1983) ont montré que ces bactéries étaient plus nombreuses que les sulfoxydants dans des échantillons d'eaux. Effectivement, au cours de ce travail, des bactéries hétérotrophes aérobies et anaérobies ont pu être cultivées et isolées à partir de presque tous les types d'échantillons analysés.

Contrairement aux métabolismes du soufre et de l'azote, la présence de bactéries hétérotrophes non spécifiques n'est pas suffisante pour ébaucher des commentaires. Seule l'étude détaillée des souches pures apportera des informations sur les potentialités de ces bactéries en ce qui concerne l'utilisation des substrats carbonés. Il est cependant possible de commenter la recherche de Vibrionacées, effectuée à l'aide d'un milieu de culture spécifique (Kobayashi *et al.*, 1963). Ces bactéries sont pratiquement absentes des échantillons d'Alvinellidés, et totalement des échantillons de bivalves. Or, il s'agit d'un type bactérien connu comme fréquemment associé aux tissus des invertébrés marins (Prieur, 1982). Par contre ces bactéries ont été trouvées dans des échantillons d'eaux "hydrothermales, sur des fragments de cheminée, ou des surfaces" immergées. L'étude détaillée des souches isolées sera là aussi nécessaire pour mieux apprécier ces résultats.

Le comportement des bactéries vis-à-vis des métaux a été abordé par deux approches. D'une part des bactéries résistantes à des concentrations élevées de plusieurs métaux lourds, d'autre part des bactéries réalisant l'oxydation du manganèse ont été recherchées. Des bactéries répondant à ces critères ont été cultivées dans la plupart des échantillons.

Les essais de culture de bactéries associées aux invertébrés ont donné des résultats différents selon les échantillons considérés. Très peu de cultures des Vestimentifères *Riftia* et *Tevnia* ont été positives. C'est chez ces Invertébrés qu'ont été mises en évidence les associations les plus étroites avec des bactéries (Felbeck, 1981). A ce jour, aucune culture des bactéries symbiontes n'a été obtenue dans d'autres laboratoires, et il faut donc considérer ces résultats avec la plus grande prudence, même si des cultures de bactéries sulfoxydantes, de bactéries respirant les nitrates ainsi que des dénitrifiantes vraies ont été obtenues, soit des métabolismes reconnus pour les symbiontes de *Riftia*. Quant aux hétérotrophes non spécifiques isolées en très petit nombre des Vestimentifères, il est vraisemblable qu'il s'agit de contaminants.

C'est également très peu de cultures positives qui ont été obtenues à partir de *Bathymodiolus thermophilus*. Dans le cas des échantillons de branchies, le problème est très voisin de celui de *Riftia*, et il convient d'être très prudent à propos des souches isolées. Ce qui est plus surprenant, c'est le petit nombre de cultures positives, y compris pour les hétérotrophes, qui ont été isolées de l'intestin postérieur. En effet, cet organe est chez les bivalves côtiers, responsable de l'accumulation de matériel bactérien non digéré (Minet *et al.*, 1987). Les résultats négatifs obtenus pourraient correspondre soit à l'analyse d'exemplaires non alimentés, soit à un transit digestif beaucoup plus rapide que chez les espèces côtières. L'absence de Vibrionacées, pourtant présentes dans le milieu extérieur, pourrait s'expliquer de la même façon.

Dans trois groupes d'invertébrés étudiés, c'est sans doute les Alvinellidés qui présentent les associations bactériennes les plus spectaculaires (au moins sur le plan morphologique) et les plus énigmatiques sur le plan fonctionnel. Les résultats obtenus sur les deux espèces d'*Alvinella* et leurs tubes indiquent la grande variété de métabolismes bactériens associés à ces espèces. Parmi les résultats les plus remarquables, il faut noter la présence de communautés sulfatoréductrices développées après incubation sous 250 atmosphères et 80°C. Ces souches n'ayant pu être isolées, ce point devra être considéré lors d'une prochaine campagne. L'un des rôles attribués à la microflore épibionte des polychètes, est un rôle de détoxification (Cosson-Mannevy *et al.*, 1986 ; Prieur et Jeanthon, 1987). Ceci sous-entend que les bactéries soient à la fois capables de résister à de fortes concentrations en métaux, et de les concentrer. Plus de 300 souches résistantes au zinc, cadmium, cuivre, arsenic ou argent ont effectivement été isolées d'échantillons d'Alvinellidés, constituant un matériel convenant à la vérification de cette hypothèse. Pour toutes ces raisons, les Alvinellidés et leurs tubes se révèlent des modèles privilégiés pour les bactériologistes, et l'étude des souches provenant de ce microécosystème seront étudiées en priorité.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient D. Desbruyères et A.M. Alayse-Danet (IFREMER) d'avoir invité trois d'entre eux à participer à la campagne "Hydronaut". Ce travail a bénéficié du soutien de l'IFREMER (contrat 88 2470219), du PNEHO et du GDR "Ecophryce".

