



HAL
open science

**PROBLÈMES POSÉS PAR LE MÉTABOLISME DE
QUELQUES BACTÉRIES CALCIFIANTES
AÉROBIES 1. Etude d'une association bactérienne
halophile productrice d'aragonite, en milieu marin**

Cécile Billy

► **To cite this version:**

Cécile Billy. PROBLÈMES POSÉS PAR LE MÉTABOLISME DE QUELQUES BACTÉRIES CALCIFIANTES AÉROBIES 1. Etude d'une association bactérienne halophile productrice d'aragonite, en milieu marin. *Vie et Milieu / Life & Environment*, 1980, pp.165-169. hal-03008194

HAL Id: hal-03008194

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-03008194v1>

Submitted on 16 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

PROBLÈMES POSÉS PAR LE MÉTABOLISME DE QUELQUES BACTÉRIES CALCIFIANTES AÉROBIES

I. Etude d'une association bactérienne halophile productrice d'aragonite, en milieu marin

Cécile BILLY

Géologie Sédimentaire et Micropaléontologie,
4, place Jussieu, Paris

CALCIFICATION
ASSOCIATION BACTÉRIENNE
ARAGONITE
MILIEUX DE CULTURE
MILIEU MARIN

RÉSUMÉ. — Une association bactérienne calcifiante a été extraite d'un aquarium d'eau de mer et étudiée du point de vue biochimique; elle est protéolytique et ammonifiante. Dans les sédiments, les processus biologiques et physicochimiques de la genèse aragonitique sont liés aux conditions du milieu.

CALCIFICATION
BACTERIAL ASSOCIATION
ARAGONITE
CULTURE MEDIA
MARINE ENVIRONMENT

ABSTRACT. — A calcifying bacterial association was isolated from a marine aquarium and studied for its biochemical properties; proteolysis and ammonification are among its features. In sediments, biological and physicochemical processes of aragonitic genesis are conditioned by the environment.

Le carbonate de calcium cristallise dans la nature essentiellement sous trois formes : vaterite très instable, aragonite métastable, calcite stable. Ces trois variétés adoptent respectivement les systèmes hexagonal, orthorhombique et rhomboédrique.

En raison de son état instable, la vaterite est à peu près absente des sédiments. La précipitation calcaire se fait préférentiellement sous forme d'aragonite dans les milieux marins, de calcite dans les milieux limniques. Nous aborderons dans une première partie l'étude d'une association bactérienne halophile productrice d'aragonite, réservant pour une deuxième partie une étude parallèle sur quelques microorganismes producteurs de calcite en milieu limnique.

Les traités de systématique bactérienne ne mentionnent guère, parmi les caractères taxonomiques, l'aptitude de certains germes à précipiter le carbonate de calcium. Cette propriété n'est certes pas un élément de classification; elle est même considérée actuellement

comme banale et très répandue. Les premières données biochimiques relatives à la précipitation du carbonate de calcium ont été formulées par Kellermann et Smith (1914) à propos du *Pseudomonas calcis* de Drew. Ce germe et le *Ps. precipitans* de Molisch (1925) font partie, dans la 8^e édition Bergey (1974), des Pseudomonadacées *incertae sedis*.

En 1963, Greenfield a mesuré le CO₂ et le NH₃ dégagés lors de la croissance d'un *Pseudomonas* marin calcifiant. Mais on ignore encore le degré de participation des microorganismes dans les réactions qui aboutissent à la cristallisation du carbonate de calcium : on ne sait pas, par exemple, si les Bactéries spécifiques ne font qu'amorcer le processus ou si elles le réalisent totalement.

Nous rassemblons et complétons ici les résultats obtenus lors de l'étude d'une association bactérienne marine extraite d'un aquarium d'eau de mer (Billy et coll., 1976). Nous mentionnons l'influence que peut avoir le

milieu sur la croissance et la morphologie des éléments de l'association et des cristaux de carbonate obtenus en culture sous forme d'aragonite.

TECHNIQUE

Les milieux sélectifs utilisés pour l'étude de l'association ont la composition suivante :

peptone	0,1
extrait de levure	0,1
MgSO ₄	0,12
acétate de calcium	0,04
citrate de sodium	0,1
extrait d'Algues marines	5 ml
eau de mer	95 ml

Pour les teneurs du milieu en calcium et en magnésium, il a été tenu compte des résultats de diverses analyses chimiques de l'eau de mer, en moyenne 0,04 % de Ca et 0,129 % de Mg.

L'extrait d'Algues s'obtient par décoction pendant 30 min. de 50 g de *Fucus* ou d'*Ulva* dans un litre d'eau de mer, le liquide est filtré puis stérilisé.

