

## Distribution et rôle des bactéries dans les Systèmes Océaniques

Armand BIANCHI

Microbiologie Marine, CNRS U.P.R. 223, Faculté des Sciences de Luminy Case 907, Marseille (France)

### (Résumé\*)

**1. La zone littorale.** La production bactérienne hétérotrophe représente de 20 à 40% de la production primaire quotidienne. Pendant la floraison des algues les bactéries présentent une grande versatilité nutritionnelle, orientée vers l'utilisation des composés organiques dissous de faible poids moléculaire. Lors du déclin du phytoplancton ces bactéries sont remplacées par des cellules mieux équipées en exoenzymes leur permettant de dégrader les composés de poids moléculaire élevé constituant les algues mortes. L'assimilation d'azote dissous par ces micro-organismes conduit à une production d'azote organique particulaire (sous forme de cellules bactériennes) de l'ordre de  $7 \mu\text{g aN l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , et à la régénération de  $0.50 \mu\text{g aN.NH}_4^+ \text{ l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Les microprédateurs peuvent se développer à des taux de croissance de  $1,7$  à  $2,7 \text{ j}^{-1}$ , équivalents à ceux des bactéries qu'ils ingèrent à des taux horaires pouvant atteindre 70% de leur propre volume. Ces capacités d'ingestion expliquent l'efficacité des prédateurs dans la régulation des effectifs microbiens.

L'étude de l'impact d'un apport fluvial sur les microflores a été étudiée au niveau du débouché du Rhône en Méditerranée. Les micro-organismes phototrophes et les hétérotrophes sont plus abondants dans les eaux du fleuve que dans l'eau de mer, mais les activités (taux d'incorporation de thymidine et de leucine) sont similaires dans les deux systèmes, avec une plus forte activité par cellule dans l'eau de mer. Dans la couche d'interface les concentrations bactériennes sont faibles, mais les taux d'incorporation des traceurs sont doubles par rapport à ceux mesurés dans l'eau de mer et dans l'eau douce.

**2. Le milieu pélagique.** Les concentrations, les biomasses et les activités bactériennes diminuent avec la profondeur d'eau. Ces diminutions sont irrégulières, liées aux variations de concentration en matériel énergétique. Les activités métaboliques doivent être mesurées en respectant les conditions de température et pression de leur niveau d'origine. Une étude comparative (prélèvement et culture d'eau profonde sans décompression, mise en incubation *in situ* par submersible) montre que la décompression pourrait provoquer une inhibition des activités respiratoires. Dans les conditions du milieu profond l'essentiel de la matière organique serait essentiellement respirée et consacrée au métabolisme cellulaire de base.

Les microflores associées aux particules sont taxonomiquement et physiologiquement différentes des bactéries libres dans l'eau. Siège principal de la nitrification dans la colonne d'eau, elles peuvent fonctionner comme des couples d'oxydo-réduction où peuvent cohabiter des bactéries aérobies telles que les nitrifiantes, et des anaérobies telles que les méthanogènes méthylophiles. On retrouve dans le matériel particulaire certaines espèces de bactéries également isolées des tractus digestifs de la faune marine.

**3. L'interface eau-sédiment.** Pour définir dans quelle mesure les bactéries associées au matériel particulaire déposé s'intègrent dans la microflore des sédiments on a comparé les souches isolées de plusieurs centaines d'échantillons d'eau et de sédiments prélevés au niveau de l'interface benthique. Ces comparaisons ont montré la très nette distinction entre les microflores des eaux proches du fond, composées essentiellement de pseudomonades, et les microflores, plus hétérogènes, des sédiments les plus superficiels où ce groupe est minoritaire. A cette différenciation taxonomique des communautés microbiennes pélagiques et benthiques correspond une différenciation physiologique. Dans les masses d'eau profondes les bactéries disposent essentiellement de matériel organique dissous, le matériel particulaire labile ayant été dégradé lors de sa chute. Le métabolisme de ces microflores est surtout orienté vers l'utilisation des composés organiques de faible poids moléculaire. Dans le sédiment de surface la réserve organique comprend du matériel particulaire frais produit par la macrofaune benthique. Ce matériel est scindé en petites molécules avant utilisation, d'où la fréquence et la diversité des exoenzymes produites par les bactéries des sédiments superficiels par rapport aux capacités exoenzymatiques réduites des microflores des eaux sus-jacentes.

**4. Les sédiments.** Dans les 10 premiers mm, des effectifs en bactéries hétérotrophes viables importants (plusieurs millions de bactéries/ml de sédiment) n'ont pu être observés que dans les zones lagunaires ou la fringe littorale. Au delà d'une centaine de m de profondeur d'eau les effectifs dans les sédiments superficiels sont plus faibles, limités à quelques milliers ou dizaines de milliers de cellules viables par ml.