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- ABD EL MALEK, Y. & S.G. RIZK, 1958. Counting of sulphate reducing bacteria in mixed bacterial populations. *Nature*, 23 : 532.
- ADAIR, F.W. & K. GUNDERSON, 1969. Chemoautotrophic bacteria in the marine environment. I. Isolation, cultivation and distribution. *Can. J. Microbiol.*, 15 : 345-353.
- BAROSS, J.A., M.D. LILLEY & L.I. GORDON, 1982. Is the CH₄-H₂ and CO venting from submarine hydrothermal systems produced by thermophilic bacteria ? *Nature*, 303 : 423-426.

- BIANCHI, A., 1986. Présence et activité bactérienne dans deux sites d'hydrothermalisme océanique profond du Pacifique. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 303, ser. III : 561-564.
- BROWN, C.M. & B. JOHNSON, 1977. Inorganic nitrogen assimilation in aquatic microorganisms. *Adv. aqua. Microbiol.*, 1 : 49-114.
- CHAMROUX, S., 1972. Étude des bactéries marines réduisant le nitrate. 1 : Isolement. *Ann. Inst. Pasteur*, 122 : 475-481.
- CAVANAUGH, C.M., 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats. *Nature*, 302 : 58-61.
- COSSON-MANNEVY, M.A., R. COSSON & F. GAILL, 1986. Mise en évidence de protéines de type métallothionéine chez deux invertébrés des sources hydrothermales, le pogonophore vestimentifère *Riftia pachyptila* et l'annélide polychète *Alvinella pompejana*. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 302, Ser (III) : 351-352.
- DALTON, H., 1977. Ammonia oxidation by the methane oxidizing bacterium *Methylococcus capsulatus* strain Bath. *Arch. Microbiol.*, 114 : 273-279.
- DEMING, J.W., 1986. The biotechnological future for newly described, extremely thermophilic bacteria. *Microb. Ecol.*, 12 : 111-119.
- DESBRUYÈRES, D., P. CRASSOUS, J. GRASSLE, A. KHRIPOUNOFF, D. REYSS, M. RIO & M. VAN PRAET, 1982. Données écologiques sur un nouveau site d'hydrothermalisme actif de la ride du Pacifique oriental. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 295, Ser (III) : 489-494.
- FELBECK, H., 1981. Chemoautotrophic potential of the hydrothermal vent tube worm, *Riftia pachyptila* (Vestimentiferan). *Science*, 213 : 336-338.
- FIALA-MÉDIONI, A., 1984. Mise en évidence par microscopie électronique à transmission de l'abondance de bactéries symbiotiques dans la branchie de Mollusques bivalves de sources hydrothermales profondes. *C.R. Acad. Sci. Paris*, 298, Ser (III) : 487-492.
- GAILL, F., D. DESBRUYÈRES & D. PRIEUR, 1987. Bacterial communities associated with "Pompei worms" from the East Pacific rise hydrothermal vents : SEM, TEM observations. *Microb. Ecol.*, 13 : 129-139.
- JANNASCH, H.W. & C.O. WIRSEN, 1979. Chemosynthetic primary production at East Pacific sea floor spreading centers. *Bioscience*, 29 : 592-598.
- JANNASCH, H.W. & C.O. WIRSEN, 1981. Morphological survey of microbial mats near deep-sea thermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41 : 428-438.
- JANNASCH, H.W. & M.J. MOTT, 1985. Geomicrobiology of deep-sea hydrothermal vents. *Science*, 229 : 717-725.
- JANNASCH, H.W. & C.O. WIRSEN, 1985. The biochemical versatility of chemosynthetic bacteria at deep-sea hydrothermal vents. *Biol. Soc. Wash. Bull.*, 6 : 325-334.
- JEANTHON, C. & D. PRIEUR. Resistance to heavy metals of heterotrophic bacteria isolated from the deep-sea hydrothermal vent Polychaete, *Alvinella pompejana*. *Progress in Oceanography, sous presse*.
- KARL, D.M., 1987. Bacterial production at deep-sea hydrothermal vents and cold seeps : evidence for chemosynthetic primary production. In : "Ecology of microbial communities", M. Fletcher, T.R. Gary & J.G. Jones, Eds. *Proc. 41 st Symposium of the Society for General Microbiology. Cambridge University Press*.
- KOBAYASHI, T., R. ENOMOTO, R. SAKAZAKI & S. KUWAHARA, 1963. A new selective isolation medium for pathogenic vibrios : TCBS agar. *Jap. J. Bact.*, 18 : 387-391.
- LEWIS, R.F. & D. PRAMER, 1958. Isolation of *Nitrosomonas* in pure culture. *J. Bacteriol.*, 76 : 524-528.
- LILLEY, M.D., J.A. BARROS & L.I. GORDON, 1983. Reduced gases and bacteria in hydrothermal fluids : the Galapagos spreading center and 21°N East Pacific Rise. In : "Hydrothermal processes of seafloor spreading centers". Eds. Rona, P.A.; Boström, K., Laubier, L., Smith, K.L. Jr. Plenum Press, N.Y. pp 411-419.
- MÉVEL, G., 1986. Contribution à l'étude de la nitrification dans l'eau et le sédiment d'écosystèmes littoraux et estuariens. Étude "in situ" et expérimentale. *Thèse Doc. Etat., Univ. Brest*, 315 pp.
- MINET, J., T. BARBOSA, D. PRIEUR & M. CORMIER, 1987. Mise en évidence du mécanisme impliqué dans la concentration des bactéries par la moule, *Mytilus edulis*. *C.R. Acad. Sci. Paris, ser III*, 305 : 351-354.
- NEALSON, K.H., 1978. The isolation and characterization of marine bacteria which catalyze manganese oxydation. In : "Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology, chap. 66 : 847-858.
- NELSON, D.C. & H.W. JANNASCH, 1983. Chemoautotrophic growth of a marine *Beggiatoa* in sulfide-gradient cultures. *Arch. Microbiol.*, 136 : 262-269.
- O'NEILL, J.G. & J.F. WILKINSON, 1977. Oxidation of ammonia by methane-oxidizing bacteria and the effects of ammonia on methane oxidation. *J. Gen. Microbiol.*, 100 : 407-412.
- 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.
- POSTGATE, J.R., 1966. Media for sulphur bacteria. *Lab. Pract.*, 15 : 1239-1244.