L'ajustement du pH du milieu à 7,5 se fait au moyen d'une solution de Na₂CO₃ à 5 %.

Le milieu est utilisé sous forme liquide, ou solide gélosé à 1,5 %. Après filtration, il est stérilisé 20 min. à 110°.

RÉSULTATS

L'association marine qui a été extraite d'un aquarium d'eau de mer est composée d'un *Vibrio* et d'un *Achromobacter* cultivant à température ambiante avec un optimum de 26 à 28°.

Dans les colonies formées sur milieu gélosé, le vibron n'est pas calcifiant, il occupe surtout le liseré externe, souvent dentelé, alors que les cristaux d'aragonite, souvent sphériques, sont au centre, là où sont plus spécialement les *Achromobacter* (Fig. 1).

1) Le vibron a été isolé, soit par augmentation de la quantité de magnésium dans le milieu de culture, soit par modification de la salinité. Euryhalin, il supporte soit une addition de 10‰ de NaCl, soit un passage direct dans un milieu préparé à l'eau distillée.

Le vibron est un germe de petite taille, 0,3 µm × 0,8 µm, anaérobie facultatif, à Gram négatif, incurvé, mobile au moyen d'un cil polaire. Il alcalinise fortement les milieux. Le test sur le Rouge de méthyle est négatif. Il liquéfie lentement la gélatine et la cervelle, mais n'a d'action ni sur le lait ni sur l'urée; il n'utilise pas les citrates, possède une catalase, réduit rapidement les nitrates. Les cultures sur glucides en eau peptonée

sont abondantes, mais l'acidification opérée par voie oxydative y est masquée par la production de composés alcalins d'odeur assez fétide. Les tests indole, acétoïne, lécithinase, hémolysine sont négatifs.

2) L'*Achromobacter* a été surtout étudié à travers l'association, car il n'a pu être isolé que de façon précaire, livrant chaque fois des formes allongées et vieilles, douées d'une faible activité.

On peut le rendre prédominant en ajoutant du (NH₄)₂CO₃ ou en augmentant la quantité de citrate trisodique dans les milieux qui contiennent de l'acétate de calcium. Il a pu être isolé moyennant ces conditions et par addition simultanée de filtrat, sur Millipore, d'une culture de vibrons âgée de 48 heures. Un tube de 5 ml de culture reçoit 3 gouttes de filtrat, une boîte de Petri pourvue d'un milieu solide gélosé en reçoit 0,5 ml. Les colonies isolées alors sont blanches et opaques; elles sont étalées et très muqueuses, leur diamètre atteint parfois plus de 10 mm. Les germes demeurent mobiles mais vieillissent prématurément en s'allongeant de façon démesurée; ils retrouvent leur taille normale lorsqu'ils se trouvent à nouveau en présence des vibrons.

Dans l'association, l'*Achromobacter* est un bâtonnet aérobie strict de 0,5 µm × 1,2 µm environ, à Gram négatif; sa ciliature est péritriche; il n'est pas pigmenté, n'agit ni sur le lait ni sur l'urée, ne produit ni indole ni acétoïne, ne possède ni hémolysine ni lécithinase, mais alcalinise fortement les citrates. Les actions catalasique et protéolytique sont nettement plus intenses que chez le vibron isolé. Sténohalin, l'*Achromobacter* supporte un supplément de NaCl mais absolument pas l'absence de sel. Des antibiogrammes ont été pratiqués sur les germes de l'association; il en ressort une nette sensibilité à la pénicilline et à l'ampicilline.

En raison de l'insuffisance des informations biochimiques, il n'est pas question de chercher à introduire ces deux germes dans la nomenclature systématique; l'isolement est trop précaire pour justifier des déterminations spécifiques.

L'association s'est trouvée liée à la présence d'un Rhizopode *Trichosphaerium* sp. dans un aquarium destiné à l'élevage de Foraminifères, ceci dans chacun des trois échantillons examinés entre 1973 et 1976.

INFLUENCE DU MILIEU

Dans les cultures, la composition chimique du milieu influe sur les croissances bactérienne et cristalline.