Dans l'épaisseur sédimentaire les effectifs des microflores diminuent rapidement. Quelle que soit leur concentration à la surface du sédiment, on observe très fréquemment une diminution des effectifs bactériens de l'ordre d'une puissance de 10 lors à chaque passage du film de surface (inférieur à 1 mm) à la pellicule sous-jacente de 2mm, puis à la couche de 2cm et au sédiment de subsurface (2 à 10 cm). Les passées sédimentaires stériles alternent avec des niveaux bactériologiquement actifs. On a pu dénombrer plusieurs millions de bactéries viables par ml de sédiment dans des niveaux agés de plusieurs millions d'années. Ces microflores anciennes ne sont pas sporulées, leur persistance implique donc le maintien d'une activité métabolique, limitée mais permanente depuis leur dépôt. Ces conditions permettent une activité géochimique microbienne au cours de la diagenèse précoce.

Dans les sédiments le principal facteur de régulation des activités microbiennes est la nature et la concentration des accepteurs terminaux d'électrons. Selon les concentrations en oxygène moléculaire, en substrats fermentescibles, en nitrate, en sulfate, la matière organique est préférentiellement dégradée par le type bactérien le mieux adapté qui devient prédominant. Il impose ses produits métaboliques qui seront repris plus ou moins rapidement par d'autres chaînes microbiennes. En milieu anoxygène la minéralisation est donc réalisée par une succession de réactions d'oxydo-réduction, effectuées par différents types bactériens spécifiques. Dans des sédiments on peut mettre en évidence la présence concomitante de populations microbiennes aérobies et anaérobies, distribuées dans des microniches à leur échelle de taille. Les microaérophiles, qui exigent la présence d'oxygène moléculaire mais à une concentration inférieure à celle de l'air paraissent bien adaptées aux environnements sédimentaires. Parmi les activités anaérobies la sulfato-réduction se traduit par centaines de  $\mu\text{moles}$  de sulfate réduit par litre de sédiment et par jour, alors que la respiration nitrate et la méthanogénèse concernent seulement quelques  $\mu\text{moles}$  à quelques dizaines de  $\mu\text{moles}$  de nitrate consommé ou de méthane réduit. En milieu marin, dominé par la sulfato-réduction, la méthanogénèse découle surtout de la réduction de la triméthylamine.

La distribution des bactéries constitue un patchwork, mais leur rôle doit être considéré comme un continuum dans lequel les microflores opèrent en associations à l'échelle d'espace de leur taille microscopique et à l'échelle de temps de leur vitesse de génération, mais dont les conséquences sur l'environnement interviennent à l'échelle planétaire et au niveau des temps géologiques.

\* Synthèse des travaux du Laboratoire de Microbiologie Marine.

## Antibiotic resistance of *Aeromonas hydrophila* strains isolated from several sources

J.-J. BORRERO, M. BOSCA, D. CASTRO, R. CORNAX and M.-A. MORINIGO

Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Malaga, 29071 Malaga (Spain)

*Aeromonas hydrophila*, a motile gram-negative rod, causes several diseases among poeclitherm and homeotherm animals, including haemorrhagic septicemia, red sore, gastroenteritis and endocarditis [2,3,5]. Several bacterial phenotypic properties, such as resistance to antimicrobial drugs or virulence determinants have been demonstrated to be plasmid encoded. The presence of plasmids in these pathogenic microorganisms may possess a potential public health hazard, since they may be transferred from animals to humans either directly or indirectly [1,4,6,7].

In this study the antibiotic resistance profiles of *A. hydrophila* strains isolated from water environments and animals (shellfish and fish) were analyzed. Furthermore, the loss of the resistance to any antimicrobial agents after curing experiments of the strains was also considered. Drug sensitivity patterns of 60 strains of *A. hydrophila* isolated from animals (shellfish and fish) and water (freshwater and seawater) samples were determined by disk diffusion using Mueller-Hinton agar (BioMerieux, Spain). The following chemotherapeutic agents and concentrations were used ( $\mu\text{g/disk}$ ): amikacin (30), ampicillin (10), carbenicillin (100), cephalothin (30), chloramphenicol (30), colistin (10), gentamicin (10), kanamycin (30), nalidixic acid (30), neomycin (30), nitrofurantoin (300), B polymyxin (300 U), pristinamycin (15), streptomycin (10), sulphadiazine (1000), sulphamethoxazole-trimethoprim (1.25 + 23.75), tetracycline (30), and tobramycin (10). All the antibiotic disks were supplied by BioMerieux.

Curing experiments were carried out using acridine orange (Sigma, USA), following a modification of the techniques described by Winckler et al. [8]. Cells were grown in Brain-Heart-infusion broth (BHIB, Difco, USA) for 24 h, and 2-ml aliquots were added to 1-ml of fresh broth, incubating for 3 h at 26°C. Then, 1-ml of a solution of acridine orange (20  $\mu\text{g/ml}$ ) was added, and the culture was centrifuged at 3,500 x g for 20 min. The supernatant was eliminated, and 2-ml of fresh BHIB were added to the pellet, incubating at 35°C for 2-6 h. After this period of time the strains were tested in relation to the loss of antibiotic resistance and plasmid profiles.