- POSTGATE, J.R. 1972. The acetylene reduction test for nitrogen fixation. In : "*Methods in microbiology, vol 6B*", pp. 343-356. Norris, J.R. et Ribbons, P.W. Eds. Academic Press, London & New York.
- PRIEUR, D., 1982. La microflore du tractus digestif des Bivalves marins. Étude expérimentale chez la moule, *Mytilus edulis*. *Malacologia*, 22 : 653-658.
- PRIEUR, D. & C. JEANTHON, 1987. Preliminary study of heterotrophic bacteria isolated from two deep-sea hydrothermal vent invertebrates : *Alvinella pompejana* (Polychaete) and *Bathymodiolus thermophilus* (Bivalve). *Symbiosis*, 4 : 87-98.
- PRIEUR, D., C. JEANTHON & E. JACQ, 1987. Les communautés bactériennes des sources hydrothermales profondes du Pacifique oriental. *Vie et Milieu*, 37 : 149-164.
- RUBY, E.G., C.O. WIRSEN & H.W. JANNASCH, 1981. Chemolithotrophic sulfur oxidizing bacteria from the Galapagos rift hydrothermal vents. *Appl. Environ. Microbiol.*, 42 : 317-324.
- TUTTLE, J.H. & H.W. JANNASCH, 1972. Occurrence and type of *Thiobacillus* like bacteria in the sea. *Limn. Oceanogr.*, 17 : 532-543.
- TUTTLE, J.H., C.O. WIRSEN & H.W. JANNASCH, 1983. Microbial activities in the emitted hydrothermal waters of the Galapagos Rift vents. *Mar. Biol.*, 73 : 293-299.