1) Ainsi qu'il a été dit plus haut à propos des caractéristiques biochimiques des éléments de l'association, dans les milieux sucrés peptonés, l'alcalinisation masque l'acidification produite par le catabolisme des glucides. La présence simultanée de glucides et de peptone donne lieu au dégagement d'une odeur assez fétide par accu-

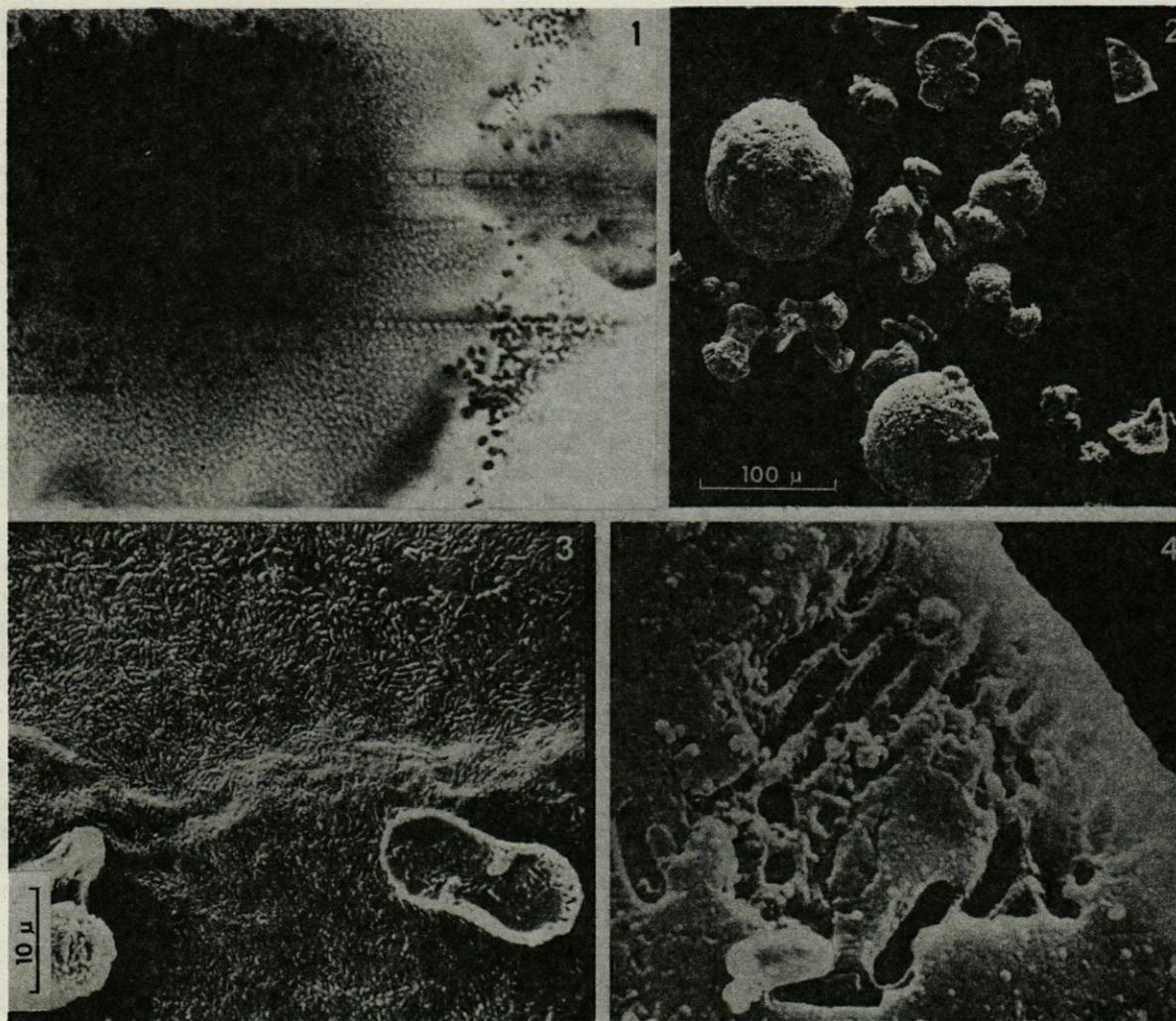


PLANCHE I

1, Colonies d'association *Vibrio-Achromobacter* sur milieu solide préparé à l'eau de mer. Le liseré externe, légèrement dentelé est toujours dépourvu de cristaux. 2, quelques formes de cristaux d'aragonite obtenus sur milieu gélosé (MEB microscope électronique à balayage) (Laboratoire Micropaléontologie, cliché Ph. Blanc). 3, surface d'un milieu gélosé montrant les relations étroites qui existent entre les cristaux et les Bactéries (cliché Ph. Blanc). 4, empreintes de cellules d'*Achromobacter* dans un cristal d'aragonite âgé et érodé (cliché Ph. Blanc).