The overall percentage of drug-resistance (Table 1) indicated that more than 90% of the strains were resistant to ampicillin (91.7%), cephalothin (91.7%), tetracycline (96.7%), and pristinamycin (93.3%), which may be considered like a natural or chromosomal resistance to these drugs. On the other hand, percentages of resistance lesser than 5% were obtained for gentamicin (3.3%) and amikacin (0%).

Although the percentage of resistance of all three groups of strains was quite similar, some differences were found according to the source of isolation (Table 1). In fact, resistance to gentamicin was only detected on the strains from seawater. Similarly, higher percentages of resistance to carbenicillin, chloramphenicol, sulphamethoxazole-trimethoprim, and nalidixic acid were obtained on the strains isolated from water in comparison with those from strains of animal origin. For streptomycin, tobramycin, and kanamycin the percentages of resistance obtained for the freshwater strains were significantly lower ( $p < 0.01$ ) than for the other strains. Finally, neomycin resistance was more frequently detected among the strains isolated from marine animals (20%) than from the other environments (about 4%).

All the derivative isolates from the acridine orange treatment were tested for plasmid content and drug resistance patterns. Table 1 reports the percentages of drug-resistance presented by the strains after the curing assay. The strains of *A. hydrophila* isolated from the three environments carried resistance genes located in the bacterial chromosome for the antibiotics ampicillin, cephalothin, tetracycline, carbenicillin, pristinamycin and nitrofurantoin. In contrast, the cured plasmidless strains lost simultaneously their resistance to tobramycin, neomycin, gentamicin, sulphadiazine and kanamycin. The resistance to nalidixic acid, streptomycin, sulphamethoxazole-trimethoprim, chloramphenicol and colistin are linked to chromosomal and plasmid genes.

Table 1. Resistance to 18 chemotherapeutic agents in the strains of *A. hydrophila* depending on the source of isolation before and after curing experiments

Drugs	Source							
	Freshwater (n=23)		Seawater (n=27)		Animals (n=10)		Total (n=60)	
	Before <sup>a</sup>	After <sup>a</sup>	Before	After	Before	After	Before	After
Ampicillin (Am)	87 <sup>b</sup>	87	92.6	92.6	100	100	91.7	91.7
Amikacin (AN)	0	0	0	0	0	0	0	0
Carbenicillin (Cb)	69.6	69.6	74.1	74.1	10	10	61.7	61.7
Cephalothin (C)	87	87	92.6	92.6	100	100	91.7	91.7
Chloramphenicol (C)	65.2	43.5	51.9	48.1	20	20	51.7	41.7
Colistin (Cl)	26.1	21.7	18.2	11.1	20	20	21.7	15
Gentamicin (Gm)	0	0	7.4	0	0	0	3.3	0
Kanamycin (K)	4.3	0	18.5	0	10	0	11.7	0
Nalidixic acid (NA)	60.9	34.8	59.3	44.4	10	10	51.7	35
Neomycin (N)	4.3	0	3.7	0	20	0	6.7	0
Nitrofurantoin (FM)	78.3	78.3	81.5	81.5	60	60	76.7	76.7
Polimyxin B <sup>c</sup> (PB)	4.3	ND	11.1	ND	10	ND	8.3	ND
Pristinamycin (Pr)	87	87	96.3	96.3	100	100	93.3	93.3
Streptomycin (S)	43.5	13	85.2	33.3	80	20	68.3	23.3
Sulphadiazine (Sd)	78.3	0	74.1	0	60	0	73.3	0
Sulphamethoxazole (SXT)	69.6	13	63	22.2	30	10	60	16.7
Tetracycline (Te)	95.6	95.6	96.3	96.3	100	100	96.7	96.7
Tobramycin (NN)	8.7	0	14.8	0	20	0	15	0

<sup>a</sup> Before and after curing experiments<sup>b</sup> Percentage of resistant strains.<sup>c</sup> All the strains resistant to Polimyxin B did not harbor plasmid

ND: Not determined

### REFERENCES

- Aoki T, Arai T, & Egusa S (1977). Microbiol Immunol. 21:77-83.
- Hazen TC, Raker HL, Esch GW, & Fliermans CB (1978). J Protozool 25:351-355.
- Huizinga HW, Esch GW, & Hazen TC (1979). J Fish Dis 2:263-277.
- Joseph SW, Dally OP, Hunt WS, Seidler RJ, Allen DA, & Colwell RR (1979). J Clin Microbiol 10:46-49.
- Ljungh A, Popoff M, & Wadstrom T (1977). J Clin Microbiol 6:96-100.
- Toranzo AE, Barja JL, Potter SA, Colwell RR, Hetrick FM, & Crosa JH (1983). Infect Immun 39:1220-1227.
- Toranzo, A.E., Combarro, P., Lemos, M.L. & Barja, J.L. (1984). Appl. Environ. Microbiol. 48: 872-877.
- Winckler, U., Ruger, W., & Wackemagel, W. (Eds.) (1976) in Bacterial, Phage and Molecular Genetics, pp. 127-130, Springer-Verlag, New York.