Associated colonies Vibrio-Achromobacter on a sea-water agar medium. The external edge, slightly indented, is always devoid of crystals. 2, a few aragonitic forms obtained on agar medium. 3, surface of an agar medium showing the tight relations which exist between crystals and bacteria. 4, Impresses of Achromobacter cells in an old and eroded aragonite crystal.

mulation de produits ammoniacués. Les vibrions s'assemblent en formations spirillaires, les *Achromobacter* subissent un phénomène de turgescence, ils prennent la forme de navettes; le pH est stabilisé à 7 - 7,5. Dans un milieu pourvu d'une source d'azote mais dépourvu de glucides, le pH s'élève couramment à 8 - 8,5. Dans les milieux sucrés où le 1% de peptone est remplacé par 0,1% d'extrait de levure, l'acidification est modérée (on sait en effet que les bactéries oxydatives libèrent moins de catabolites que les bactéries fermentatives), le pH descend ici environ à 5,5 - 6.

2) Dans le milieu sélectif initialement utilisé (cf. p. 166), l'addition de carbonate d'ammonium provoque

un accroissement sensible du nombre des *Achromobacter*, mais en même temps un vieillissement prématuré : les éléments cellulaires s'allongent et s'amincissent, leurs mouvements deviennent onduleux. Dans un milieu agité, non stérile, un apport de 0,05% de ce même carbonate $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, a provoqué la formation d'un complexe qui a été analysé comme $\text{PO}_4\text{NH}_4\text{Mg}, 6 \text{H}_2\text{O}$. Molisch (1925) avait déjà observé ce type de cristallisation en ajoutant de la chair de Poisson putréfiée à un milieu marin dans l'étude du *Pseudomonas calciprecipitans*; Shinano et Sakai (1975) ont également obtenu ce composé par addition de différentes quantités de sels de magnésium à des cultures de germes marins calcifiants.

3) Les sels minéraux fournis en surplus aux milieux – que ce soit des phosphates, des carbonates ou des sulfates – sont le plus souvent nuisibles. C'est ainsi que l'addition de sulfate de calcium aux doses de 0,05 et 0,1% gêne la production d'aragonite, surtout lorsque le citrate trisodique est absent : des cristallisations tout à fait étrangères s'organisent, la calcification est perturbée.

4) Le citrate trisodique favorise la croissance des *Achromobacter* car ceux-ci sont seuls à l'utiliser dans l'association. La dose de 0,5 à 1‰ était la quantité initialement employée dans les milieux. Un apport de 2‰ semble être la dose optimale : les vibrions ne disparaissent cependant pas complètement, mais les formes cristallines fibro-radiées sphériques voient leur nombre et leur diamètre augmenter de façon sensible. Si l'on fait passer la quantité de citrate de 2 à 5‰, par contre le nombre et la taille des éléments sphériques régressent ; en même temps, des précipités, dont la nature n'a pas été déterminée, envahissent les colonies tandis que les vibrions reprennent une nette prééminence. Dans le cas où la quantité de citrate est portée à 10‰, l'association ne produit plus d'aragonite. L'excès de citrate n'abolit pas l'activité bactérienne, mais le métabolisme est provisoirement perturbé ; réensemencée sur un milieu citraté à 2‰, l'association produit à nouveau des sphères aragonitiques de grand diamètre.

CONCLUSION

Dans les divers travaux relatifs à la précipitation expérimentale de CaCO_3 , les cristaux d'aragonite ont été maintes fois reconnus – surtout en eau de mer –, que les cristallisations aient été obtenues par voie physicochimique ou par voie bactérienne. Et toujours, les auteurs ont constaté une certaine diversité de formes : cristaux sphériques, en oursins, en pinceaux, en faisceaux et en haltères... (Callame et Dupuis, 1972, Dragone et coll., 1974, Mac Callum et Guhathakurta, 1970...) (et ici fig. 2). On est tenté aussi de faire un rapprochement entre l'association bactérienne étudiée ici et les éléments cellulaires – Pseudomonadacées et formes vibronnaires – décelés par Mac Callum et Guhathakurta (1970) dans les sédiments des Bahamas.

Krumbein (1974) a donné une illustration d'aiguilles d'aragonite faisant corps avec des cellules bactériennes qui sont cultivées dans un milieu d'eau de mer bien pourvu en matières organiques.

De fait, les clichés obtenus ici au M.E.B. (Fig. 3 et 4) rendent bien compte de l'intrication qui existe entre bactéries et cristaux. D'assez nombreux auteurs regardent la précipitation d'aragonite dans les sédiments comme résultant d'une succession de réactions tant biochimiques que physicochimiques. L'hypothèse est plausible. La dégradation des substances protéiques et autres matières organiques est le résultat de réactions enzymatiques qui mènent à CO_2 et NH_3 , ce catabolisme pouvant d'ailleurs être l'œuvre de bactéries simplement protéoly-

tiques et ammonifiantes (Baier, 1937 cité par Senez, 1949) non spécifiques de la calcification. CO_2 est lui-même un catabolite bactérien tout à fait banal. Greenfield (1963) a pu mesurer chez une Pseudomonadacée calcifiante halophile la chute, puis la remontée du pH lors du dégagement de CO_2 , puis de NH_3 . Si, avec cet auteur, on admet qu'il existe dans un stade ultérieur un complexe à base d'ammoniaque et de calcium, on ne sait pas encore comment ce composé présumé peut prendre naissance, c'est-à-dire s'il procède d'une activité bactérienne, d'un chimisme passif ou s'il résulte des deux.

Dans cette optique, il a paru intéressant de chercher à savoir si l'anhydrase carbonique, qui joue souvent un si grand rôle dans les règnes animal et végétal, intervenait dans le mécanisme de la calcification. Les différents tests effectués amènent à penser que l'anhydrase ne fait pas partie de l'équipement enzymatique de l'association halophile (Billy et coll., 1979).

La question reste donc posée de savoir par quel mécanisme peut s'opérer la calcification. Nous avons évoqué ailleurs (Billy et Blanc, 1977) la participation des processus chimiques dans la diagénèse qui affecte d'anciennes cultures marines (transformation de l'aragonite en sa variété stable la calcite, et du carbonate de calcium en sulfate de calcium sous forme de gypse). Ces phénomènes tardifs ne renseignent pas sur le fond du problème et l'on peut s'en tenir actuellement à l'idée que dans la nature comme dans l'expérimentation les processus biologiques et physicochimiques peuvent se remplacer, se relayer, voire coexister selon les modifications des conditions du milieu.

BIBLIOGRAPHIE

- BERGEY, M., 1974. Manual of determinative Bacteriology. 8th edition.
- BILLY, C., Ph. BLANC et A. ROUVILLOIS, 1976. Synthèse d'aragonite en milieu marin par voie bactérienne. *Ann. Inst. Océanogr.*, **52** (2) : 231-239.
- BILLY, C., et Ph. BLANC, 1977. Application du M.E.B. à la cristallogénèse bactérienne d'aragonite et de calcite. *Trav. Lab. Micropaléont.* : 171-187.
- BILLY, C., J. FOURNIE, P. CARPENTIER et M. CHETAIL, 1979. Bactéries calcifiantes et anhydrase carbonique. *C.R. Hebd. séances Acad. Sci., Sér. D., Sci. Nat.*, **288** : 1687-1690.
- CALLAME, B. et J. DUPUIS, 1972. Sur la précipitation d'aragonite à partir des eaux intertidales de la pointe d'Arçay (Vendée). *C.R. hebd. séances Acad. Sci., Sér. D., Sci. Nat.*, **274** : 675-677.
- DRAGONE, D., F. DUVAL, J. GARREAU, A. GIROU, L. HUMBERT, C. JACQUIN et H. ROQUES, 1975. Genèse expérimentale et naturelle des carbonates de calcium. Mise au point sur les connaissances actuelles. *Ann. Spéléol.*, **30** (4) : 629-641.
- GREENFIELD, L.J., 1963. Metabolism and concentration of calcium and magnesium and precipitation of calcium carbonate by a marine bacterium. *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*, **109** : 23-45.

- KELLERMANN, K.F. et N.R. SMITH, 1914. Bacterial precipitation of calcium carbonate. *J. Wash. Acad. Sci.*, **4** : 400.
- KRUMBEIN, W.E., 1974. On the precipitation of aragonite on the surface of marine bacteria. *Naturwissenschaften*, **61** (4) : 167.
- MAC CALLUM, M.F. et K. GUHATHAKURTA, 1970. The precipitation of calcium carbonate from Seawater by bacteria isolated from Bahama Bank Sediments. *J. Appl. Bacteriol.*, **33** : 649-655.
- MOLISCH, H., 1925. Ueber Kalkbakterien und andere Kalkfällende Pilze. *Zentbl. Bakt. Parasitkde*, II, **65** : 130-139.
- SENEZ, J., 1949. Bactéries anaérobies des sédiments marins. *Ann. Inst. Pasteur Paris*, **77** : 512-536.
- SHINANO, H. et M. SAKAI, 1975. Effect of magnesium ion concentration on the types of crystals deposited by marine bacteria in sea water. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.*, **41** (8) : 913.

Accepté le 14 avril 1979.